

Ano: 2019

ISBN: 978-65-80261-03-1



# Ciência, Inovação e Tecnologia na Amazônia

## Organizadores

Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti  
Clarice Maia Carvalho  
Renato André Zan  
Romeu Paulo Martins Silva

**Stricto  
ensu  
Editora**

**Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti**

**Clarice Maia Carvalho**

**Renato André Zan**

**Romeu Paulo Martins Silva**

**(Organizadores)**

## **Ciência, Inovação e Tecnologia na Amazônia**

**Rio Branco, Acre**

## Stricto Sensu Editora

**CNPJ:** 32.249.055/001-26

**Prefixo Editorial:** 80261

**Editora Geral:** Profa. Msc. Naila Fernanda Sbsczk Pereira Meneguetti

**Editor Científico:** Prof. Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti

**Bibliotecária:** Tábata Nunes Tavares Bonin – CRB 11/935

**Revisão:** Os autores

## Conselho Editorial

Prof.<sup>a</sup> Msc. Ageane Mota da Silva (Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Acre)

Prof. Dr. Amilton José Freire de Queiroz (Universidade Federal do Acre)

Prof. Dr. Francisco Carlos da Silva (Centro Universitário São Lucas)

Prof. Dr. Humberto Hissashi Takeda (Universidade Federal de Rondônia)

Prof. Msc. Jader de Oliveira (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho)

Prof. Dr. Leandro José Ramos (Universidade Federal do Acre)

Prof. Dr. Luís Eduardo Maggi (Universidade Federal do Acre)

Prof. Msc. Marco Aurélio de Jesus (Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Rondônia)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariluce Paes de Souza (Universidade Federal de Rondônia)

Prof. Dr. Paulo Sérgio Bernarde (Universidade Federal do Acre)

Prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva (Universidade Federal do Acre)

Prof. Dr. Renato Abreu Lima (Universidade Federal do Amazonas)

Prof. Msc. Renato André Zan (Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Rondônia)

Prof. Dr. Rodrigo de Jesus Silva (Universidade Federal Rural da Amazônia)

## Ficha Catalográfica

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

C569

Ciência, inovação e tecnologia na Amazônia / Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti...[et al.]. – Rio Branco : Stricto Sensu, 2019.

266 p. : il

ISBN: 978-65-80261-03-1

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031

1. Ciência. 2. Inovação. 3. Tecnologia. I. Título. II. Meneguetti, Dionatas Ulises de Oliveira. III. Carvalho, Clarice Maia. IV. Zan, Renato André. V. Silva, Romeu Paulo Martins.

**Bibliotecária Responsável:** Tábata Nunes Tavares Bonin / CRB 11-935

O conteúdo dos capítulos do presente livro, correções e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

É permitido o download deste livro e o compartilhamento do mesmo, desde que sejam atribuídos créditos aos autores e a editora, não sendo permitido a alteração em nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

sseditora.com.br

## APRESENTAÇÃO

O livro “Ciência, Inovação e Tecnologia na Amazônia” em seu primeiro volume apresenta-nos 20 capítulos que abordam revisões, pesquisas originais e propostas de pesquisas desenvolvidas na região Amazônica.

Em seus capítulos, o livro faz referências as pesquisas de temáticas como avaliações de florísticas da região; produção e qualidade de alimentos e bebidas; estudos genéticos; atividades microbiológicas, entre outras.

As temáticas Ciência, Inovação e Tecnologia são demonstradas no livro através da caracterização de métodos e/ou apresentação de resultados de pesquisas para explicitação do conteúdo abordado em cada capítulo, tendo como referencial os conteúdos de Ciências Exatas (Estatística, Química e Engenharia), Biológicas (Microbiologia, Ecologia, Botânica) Tecnologia e Biotecnologia. Os resultados apresentados, por vezes, servem de orientação à produção de novas pesquisas e trabalhos científicos, perpassando pelas áreas citadas acima e finalizando com conteúdo relacionado com os testes utilizados em cada capítulo.

Elaborar uma pesquisa ou trabalho acadêmico é uma maneira de demonstrar o grau de conhecimento e aproveitamento que se obteve durante a vida acadêmica e, ao mesmo tempo, ampliar seus conhecimentos através da pesquisa. Para que haja bom êxito neste processo, deve-se seguir um planejamento, iniciado pela escolha de um tema para a pesquisa, e, posterior elaboração do projeto, seguido do desenvolvimento da pesquisa.

Por fim, esperamos que este livro agregue conhecimentos e sirva como base inspiradora de novas pesquisas nas áreas de inovação e tecnologia.

Desejo a todos uma ótima leitura

Renato André Zan

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO. 1..... 11**

#### **BIOATIVOS DE PLANTAS NO CONTROLE FITOSSANITÁRIO NA AMAZÔNIA OCIDENTAL**

Josimar Batista Ferreira (Universidade Federal do Acre)

Luan de Oliveira Nascimento (Universidade Federal do Acre)

Gleisson de Oliveira Nascimento (Universidade Federal do Acre)

Diego Pereira de Souza (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia)

Antonia Fabiana Barros de Lima (Universidade Federal do Acre)

Sabrina Silva de Oliveira (Fundação Oswaldo Cruz)

José Francisco de Carvalho Gonçalves (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.01

### **CAPÍTULO. 2..... 25**

#### **FATORES PRÓ-CICATRIZANTES E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS: UMA REVISÃO**

Laura Nadyne da Silva Silvestre (Universidade Federal do Acre)

Hémilly Caroline da Silva Paixão (Universidade Federal do Acre)

Sérgio Luiz Prolo Júnior (Universidade Federal do Acre)

Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti (Universidade Federal do Acre)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.02

### **CAPÍTULO. 3..... 39**

#### **EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE *Curcuma longa***

Natacha Pinheiro Melo Brozzo (Universidade Federal do Acre)

Renildo Moura da Cunha (Universidade Federal do Acre)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.03

### **CAPÍTULO. 4..... 59**

#### **FABRICAÇÃO E ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE CERVEJA A PARTIR DO CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*)**

Débora Taisa Keller da Silva (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)

Fernanda Rodrigues de Siqueira (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)  
Stephanie Jedoz Stein (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)  
Dandara da Silva Pereira (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)  
Daniella da Silva Sousa (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)  
José Antonio Avelar Baptista (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do MS)  
Renato André Zan (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)  
DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.04

**CAPÍTULO. 5..... 66**

**COMPOSIÇÃO FLORÍSTICA E FITOSSOCIOLOGIA DE UM TRECHO DE MATA CILIAR NO RIO MACHADO, JI-PARANÁ (RONDÔNIA)**

Lorena de Souza Tavares (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)  
Gilmar Alves Lima Júnior (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)  
Raimundo Gomes da Silva Junior (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)  
Jocimar Rodrigues Coutinho Júnior (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)  
DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.05

**CAPÍTULO. 6..... 81**

**PROJETO ESTRADAS: COLETA, IDENTIFICAÇÃO E COMPOSIÇÃO FLORÍSTICA NO ESTADO DE RONDÔNIA**

Gilmar Alves Lima Júnior (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)  
Joseane Barbosa Bessa (Centro Universitário São Lucas)  
Julio Henrique Germano de Souza (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)  
DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.06

**CAPÍTULO. 7..... 96**

**COLETA DE DADOS DE VEGETAÇÃO E FLORA – ENFOQUE NA AMAZÔNIA SUL-OCCIDENTAL, ESTADO DE RONDÔNIA**

Gilmar Alves Lima Júnior (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)  
DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.07

**CAPÍTULO. 8..... 105**

**TECNOLOGIAS EM GENÉTICA MOLECULAR PARA INTENSIFICAÇÃO DO USO DE AMENDOIM FORRAGEIRO EM PASTAGENS NA AMAZÔNIA**

Jônatas Chagas de Oliveira (Universidade Federal do Acre)

Tatiana de Campos (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.08

**CAPÍTULO. 9..... 120**

**USO DA BIOLOGIA MOLECULAR PARA ESTUDOS GENÉTICOS EM AÇAÍZEIROS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Hellen Sandra Freires da Silva Azêvedo (Fundação Oswaldo Cruz-Rondônia)

José Marlo Araújo de Azevedo (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Acre)

Lucielio Manoel da Silva (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)

Karina Martins (Universidade Federal de São Carlos)

Tatiana de Campos (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.09

**CAPÍTULO. 10..... 136**

**ANÁLISE CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DE FRAÇÕES DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK (CELASTRACEAE) CHICHUÁ (XIXUÁ) AMAZÔNICO**

Tamires Mota da Silva (Universidade Federal do Acre)

Valdir Alves Facundo (Universidade Federal de Rondônia)

Renato Abreu Lima (Universidade Federal do Amazonas)

Renildo Moura da Cunha (Universidade Federal do Acre)

Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti (Universidade Federal do Acre)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.10

**CAPÍTULO. 11..... 149**

**ANÁLISE GENOTÓXICA: MÉTODOS E APLICAÇÕES**

Sérgio Luiz Prolo Júnior (Universidade Federal do Acre)

Hémilly Caroline da Silva Paixão (Universidade Federal do Acre)

Laura Nadyne da Silva Silvestre (Universidade Federal do Acre)

Romeu Paulo Martins Silva (Universidade Federal do Acre)

Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti (Universidade Federal do Acre)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.11

**CAPÍTULO. 12..... 163**

**A UTILIZAÇÃO DO SISTEMA TESTE DE *Allium cepa* PARA ANÁLISE MUTAGÊNICA DE RIOS DA AMAZÔNIA**

Hémilly Caroline da Silva Paixão (Universidade Federal do Acre)

Sérgio Luiz Prolo Júnior (Universidade Federal do Acre)

Renato André Zan (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)

Romeu Paulo Martins Silva (Universidade Federal do Acre)

Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti (Universidade Federal do Acre)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.12

**CAPÍTULO. 13..... 176**

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE RIOS, POÇOS E ÁGUAS EM GERAL**

Stephanie Jedoz Stein (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)

Andrômeda Serpa H. S. Zan (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)

Renato André Zan (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.13

**CAPÍTULO. 14..... 184**

**ENSAIO DE MICRONÚCLEO EM CULTURA CELULAR HEPÁTICA COMO FERRAMENTA DE AVALIAÇÃO GENOTÓXICA**

Alecsandra Oliveira de Souza (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.14

**CAPÍTULO. 15..... 192**

**QUALIDADE DOS ACHOCOLATADOS EM PÓ COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE RIO BRANCO-ACRE**

Mariana Ennis Figueiredo Barbosa (Universidade Federal do Acre)

Ianna Andrade Oliveira (Universidade Federal do Acre)

Marilene Santos de Lima (Universidade Federal do Acre)

Francimar Leão Jucá (Universidade Federal do Acre)

Cydia de Menezes Furtado (Universidade Federal do Acre)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.15

**CAPÍTULO. 16..... 201**

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE HAMBÚRGUERES COMERCIALIZADOS EM HAMBURGUERIAS NO MUNICÍPIO DE RIO BRANCO, ACRE**

Leticia Furtado de Assis (Universidade Federal do Acre)

Cydia de Menezes Furtado (Universidade Federal do Acre)

Marilene Santos de Lima (Universidade Federal do Acre)

Ludmilla da Silva Brandão (Universidade Federal do Acre)

Carolina Pontes Soares (Centro Universitário Uninorte)

Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti (Universidade Federal do Acre)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.16

**CAPÍTULO. 17..... 211**

**QUALIDADE DO SAL DE COZINHA COMERCIALIZADO NO MUNICÍPIO DE RIO BRANCO- ACRE**

Ianna Andrade Oliveira (Universidade Federal do Acre)

Mariana Ennis Figueiredo Barbosa (Universidade Federal do Acre)

Marilene Santos de Lima (Universidade Federal do Acre)

Layra Lucy Albuquerque (Centro Universitário Uninorte)

Cydia de Menezes Furtado (Universidade Federal do Acre)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.17

**CAPÍTULO. 18..... 220**

**ESTATÍSTICA DESCRITIVA E SUAS APLICAÇÕES**

Gleison Guardia (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)

Leonardo Mota de Andrade (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.18

**CAPÍTULO. 19..... 238**

**CULTIVO DE MINI-CORAÇÕES COMO PROPOSTA DE FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA TRIDIMENSIONAL (3D)**

Carolina Pontes Soares (Centro Universitário Uninorte)

Isac de Almeida Barbosa Neto (Centro Universitário Uninorte)

Natasha de Souza Pontes (Centro Universitário Uninorte)

Francimar Leão Jucá (Universidade Federal do Acre)

Layra Lucy Albuquerque (Centro Universitário Uninorte)

Cydia de Menezes Furtado (Universidade Federal do Acre)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.19

**CAPÍTULO. 20..... 253**

**ANUROS: DA REJEIÇÃO A IMPORTÂNCIA DO CONHECIMENTO NA EDUCAÇÃO AMBIENTAL**

Hassem Ide Neto (Centro Universitário Uninorte)

Patrícia Malta de Menezes (Centro Universitário Uninorte)

Cydia Menezes Furtado (Universidade Federal do Acre)

Solange Maria Chalub Bandeira Texeira (Centro Universitário Uninorte)

Janaína Silva de Almeida Queiroz (Centro Universitário Uninorte)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031.20

**ORGANIZADORES..... 265**

## BIOATIVOS DE PLANTAS NO CONTROLE FITOSSANITÁRIO NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

**Josimar Batista Ferreira<sup>1</sup>, Luan de Oliveira Nascimento<sup>2</sup>, Gleisson de Oliveira Nascimento<sup>3</sup>, Diego Pereira de Souza<sup>4</sup>, Antonia Fabiana Barros de Lima<sup>3</sup>, Sabrina Silva de Oliveira<sup>5</sup>, José Francisco de Carvalho Gonçalves<sup>4</sup>**

1. Universidade Federal do Acre (UFAC), Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Rio Branco, Acre, Brasil;
2. Universidade Federal do Acre (UFAC), Programa de Pós-graduação em Agronomia, Rio Branco, Acre, Brasil;
3. Universidade Federal do Acre (UFAC), Centro Multidisciplinar (CMULTI), Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil;
4. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal, Manaus, Amazonas, Brasil;
5. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE), Porto Velho, Rondônia, Brasil.

### RESUMO

Os óleos vegetais são considerados alternativas ao uso de agroquímicos no controle de doenças de plantas. Assim, este trabalho foi elaborado com o objetivo de compilar informações sobre pesquisas realizadas com óleos extraídos de espécies vegetais para o controle de fitopatógenos na região Amazônica. Dentre a diversidade vegetal amazônica, algumas espécies florestais são destaques tanto pela sua distribuição na região, como também pelos benefícios do óleo extraído. Esses produtos vegetais apresentam vasta aplicabilidade e suas propriedades químicas favorecem o controle de diversos patógenos que acometem culturas agrícolas. Trabalhos foram realizados para verificar o potencial dos óleos de *Euterpe oleracea*, *Carapa guianensis*, *Mauritia flexuosa*, *Copaifera* sp., *Astrocaryum* sp. e *Oenocarpus bataua* sobre o crescimento micelial de patógenos que atacam cultivos de importância econômica: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis* e *Fusarium solani*. Dentre os óleos verificados nos trabalhos, os óleos de andiroba, copaíba e murumuru apresentaram maior eficiência e amplo espectro de ação fungitóxica. Portanto, a utilização dos óleos provenientes de espécies vegetais pode ser alternativa no controle *in vitro* de fungos fitopatogênicos. Contudo, pesquisas em campo devem ser elaboradas para testar e comprovar sua efetividade *in situ*, no intuito de ratificar a formulação de produtos de base biológica para o controle fúngico.

**Palavras-chave:** Amazônia, biodiversidade e óleo vegetal.

## ABSTRACT

Vegetable oils are considered alternatives to the use of agrochemicals in the control of plant diseases. Thus, the work was elaborated with the objective of compiling information on researches with oils extracted from plant species for the control of phytopathogens in the Amazon region. Among the diversity of Amazonian plants, some forest species stand out both for their distribution in the region and for the benefits of oil extracted from these species. These plant products have wide applicability and their chemical properties favor the antifungal activity to the diverse agricultural pathogens. Studies were carried out to verify the potential of *Euterpe oleracea*, *Carapa guianensis*, *Mauritia flexuosa*, *Copaifera* sp., *Astrocaryum* sp. and *Oenocarpus bataua* on the inhibition of mycelial growth of pathogens affecting economically important crops: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis* and *Fusarium solani*. Among the oils verified in the works, andiroba, copaiba and murumuru oils presented higher efficiency and broad spectrum of fungitoxic action. Therefore, the use of plant species oils is feasible in the in vitro control of phytopathogenic fungi. However, field research should be designed to test and prove its effectiveness in situ, favoring the formulation of biologically based products for fungal control.

**Keywords:** Amazon, biodiversity and vegetable oil.

## 1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade da floresta Amazônica, embora ainda não completamente conhecida nas suas diferentes potencialidades, tem sofrido crescente pressão antrópica devido a alteração da paisagem como consequência da mudança do uso da terra. Estas alterações passam pela remoção da cobertura florestal que, por sua vez, são motivadas por várias ações legais e outras ilegais. As primeiras pautadas em atividades desenvolvimentistas sempre com aval dos governos central e local (ex: construções de hidroelétricas, rodovias, financiamento de desflorestamentos para pecuária, mineração, etc) e as atividades ilegais incentivadas pelas invasões e grilagem de terras, motivando a queima e o corte da floresta, o que promove o avanço do desmatamento em larga escala e formação de áreas altamente impactadas. A soma de tudo isso, certamente, contribui para o declínio e a extinção de espécies da fauna e da flora.

No entanto, diante do vasto acervo natural, formado por uma floresta de características exuberantes e única, a identificação de recursos vegetais que possam ser utilizados sustentavelmente para fins comerciais e biotecnológicos é uma laudável justificativa para a conservação dos recursos florestais. Seguindo a perspectiva da sustentabilidade e da biotecnologia, o uso de produtos naturais para o controle de alguns fitopatógenos, algo muito importante para o desenvolvimento agrícola, vem ganhando

interesse devido ao amplo espectro de ação biológica dos princípios ativos oriundos destes produtos, além de apresentarem baixo risco ao ambiente e a saúde dos animais.

Os óleos e extratos vegetais em substituição aos pesticidas apresentam-se como alternativa promissora no controle de fitopatógenos, por se tratar de substâncias com baixo poder residual, rápida degradação e menor custo, contribuindo para a conservação do meio ambiente. Além disso, a grande diversidade de plantas na região Amazônica tem contribuído para a descoberta de numerosas moléculas biologicamente ativas, estimulando interesse de pesquisas para utilização desses compostos como métodos alternativos para o controle fitossanitário.

Atualmente, a diversidade de produtos oriundos da floresta tem sido importante para comunidades locais, pois são fontes de renda complementar e também utilizados para o tratamento de enfermidades. No entanto, é necessário ir além e, estabelecer parcerias entre comunidades extrativistas, cooperativa e instituições de ensino e pesquisas, empresas e demais grupos interessados para que os óleos e demais produtos extraídos das plantas sejam caracterizados e testados quanto à composição físico-química e eventuais aplicações, entre essas a atividade antifúngica, e que posteriormente estes óleos possam ser recomendados para uso, de maneira segura e eficaz, em condições de campo durante o manejo de fitomoléstias.

Dessa forma, estudos com óleos extraídos de espécies vegetais nativas da Amazônia para uso na área de fitossanidade são importantes, uma vez que contribui para inovação científica, com total lógica de Pesquisa e Desenvolvimento – P&D para inovação de produtos e conservação da biodiversidade na região.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Com o desenvolvimento da agricultura, os produtos sintéticos estão sendo demasiadamente utilizados no controle de fitopatógenos que podem depreciar quantitativa e qualitativamente os produtos agrícolas primários. Em contraste a este cenário, torna-se essencial a utilização de compostos biologicamente ativos advindos de princípios sintetizados pelas plantas. Neste aspecto, a flora da Amazônia assume papel relevante, e isto se deve a diversidade vegetal e sua interação com o ambiente que representam grandes possibilidades das espécies fontes múltiplas expressarem rotas metabólicas (seguindo a interação genótipos versus ambiente, seja no metabolismo primário ou

secundário) capazes de sintetizarem compostos orgânicos com indicativos importantes para várias aplicações industriais, como exemplo substâncias capazes de controlar fitopatógenos, o que amplia o espectro de utilização dos recursos naturais, contribuindo para a conservação da biodiversidade.

## 2.1 PONTENCIALIDADE DA FLORESTA AMAZÔNICA

O bioma Amazônia detém uma vasta biodiversidade de animais e plantas, com estimativa de 50.000 espécies de plantas superiores já descritas, das quais são destinadas para o beneficiamento de madeiras, celulose, fibras, alimentos, extratos e óleos vegetais (TER STEEGE et al., 2016). Algumas espécies de árvores amazônicas são importantes do ponto de vista das estratégias de conservação, uma vez que são consideradas fontes múltiplas de produtos (DEMBÉLÉ et al., 2015), podendo inclusive apresentar compostos que podem ser utilizados para o controle de doenças em plantas (NASCIMENTO et al., 2019). As espécies com esse potencial de uso, também podem ser encontradas em regiões ao entorno da Amazônia Legal, e também em países vizinhos, incluindo Colômbia, Venezuela, Equador, Peru e Bolívia (SANTOS; FERREIRA, 2012).

Os óleos e extratos vegetais apresentam-se como valorosa oportunidade de exploração na Amazônia devido à grande variabilidade de espécies que ocorrem associadas ao potencial socioeconômico para comunidade tradicional habitante nesta região (NEWTON; WATKINSON; PERES, 2011). Os produtos florestais não madeireiros (PFNM) podem ser extraídos de diversas partes da planta, e sua composição química varia entre as espécies e compartimentos de um mesmo vegetal (MIRANDA et al., 2016).

Os óleos vegetais apresentam vasta aplicabilidade, indo desde a indústria de alimentos, energética, cosméticos, indústria de fármacos e defensivos agrícolas, e a atividade biológica está associada com suas propriedades químicas. Devido às inúmeras possibilidades de uso dos óleos e extratos vegetais, a demanda por esses produtos não madeireiros (PFNM) tem sido crescente nos últimos anos (FERREIRA et al., 2017).

No cenário da fitopatologia, o uso dos compostos vegetais, como alternativa aos compostos químicos para o controle de patógenos tem recebido destaque em pesquisas que visam o desenvolvimento de métodos sustentáveis de manejo na agricultura. Segundo Rufino, Araújo e Nogueira (2018), a diversidade de plantas existentes na Amazônia favorece o uso de óleos e extratos vegetais para a produção de fungicidas naturais, pois cerca de 78% de 209 trabalhos publicados correspondente ao controle de doenças de

plantas na região Amazônica brasileira de 2012-2017, foram conduzidos com a utilização de óleos e/ou extratos vegetais para o controle de fitopatógenos.

## 2.2 BIOATIVOS DE PLANTAS AMAZÔNICAS

De acordo com Almeida (2016), existem aproximadamente 339 espécies de plantas produtoras de óleos na Amazônia, porém, grande parte permanece desconhecida. Dentre o acervo vegetal da biodiversidade amazônica, as espécies *Astrocaryum ulei*, *Carapa guianensis*, *Copaifera* sp., *Euterpe oleracea*, *Mauritia flexuosa* e *Oenocarpus bataua* se destacam tanto pela sua distribuição na região, como também pelo óleo extraído que são utilizados para diversas finalidades.

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é palmeira nativa da Amazônia e tem se destacado na fruticultura regional pelo potencial dos seus produtos, destinados tanto para a produção de palmito, como de vinho a partir do seu fruto (NASCIMENTO et al., 2008). De acordo com Batista et al. (2016), a polpa de açaí contém alto teor de óleo vegetal, com destaque para o ácido oleico (65,81%), ácido palmítico (30,91%) e linoleico (15,54%), seus constituintes majoritários da porção lipídica.

A andiroba (*Carapa* sp.), pertencente à família botânica Meliaceae, é árvore amplamente conhecida e utilizada como planta medicinal na região amazônica. O óleo de andiroba é extraído da semente, sendo empregado pelas comunidades tradicionais na fabricação de sabão e no tratamento de doenças (PIRES; GRISOTTO; GRISOTTO, 2017). A composição deste óleo é caracterizada, principalmente, pela presença de acilgliceróis com altos níveis de insaturação, e também terpenoides, esteróis e liminoides (NASCIMENTO et al., 2019). Essas substâncias têm amplo espectro de aplicações (CABRAL et al., 2013), além do interesse na bioindústria devido às suas propriedades antifúngicas, antibacterianas, antimaláricas e antivirais (FUNASAKI et al., 2016).

A copaíba (*Copaifera* sp.) é uma espécie que pertence à família Leguminosae, ocorre em diversos ambientes, e apresenta ampla distribuição na América Latina e África Ocidental. O óleo de copaíba é extraído do tronco da árvore. É constituído de uma mistura do óleo com uma porção resinosa não volátil sendo quimicamente composto por ácidos diterpênicos e sesquiterpenos. Suas aplicações são inúmeras e dentre elas destaca-se a ação antimicrobiana, devido à presença de vários constituintes químicos voláteis e resinosos em sua composição (SALGUEIRO; TYIO, 2016).

*Mauritia flexuosa* L. f., pertencente à família Arecaceae é uma espécie popularmente conhecida como “buriti”. Esta espécie é encontrada em toda a América do Sul, onde no

Brasil, apresenta ampla distribuição nos estados do Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pará, Piauí e Tocantins (CANUDO et al., 2010). O fruto do buriti apresenta uma superfície revestida com escamas brilhantes, de polpa amarelada e uma noz dura e espessa. É possível extrair aproximadamente 22% de óleo da polpa do fruto, sendo seus principais constituintes o ácido oleico (76,7%), palmítico (18,7%), esteárico (1,5%), linoleico (1,5%), linolênico (0,7%) e araquídico (0,5%) (LIMA et al., 2017). No geral, esses compostos apresentam várias ações biológicas, principalmente antimicrobiana (NONATO et al., 2018), definida pela ação isolada ou sinérgica das moléculas (SILVA et al., 2018).

*Astrocaryum* sp., pertencente à família Arecaceae é conhecida popularmente como murumuru. Apresenta distribuição em todos os estados da Amazônia Legal (CRUZ et al., 2017). Essa espécie recebe destaque por ser amplamente utilizada pelas populações tradicionais devido as propriedades fibrosas de suas folhas, estirpe e seu palmito (PIRES; GRISOTTO; GRISOTTO, 2017). O óleo extraído da semente é caracterizado principalmente pela presença de ácidos graxos, destacando-se os ácidos láurico (48,6%), mirístico (30,0%), palmítico (6,8%), oleico (6,7%), linoleico (3,0%), esteárico (2,5%), cáprico (1,1%), caprílico (1,0%) (LIMA et al., 2017).

O patauá (*Oenocarpus bataua*) pertence à família Arecaceae, apresenta distribuição pela Amazônia e norte da América do Sul. O mesocarpo é comestível e contém óleo de alta qualidade (RODRIGUES; DARNET; SILVA, 2010). Os componentes majoritários do óleo de patauá são os ácidos oleico (77,7%) e palmítico (13,2%), com aproximadamente 90% do conteúdo total dos componentes presentes. Outros componentes em quantidades inferiores são os ácidos esteárico (3,6%), linoleico (2,7%), palmitoleico (0,6%) e linolênico (0,6%) (MONTÚFAR et al., 2010).

### 2.3 CARACTERÍSTICAS DOS ÓLEOS VEGETAIS E MECANISMOS DE CONTROLE FITOPATOGÊNICO

De acordo com Borges et al. (2018), os óleos vegetais contêm uma infinidade de substâncias bioativas, incluindo alcalóides, glicosídeos cianogênicos, glicosinolatos, lipídios, compostos fenólicos, terpenos, poliacetilenos e politienilos, que apresentam proteção contra insetos e organismos patogênicos. A atividade biológica e antioxidante de produtos vegetais tem sido atribuída à presença desses compostos, e sua composição química contribui para o controle de microrganismos, pois formam complexos com proteínas extracelulares e solúveis, causando ruptura de membranas microbianas e inibição enzimática (POHL; KOCK, THIBANE, 2011; NONATO et al., 2018; SOUSA et al., 2015).

O grau de insaturação das moléculas presentes nos óleos também é importante para a magnitude da atividade fungicida (NASCIMENTO et al., 2019). Em estudo em que investigou-se a ação de ácidos graxos sobre o crescimento micelial de *Alternaria solani*, *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium oxysporum* foram observadas diferentes graus de inibições, sugerindo-se maior eficiência de ácidos graxos saturados quando comparados a ácidos graxos insaturados (LIU et al., 2008). Em geral, a eficiência antifúngica dos ácidos graxos está associada ao aumento do comprimento da cadeia de carbono (SADOKAMDEM; VANNINI; GUERZONI, 2009), pois os ácidos graxos saturados são mais estáveis e lineares, com ausência de dupla ligação e, portanto, apresentam peroxidação lenta, conservando suas propriedades por mais tempo (LIU et al., 2014).

Outra característica relevante dos óleos vegetais é que são substâncias lipofílicas, pois permite a interação entre o óleo e os lipídeos da membrana celular, interferindo na permeabilidade, e causa alterações na estrutura fúngica (COSTA et al., 2011). Por serem lipofílicos, os óleos vegetais podem penetrar nas membranas até o interior das células, alterar a permeabilidade celular, causar o extravasamento dos constituintes celulares e a quebra das bombas de prótons, ocasionando redução na produção de ATP, o que resulta na morte celular fúngica (CALO et al., 2015).

## 2.4 APLICABILIDADE DE ÓLEOS VEGETAIS CONTRA FITOPATÓGENOS

A utilização de produtos vegetais é considerada uma alternativa promissora para o controle de doenças causadas por fungos patogênicos. Trabalhos com óleos vegetais sugerem o seu amplo espectro no controle de bactérias (SILVA; MARTINS; ALVES, 2014), vírus (DERKSEN et al., 2016) e fungos fitopatogênicos (OLIVEIRA et al., 2018). A inibição do crescimento micelial de fungos pelos óleos vegetais pode ser tanto por sua ação direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de resistência do hospedeiro (BRUM et al., 2017).

Trabalhos com óleos e extratos vegetais de plantas indicam o seu potencial no controle de alguns fitopatógenos por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e/ou a germinação de esporos (Tabela 1).

De acordo com Abreu et al. (2014), a utilização de óleos vegetais tem se mostrado promissora no controle de fitopatógenos. Os autores avaliaram o efeito dos óleos de murmuru (*Astrocaryum ulei* Mart.) e açai (*Euterpe oleracea* Mart.) nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 30  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  de meio de cultura, e observaram redução no índice de crescimento micelial de *Fusarium solani* em função do aumento da dose dos óleos utilizados.

Tabela 1. Trabalhos desenvolvidos na Amazônia Ocidental com óleos de espécies vegetais nativas no controle de fitopatógenos

Óleo / Extrato vegetal	Espécie Vegetal	Fitopatógeno	Modo de ação	Referência
Açaí	<i>Euterpe oleracea</i>	<i>Fusarium solani</i>	Crescimento micelial	Abreu et al., 2014
		<i>Aspergillus flavus</i>		
Andiroba	<i>Carapa guianensis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Crescimento micelial Germinação de conídios	Nascimento et al., 2019
		<i>Fusarium oxysporum</i>		
		<i>Colletotrichum sp.</i>	Crescimento micelial	Lima et al., 2019
Buriti	<i>Mauritia flexuosa</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Crescimento micelial	Ferreira et al., 2012a
Copaíba	<i>Copaifera sp.</i>	<i>Colletotrichum sp.</i>	Crescimento micelial	Lima et al., 2019
Murumuru	<i>Astrocaryum sp.</i>	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Crescimento micelial	Nascimento et al., 2014
Patauí	<i>Oenocarpus bataua</i>	<i>Fusarium solani</i>	Crescimento micelial	Ferreira et al., 2012b

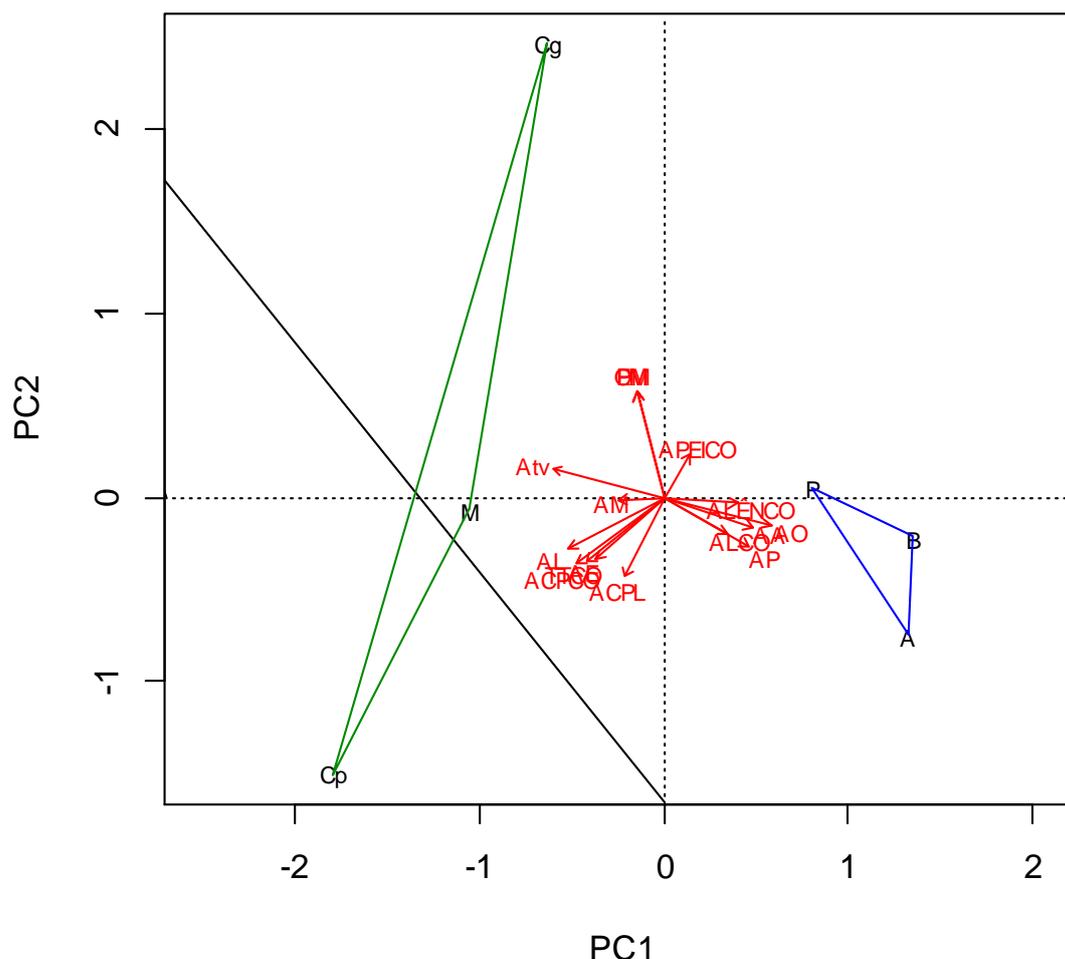
Nascimento et al. (2019) avaliando a atividade antifúngica de andiroba (*C. guianensis*) que ocorre na Amazônia, observaram que a concentração de 125  $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$  foi eficiente para inibir o crescimento micelial e a germinação de conídios de *Aspergillus flavus*, *A. niger* e *Fusarium oxysporum*. Já Lima et al. (2019), avaliando a ação dos óleos de andiroba, copaíba e murumuru sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum sp.*, verificaram efeito fungitóxico na concentração de 50  $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ , retardando o crescimento micelial do fitopatógeno com a utilização do óleo de copaíba em percentuais superiores a 50%.

Quanto a utilização do óleo de buriti, Ferreira et al. (2012a) observaram efeito fungitóxico com a concentração mínima de 15  $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$  sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. Para o óleo de murumuru, Nascimento et al. (2014) verificaram efeito inibidor sobre o crescimento micelial de *Mycosphaerella fijiensis* em todas as concentrações do óleo, porém o óleo de *Mauritia flexuosa* não apresentou ação fungitóxica contra o fitopatógeno, sugerindo que os óleos apresentam diferenças em função do tipo de óleo, concentração utilizada e espécie de fungo em estudo. Ferreira et al. (2012b) avaliando o efeito dos óleos de buriti, murumuru e patuá sobre o crescimento micelial de

*Fusarium solani*, não constatarem efetiva ação fungitóxica, porém na concentração de 50  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  apenas o óleo de patauá (*Oenocarpus bataua*) retardou em 10% o crescimento micelial do fungo em relação à testemunha.

Após Análise dos Componentes Principais (PCA) considerando os óleos vegetais de açaí, andiroba, buriti, copaíba, murumuru e patauá, o percentual de seus constituintes químicos majoritários encontrados na literatura e respectivos graus de inibição fúngica para as espécies descritas na tabela 1, verificou-se a formação de grupos com maior atividade antifúngica para os óleos de murumuru, andiroba (*C. guianensis*) e copaíba (Figura 1). O nível de explicação das coordenadas principais para variação do conjunto de dados utilizados foi de 64%. Para este grupo se destacam os constituintes químicos: ácidos estearico, mirístico, láurico, cáprico, caprílico, mítico, tetradecanoico, estereato de metila, palmitato de metila e oleato de metila. Por outro lado, os óleos vegetais de açaí, buriti e patauá apresentaram menor efeito fungitóxico, com destaque para esses óleos os percentuais de ácido linolênico, araquídico, linoleico e palmítico.

A análise conjunta dos dados fortalece a hipótese de que óleos obtidos de plantas apresentam efeito fungitóxico, e sua composição química e o percentual dos componentes é um fator relevante para explicar seus efeitos biológicos. Assim, a utilização de produtos vegetais de espécies que apresentam amplo espectro de utilização como *E. oleracea*, *C. guianensis*, *M. flexuosa*, *Copaifera* sp., *Astrocaryum* sp. e *O. bataua*, bem como a caracterização e determinação da atividade biológica das moléculas que compõem o óleo poderão contribuir para maiores esclarecimentos sobre possíveis formas de utilização como método de controle alternativo de doenças de plantas.



**Figura 1.** Análise dos Componentes Principais (PCA) considerando os óleos de açai, andiroba, buriti, copaíba e murumuru e seus constituintes químicos.

A: Açai (*Euterpe oleracea*); B: Buriti (*Mauritia flexuosa*); Cg: Andiroba (*Carapa guianensis*); Cp: Copaíba (*Copaifera* sp.); M: Murumuru (*Astrocaryum* sp.); AA: Ácido araquidônico; ACPCO: Ácido cáprico; ACPL: Ácido caprílico; AE: Ácido esteárico; AL: Ácido láurico; ALCO: Ácido linoleico; ALÊNCO: Ácido linolênico; AM: Ácido mirístico; AO: Ácido oleico; AP: Ácido palmítico; APEICO: Ácido palmitoleico; Atv: Atividade antifúngica; EM: Estearato de metila; OM: Oleato de metila; PM: Palmitato de metila; TTCO: Ácido tetradecanoico. Polígono verde: óleos das espécies vegetais com maior eficiência no controle do crescimento fúngico. Polígono azul: óleos das espécies vegetais com menor eficiência no controle do crescimento fúngico.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diversidade vegetal amazônica apresenta espécies capazes de sintetizarem compostos com diversas utilidades para indústrias farmacêutica, agrícola e de base biotecnológica. Provavelmente, a síntese natural de substâncias inéditas se deva a interação genótipos versus ambiente, fato que implica estímulos ao metabolismo primário e ou secundário que resultam na produção de moléculas com características químicas, físicas e biológicas diferenciadas. Considerando esta riqueza em potencial, sugere-se que esses

recursos genéticos devam ser investigados a luz das modernas plataformas tecnológicas para serem aproveitadas em benefício da sociedade. Pesquisas elaboradas na Amazônia Ocidental com óleos de algumas espécies vegetais como *E. oleracea*, *C. guianensis*, *M. flexuosa*, *Copaifera* sp., *Astrocaryum* sp., *O. bataua* comprovaram a eficiência no controle *in vitro* de fungos fitopatogênicos de interesse agrícola como *F. solani*, *A. flavus*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *C. gloeosporioides*, *M. fijiensis* e *F. solani*. Estes resultados demonstram que os primeiros passos em direção a produtos de base natural para o controle fitossanitário têm sido perseguidos. No entanto, pesquisas em campo devem ser elaboradas para testar e ratificar a efetividade desses óleos *in situ*, contribuindo para descoberta de produtos de base biológica no controle de fungos fitopatogênicos.

## 5. REFERÊNCIAS

ABREU, M. G. P.; FERREIRA, J. B.; ARAUJO, M. L.; NEVES, Y. Y. B.; ARAUJO, J. M. de. Efeito dos óleos de palmeiras da Amazônia sobre o desenvolvimento de *Fusarium solani*. **Enciclopedia Biosfera.**, v. 10, n. 19, p. 890–896, 2014.

ALMEIDA, N. A. Óleos essenciais e desenvolvimento sustentável na Amazônia: uma aplicação da matriz de importância e desempenho. **Reflexões Econômicas.**, v. 2, n. 2, p. 136-158, 2016.

BATISTA, C. D. C. R.; OLIVEIRA, M. S.; ARAÚJO, M. E.; RODRIGUES, A. M.; BOTELHO, J. R. S.; SOUZA FILHO, A. P. S., MACHADO, NÉLIO T.; JUNIOR, R. N. C. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of açai (*Euterpe oleracea*) berry oil: Global yield, fatty acids, allelopathic activities, and determination of phenolic and anthocyanins total compounds in the residual pulp. **The Journal of Supercritical Fluids.**, v. 107, n. 1, p. 364-369, 2016.

BORGES, D. F.; LOPES, E. A.; MORAES, A. R. F.; SOARES, M. S.; VISÔTTO, L. E.; OLIVEIRA, C. R.; VALENTE, V. M. M. Formulation of botanicals for the control of plant-pathogens: A review. **Crop protection.**, v. 110, n. 1, p. 135-140, 2018.

BRUM, R. B. C. S.; DE CASTRO, H. G.; CARDON, C. H.; PEREIRA, A. S.; CARDOSO, D. P.; DOS SANTOS, G. R. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre fungos fitopatogênicos. **Magistra.**, v. 26, n. 3, p. 361-371, 2017.

CABRAL, E. C.; CRUZ, G. F.; SIMAS, R. C.; SANVIDO, G. B.; GONÇALVES, L. D. V.; LEAL, R. V.; SILVA, R. C. F.; SILVA, J. C. T.; BARATA, L. E. S.; CUNHA, V. S.; FRANÇA, L. F.; DARODA, R. J.; AS, G. F.; EBERLIN, M. N. Typification and quality control of the Andiroba (*Carapa guianensis*) oil via mass spectrometry fingerprinting. **Analytical Methods.**, v. 5, n. 6, p. 1385-1391, 2013.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems – a review. **Food Control.**, v. 54, n. 1, p. 111-119, 2015.

CANUDO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura.**, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, 2010.

COSTA, A. R. T.; AMARAL, M. F. Z. J.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. A. M.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.**, v. 13, n. 2, p. 240–245, 2011.

CRUZ, G. S.; GAMA, J. R. V.; RIBEIRO, R. B. S.; SANTOS, L. E., MELO, L. O.; COELHO, A. A. Estrutura e valoração de *Astrocaryum murumuru* Mart. na região do estuário amazônico. **Nativa.**, v. 5, esp., p. 581-587, 2017.

DEMBÉLÉ, U.; LYKKE, A. M.; KONÉ, Y.; TÉMÉ, B.; KOUYATÉ, A. M. Use-value and importance of socio-cultural knowledge on *Carapa procera* trees in the Sudanian zone in Mali. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.**, v. 11, n. 1, p. 14, 2015.

DERKSEN, A.; KÜHN, J.; HAFEZI, W.; SENDKER, J.; EHRHARDT, C.; LUDWIG, S.; HENSEL, A. Antiviral activity of hydroalcoholic extract from *Eupatorium perfoliatum* L. against the attachment of influenza A vírus. **Journal of Ethnopharmacol.**, v. 188, n. 1, p. 144-152, 2016.

FERREIRA, J. B.; NASCIMENTO, G. D. O.; NEVES, Y.; GOMES, F.; NASCIMENTO, L. D. O. Efeito da temperatura e óleos essenciais sobre o crescimento micelial de *Fusarium solani* isolado de mudas de *Euterpe oleracea* Mart (açai). **Enciclopédia Biosfera.**, v. 8, n. 14, p. 453-465, 2012b.

FERREIRA, J. B.; NEVES, Y. Y. B.; NASCIMENTO, G. D. O.; FIGUEIREDO, A. D.; VENTURIN, N. Óleos essenciais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em palmáceas. **Enciclopédia Biosfera.**, v. 8, n. 14, p. 751-760, 2012a.

FERREIRA, L. S.; SANTOS, M. R. P.; FIGUEIRA, L. C.; NAGATA, K. M. R.; REMÉDIOS, C. M. R., SOUSA, F. F. Caracterização de óleos vegetais da Amazônia por espectroscopia de absorção. **Scientia Plena.**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2017.

FUNASAKI, M.; BARROSO, H. D. S.; FERNANDES, V. L. A.; MENEZES, I. S. Amazon rainforest cosmetics: Chemical approach for quality control. **Química Nova.**, v. 39, n. 2, p. 194-209, 2016.

LIMA, A. F. B.; NASCIMENTO, L. O.; NASCIMENTO, G. O.; SOUZA, R. L.; FERREIRA, J. B.; ALVES, W. F.; NASCIMENTO, F. I. O.; ORTEGA, G. P. Use of vegetable oils in the control of *Colletotrichum* sp. in banana fruits. **African Journal of Agricultural Research.**, v. 14, n. 6, p. 287-293, 2019.

LIMA, R. P.; LUZ, P. T. S.; BRAGA, M.; BATISTA, P. R. S.; COSTA, C. E. F.; ZAMIAN, J. R.; NASCIMENTO, L. A. S.; ROCHA FILHO, G. N. Murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) butter and oils of buriti (*Mauritia flexuosa* Mart.) and pracaxi (*Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze) can be used for biodiesel production: Physico-chemical properties and thermal and kinetic studies. **Industrial Crops and Products.**, v. 97, n. 1, p. 536-544, 2017.

LIU, S.; RUAN, W.; LI, J.; XU, H.; WANG, J.; GAO, Y.; WANG, J. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. **Mycopathologia.**, v. 166, n. 2, p. 93-102, 2008.

LIU, X.; HAN, R.; WANG, Y.; LI, X.; ZHANG, M.; YAN, Y. Fungicidal activity of a medium-chain fatty acids mixture comprising caprylic, pelargonic and capric acids. **Plant Pathology Journal.**, v. 13, n. 1, p. 65-70, 2014.

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica.**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.

MONTÚFAR, R.; LAFFARGUE, A.; PINTAUD, J. C.; HAMON, S.; AVALLONE, S.; DUSSERT, S. *Oenocarpus bataua* Mart. (Arecaceae): Rediscovering a source of high oleic vegetable oil from Amazonia. **Journal of the American Oil Chemists' Society.**, v. 87, n. 2, p. 167-172, 2010.

NASCIMENTO, G. O.; FERREIRA, J. B.; NASCIMENTO, L. O.; ABREU, M. G. P.; SOUZA, R. B. Ação de óleos vegetais no controle de Sigatoka-Negra (*Mycosphaerella fijiensis* morelet) de bananeiras (*Musa* sp.), na região do Alto Juruá, Acre. **Enciclopédia Biosfera.**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19, p. 15-25, 2014.

NASCIMENTO, G. O.; SOUZA, D. P.; SANTOS, A. S.; BATISTA, J. F.; RATHINASABAPATHI, B.; GAGLIARDI, P. R.; GONÇALVES, J. F. C. Lipidomic profiles from seed oil of *Carapa guianensis* Aubl. and *Carapa vasquezii* Kenfack and implications for the control of phytopathogenic fungi. **Industrial Crops and Products.**, v. 129, n. 1, p. 67-73, 2019.

NASCIMENTO, R. J. S.; COURI, S.; ANTONIASSI, R.; FREITA, S. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura.**, v. 30, n. 2, p. 498-502, 2008.

NEWTON, P.; WATKINSON, A. R.; PERES, C. A. Determinants of yield in a non-timber forest product: Copaifera oleoresin in Amazonian extractive reserves. **Forest Ecology and Management.**, v. 261, n. 2, p. 255-264, 2011.

NONATO, C. D. F. A.; LEITE, D. O. D.; PEREIRA, R. C.; BOLIGON, A. A.; RIBEIRO-FILHO, J.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M. Chemical analysis and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of fruit fractions of *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae). **PeerJ.**, v. 6, n. 1, p. e5991, 2018.

OLIVEIRA, S. S.; OLIVEIRA, S. S.; FERREIRA, J. B.; NASCIMENTO, G. O.; ALVES, W. F. Efeito da temperatura e extratos de plantas no controle da antracnose do fruto da bananeira (*Musa* sp.) causada por *Colletotrichum musae*. **Enciclopédia Biosfera.**, v. 15, n. 28, p. 451-460, 2018.

PIRES, L. K. S.; GRISOTTO, M. G.; GRISOTTO, R. F. O uso de plantas da Amazônia na produção de bioprodutos para tratamentos de pele. **Revista de Investigação Biomédica.**, v. 9, n. 1, p. 78-88, 2017.

POHL, C. H.; KOCK, J. L. F.; THIBANE, V. S. Antifungal free fatty acids: a review. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.**, v. 3, n. 1, p. 61-71, 2011.

RODRIGUES, A. M.; DARNET, S.; SILVA, L. H. Fatty acid profiles and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*), patawa (*Oenocarpus bataua*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*), mari (*Poraqueiba paraensis*) and inaja (*Maximiliana maripa*) fruits. **Journal of the Brazilian Chemical Society.**, v. 21, n. 10, p. 2000-2004, 2010.

RUFINO, C. P. B.; DE ARAÚJO, C. S.; NOGUEIRA, S. R. Desafios na utilização do controle biológico de doenças de plantas na Amazônia. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological.**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2018.

SADO-KAMDEM, S. L.; VANNINI, L.; GUERZONI, M. E. Efeito do ácido  $\alpha$ -linolênico, cáprico e láurico na biossíntese de ácidos graxos em *Staphylococcus aureus*. **Revista Internacional de Microbiologia Alimentar.**, v. 129, n. 3, p. 288-294, 2009.

SALGUEIRO, M. B. S.; TYIO, R. Óleo de copaíba: aspectos gerais e suas aplicações. **Revista Uningá Review.**, v. 27, n. 2, p. 42-47, 2016.

SANTOS, R. S.; FERREIRA, M. C. Estudo etnobotânico de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) em comunidades ribeirinhas do Município de Abaetetuba, Pará, Brasil. **Acta Amazônica.**, v. 42, n. 1, p. 1-10, 2012.

SILVA, B. J. M.; HAGE, A. A. P.; SILVA, E. O.; RODRIGUES, A. P. D. Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review. **Journal of Integrative Medicine.**, v. 16, n. 6, p. 211-222, 2018.

SILVA, E. O.; MARTINS, S. J.; ALVES, E. Essential oils for the control of bacterial speck in tomato crop. **African Journal of Agricultural Research.**, v. 9, n. 34, p. 2624- 2629, 2014.

SOUSA, E. O.; MIRANDA, C. M.; NOBRE, C. B.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; COSTA, J. G. Phytochemical analysis and antioxidant activities of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis* extracts. **Industrial Crops and Products.**, v. 70, n. 1, p. 7-15, 2015.

TER STEEGE, H.; VAESSEN, R. W.; CÁRDENAS-LÓPEZ, D.; SABATIER, D.; ANTONELLI, A.; DE OLIVEIRA, S. M.; PITMAN, N.; JØRGENSEN, P. M.; SALOMÃO, R. P.; SALOMÃO, R. P. The discovery of the Amazonian tree flora with an updated checklist of all known tree taxa. **Scientific Reports.**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2016.

## FATORES PRÓ-CICATRIZANTES E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS: UMA REVISÃO

Laura Nadyne da Silva Silvestre<sup>1</sup> \*, Hémilly Caroline da Silva Paixão<sup>1</sup>, Sérgio Luiz Prolo Júnior<sup>1</sup> e Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti<sup>1</sup>

1. Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

### RESUMO

Desde a antiguidade, o homem utiliza plantas e extratos vegetais com o propósito de estancar hemorragia, proteger contra infecção e para a cicatrização de feridas. Atualmente, há o predomínio de substâncias sintéticas para a cobertura de lesões, porém, observa-se interesse crescente por alternativas naturais que alcancem o mesmo propósito. Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura dos principais fatores pró-cicatrizantes de feridas tratadas com plantas medicinais. Realizou-se uma revisão de literatura nas bases Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e National Institute of Health (PUBMED), utilizando os descritores “Medicinal plants” AND “Wound healing”. Foram selecionados um total de 39 artigos, os quais foram organizados em um quadro de resumo descritivo, apresentando informações pertinentes dos trabalhos. Observou-se que o principal fator pró-cicatrizante presente no tratamento com plantas medicinais é a atividade anti-inflamatória, a qual está diretamente relacionada com ação antibacteriana e antioxidante.

**Palavras-chave:** Extratos vegetais, cicatrização e anti-inflamatório.

### ABSTRACT

Since ancient times man has used plants and vegetal extracts for the purpose of stopping bleeding, protecting against infection and wound healing. Currently, there is the predominance of synthetic substances to cover lesions, however, there is increasing interest in natural alternatives that achieve the same purpose. Thus, the present study aimed to perform a literature review of the main pro-healing factors of wounds treated with medicinal plants. A review of the literature was conducted in the Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Virtual Health Library (VHL) and National Institute of Health (PUBMED) databases, using the descriptors "Medicinal plants" AND "Wound healing". A total of 39 articles were selected, which were organized in a descriptive summary table, presenting pertinent information of the works. It was observed that the main pro-healing factor present in the treatment with medicinal plants is the anti-inflammatory activity, which is directly related to antibacterial and antioxidant action.

**Key words:** Plant extracts, healing e anti-inflammatory.

## 1. INTRODUÇÃO

As feridas são uma interrupção da continuidade dos tecidos da pele e podem ser causadas por estímulos físicos, químicos ou biológicos que desencadeiam de imediato uma série de respostas fisiológicas (CAPELLA et al., 2016). O processo de cicatrização de lesões cutâneas consiste em uma cascata de eventos celulares e moleculares que interagem em eventos bioquímicos e fisiológicos para que ocorra a reparação tecidual (VITORINO-FILHO et al., 2007). Trata-se de um processo que envolve fases interdependentes que se sobrepõem de forma contínua e temporal, as quais podem ser definidas como: inflamatória, proliferativa e de remodelagem (SARMENTO et al., 2014).

As lesões de pele são recorrentes causadoras de incapacidade, dor e alterações psicossociais. Logo, reforça-se a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas e coberturas para favorecer e acelerar o processo de cicatrização (LIEDKE; JOHANN; DANSKI, 2014).

Desde a antiguidade, observa-se grande preocupação do homem em manter a sua integridade física, através do tratamento de feridas e utilização de plantas e extratos vegetais, com o propósito de estancar a hemorragia, proteger contra infecção e favorecer o processo de cicatrização (PIRIZ et al., 2015).

O uso popular de plantas medicinais é recorrente no Brasil, sendo aplicado com diversas finalidades clínicas por se tratarem de elementos naturais, de baixo custo e de fácil acesso à população (CAPELLA et al., 2016). Embora haja o predomínio de substâncias sintéticas para o tratamento de feridas, observa-se crescente interesse por alternativas naturalistas que promovam a cicatrização das lesões e incentivo na busca de recursos mais simples, eficientes, de fácil aplicabilidade e oriundos de matérias-primas encontradas em regiões menos desenvolvidas (VITORINO-FILHO et al., 2007; SARMENTO et al., 2014).

Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura dos principais fatores pró-cicatrizantes de feridas tratadas com plantas medicinais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo trata-se de uma revisão da literatura, baseada em Galvão e Pereira (2014), seguindo os seguintes passos:

a) Elaboração da pergunta de pesquisa: Quais os principais fatores pró-cicatrizantes envolvidos no processo fisiológico de cicatrização de feridas tratadas com plantas medicinais?

b) Busca na literatura: Foram pesquisados artigos científicos nas bases: Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e National Institute of Health (PUBMED), utilizando os descritores previamente consultados no DECS (Descritores em Ciências da Saúde): “Medicinal plants” AND “Wound healing”. Foram incluídos no estudo, artigos redigidos nos idiomas inglês, português e espanhol e que atendessem aos seguintes filtros: texto completo disponível, assunto principal (cicatrização; extratos vegetais; plantas medicinais) e ano de publicação (2010 a junho de 2018). A quantidade de artigos encontrados na busca nas bases SCIELO, BVS e PUBMED, foram respectivamente 73, 220 e 147, totalizando, 440 artigos.

c) Seleção dos artigos: Essa seleção foi realizada por três pesquisadores, sendo que os artigos rejeitados por dois ou três destes, foram excluídos da revisão. Os critérios para exclusão foram artigos duplicados (encontrados em mais de uma base de busca), fora do objetivo da pesquisa, baixa qualidade metodológica e quando apresentaram resultados negativos para potencial cicatrizante.

d) Extração dos dados: Após a avaliação dos artigos foram selecionados um total de 39 trabalhos, conforme descrito no quadro 1, os quais foram utilizados nos resultados do presente estudo. Além dos artigos selecionados, também foram utilizados outros trabalhos para elaboração da introdução e enriquecimento da discussão deste artigo.

Quadro 1. Quantidade de artigos selecionados na busca da literatura

Artigos	SCIELO	BVS	PUBMED	Total
Total encontrado	73	220	147	440
Selecionados	4	22	13	39

e) Síntese dos dados: Os dados foram organizados em quadros e descritos no texto de acordo com o seu potencial cicatrizante.

f) Redação e discussão dos resultados: A descrição e discussão dos dados, estão no tópico 3 e 4 do presente trabalho.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, no quadro 2, apresenta-se o resumo descritivo dos estudos que atenderam aos critérios e que foram selecionados pelos pesquisadores. Estes artigos foram desenvolvidos em vários países nos últimos 8 anos e apresentaram como objetivo geral avaliar a atividade cicatrizante de plantas medicinais, utilizadas popularmente, por meio de estudos experimentais e clínicos.

Constatou-se que as espécies da família Asteraceae, com 12 citações dentre os artigos científicos encontrados, foram nesta pesquisa as plantas medicinais com a maior quantidade de estudos publicados com potencial terapêutico anti-inflamatório. As espécies da família Fabaceae aparece em seguida com 5 diferentes plantas estudadas devido sua capacidade anti-inflamatória e antibacteriana. Tal aplicabilidade pode ser explicada pela presença de metabólitos secundários como os terpenos e flavonóides que atuam reforçando a ação cicatrizante de feridas (MAVER et al., 2015).

Analisando os dados encontrados na presente revisão, percebe-se que a maioria dos estudos realizados nesta linha de pesquisa são de caráter experimental, por meio de animais, geralmente ratos *wistar* através da indução de lesões cutâneas na região dorsal, havendo poucos relatos de ensaios clínicos randomizados. Em relação aos fatores pró-cicatrizantes, nota-se que o mais frequente é a atividade anti-inflamatória, a qual está diretamente relacionada com ação antibacteriana e antioxidante.

O processo de cicatrização de feridas é composto por três fases: inflamação, proliferação e remodelação, as quais irão proporcionar características específicas para as lesões. A aplicabilidade de agentes que visam contribuir com o processo de reparação tecidual necessita ser direcionado especificamente para uma destas fases, favorecendo o processo fisiológico desenvolvido pelo organismo (AKKOL et al., 2012).

**Quadro 2. Plantas medicinais utilizadas para a cicatrização de feridas.**

Família	Espécie	Forma farmacêutica	Tipo de estudo	Possíveis fatores pró-cicatrizantes	Referências
Amaranthaceae	<i>Pflaffia glomerata</i>	Extrato hidroalcoólico.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória.	SILVA et al., 2010
Asphodelaceae	<i>Bulbine frutescens</i>	Gel fresco das folhas maduras.	<i>In vivo</i> , em porcos domésticos com feridas de controle espelhado.	Atividade anti-inflamatória e síntese de colágeno.	PATHER; VILJOENB; KRAMER, 2011
	<i>Bulbine natalensis</i>	Gel fresco das folhas maduras.	<i>In vivo</i> , em porcos domésticos com feridas de controle espelhado.	Atividade anti-inflamatória e síntese de colágeno.	PATHER; VILJOENB; KRAMER, 2011
Pinaceae	<i>Pinus caribaea</i> var. <i>caribaea</i>	Pasta de clorofilacaroteno.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Não elucidado.	DORVIGNY et al., 2011
	<i>Pinus pinea</i> L.	Pomada do óleo essencial.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória.	SÜNTAR et al., 2012
	<i>Pinus halepensis</i> Mill.	Pomada do óleo essencial.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória.	SÜNTAR et al., 2012
Punicaceae	<i>Punica granatum</i>	Pomada do extrato etanólico da flor.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de queimaduras cutâneas.	Não elucidado.	PIRBALOUTI; AZIZI KOOHPAYEH, 2012.
Rosaceae	<i>Amygdalus communis</i> <i>Oriente medio</i>	Pomada do extrato etanólico da folha.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de queimaduras cutâneas.	Não elucidado.	PIRBALOUTI; AZIZI KOOHPAYEH, 2012.
	<i>Rubus imperialis</i>	Extrato bruto metanólico obtido de partes aéreas (folhas e galhos).	<i>In vivo e in vitro</i> , o efeito cicatrizante foi avaliado em lesões cirúrgicas na pele de camundongos.	Atividade anti-inflamatória e aumento na produção de fibroblastos e óxido nítrico.	TONIN et al., 2016
Ranunculaceae	<i>Ranunculus pedatus</i>	Extrato metanólico, aquoso, <i>n</i> -hexânico, éter dietílico e acetato de etila.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória.	AKKOL et al., 2012
Ranunculaceae	<i>Ranunculus constantinopolitanus</i>	Extrato metanólico, aquoso, <i>n</i> -hexânico, éter dietílico e acetato de etila.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória.	AKKOL et al., 2012
Campanulaceae	<i>Michauxia campanuloides</i>	Pomada do extrato metanólico da raiz e erva.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e antioxidante.	GÜVENÇ et al., 2012
	<i>Michauxia laevigata</i> asia	Pomada do extrato metanólico da raiz e erva.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e antioxidante.	GÜVENÇ et al., 2012
	<i>Michauxia tchinatchewii</i>	Pomada do extrato metanólico da raiz e erva.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e antioxidante.	GÜVENÇ et al., 2012
	<i>Michauxia thyrsoidea</i>	Pomada do extrato metanólico da raiz e erva.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e antioxidante.	GÜVENÇ et al., 2012
	<i>Michauxia nuda</i>	Pomada do extrato metanólico da raiz e erva.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e antioxidante.	GÜVENÇ et al., 2012
Fabaceae e Scrophulariaceae	<i>Astragali Radix</i> e <i>Rehmanniae Radix</i>	Extrato aquoso das ervas combinadas.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos diabéticos para o modelo experimental de úlceras cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e proliferação de fibroblastos.	LAU et al., 2012
	<i>Cenostigma macrophyllum</i> Tul.	Emulsão óleo em água.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos diabéticos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e aumento na produção de fibroblastos e óxido nítrico.	COELHO et al., 2013

Família	Espécie	Forma farmacêutica	Tipo de estudo	Possíveis fatores pró-cicatrizantes	Referências
Fabaceae	<i>Albizia lebbek</i>	Extrato etanólico da raiz.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade antibacteriana e antioxidante.	JOSHI et al., 2013
	<i>Caesalpinia mimosoides</i> Lam.	Extrato aquoso e etanólico do broto e folhas.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante.	BHAT et al., 2016
	<i>Stryphnodendron stringens</i>	Gel a 1% do extrato bruto da casca.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos diabéticos para o modelo experimental de úlceras cutâneas.	Aumento da produção das fibras de colágeno.	PINTO et al., 2015
	<i>Parkia biglobosa</i>	Extrato aquoso e etanólico da casca do tronco.	<i>In vitro</i> , utilizando ensaios de cicatrização de feridas.	Atividade antioxidante e antibacteriana.	ADETUTU; MORGANA CORCORANA, 2011
Scrophulariaceae	<i>Scrophularia deserti</i>	Pomada do extrato etanólico do caule.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de queimaduras cutâneas.	Não elucidado.	PIRBALOUTI; AZIZI KOOHPAYEH, 2012.
	<i>Bacopa monnieri</i>	Extrato metanólico e o seu constituinte isolado, Bacoside-A.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e aumento da reticulação de fibras de colágeno.	PIRBALOUTI; AZIZI KOOHPAYEH, 2012.
Equisetaceae	<i>Equisetum pyramidale</i>	Extrato etanólico e pomada das partes superiores.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos diabéticos para o modelo experimental de úlceras cutâneas.	Atividade anti-inflamatória.	CORRÊA et al., 2013
Amaranthaceae	<i>Pupalia lappacea</i>	Extrato metanólico da folha.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas contaminadas.	Atividade antibacteriana.	UDEGBUNAM et al., 2014
Euphorbiaceae	<i>Mallotus philippinensis</i> Muell. Arg	Extrato dos pelos glandulares do fruto.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade antioxidante a aumento da síntese de colágeno.	GANGWAR et al., 2015
	<i>Sebastiania hispidia</i> (Mart.) Pax	Pomada do extrato metanólico das folhas.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória, aumento da síntese de colágeno e angiogênese.	RIZZI et al., 2017
	<i>Acalypha wilkesiana</i>	Extrato aquoso e etanólico das folhas	<i>In vitro</i> . utilizando as nove plantas mais comuns, citadas pelos curandeiros tradicionais da região, que foram identificadas e testadas em ensaios de cicatrização de feridas.	Atividade antioxidante e antibacteriana	ADETUTU; MORGANA CORCORANA, 2011
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita pepo</i> L.	Óleo da semente.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante.	BARDAA et al., 2016
Blechnaceae	<i>Blechnum orientale</i> Linn.	Hidrogel com base de tanino.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos diabéticos para o modelo experimental de úlceras cutâneas.	Atividade antibacteriana e antioxidante.	LAI et al., 2016
Boraginaceae	<i>Arnebia euchroma</i>	Pomada do extrato de ervas e raízes.	Ensaio clínico randomizado com tratamento de pacientes com queimadura de segundo grau.	Atividade antibacteriana e anti-inflamatória.	NASIRI et al., 2016
Apiaceae	<i>Centella asiatica</i>	Spray do extrato de partes inteiras da planta.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Não elucidado.	SAWATDEE et al., 2016
Elatinaceae	<i>Bergia ammannioides</i>	Pomadas do extrato etanólico das partes aéreas fracionado em n-hexano, clorofórmio, acetato de etilo e n-butanol.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante.	EZZAT; CHOUCRY KANDIL, 2016
Anacardiaceae	<i>Pistacia lentiscus</i>	Óleo do fruto.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de queimaduras de segundo grau induzido por laser.	Atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante.	KHEDIR et al., 2017
Malvaceae	<i>Malva sylvestris</i>	Pomado do extrato etanólico da flor.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de queimaduras cutâneas.	Não elucidado.	PIRBALOUTI; AZIZI KOOHPAYEH, 2012.

Família	Espécie	Forma farmacêutica	Tipo de estudo	Possíveis fatores pró-cicatrizantes	Referências
Malvaceae	<i>Hibiscus micranthus</i>	Extrato metanólico da folha.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante.	BEGASHAW et al., 2017
	<i>Sida acuta</i>	Extrato aquoso e etanólico das folhas.	<i>In vitro</i> , utilizando as nove plantas mais comuns, citadas pelos curandeiros tradicionais da região, que foram identificadas e testadas em ensaios de cicatrização de feridas.	Atividade antioxidante e antibacteriana.	ADETUTU; MORGANA CORCORANA, 2011
Calophyllaceae	<i>Calophyllum inophyllum</i> Linn	Aplicação tópica de Calophyllolide isolado.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cirúrgicas.	Atividade anti-inflamatória.	NGUYEN et al., 2017
Loranthaceae	<i>Struthanthus vulgaris</i>	Pomada.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e aumento na produção de fibroblastos e óxido nítrico.	GRAMMA et al., 2016
Meliaceae	<i>Cinamomo</i>	Extrato aquoso e etanólico.	<i>In vitro</i> , plantas popularmente utilizadas para a cicatrização de feridas no Estado do Rio Grande do Sul.	Atividade anti-inflamatória, aumento na produção de fibroblastos e queratinócitos.	ALERICO et al., 2015
Nyctaginaceae	<i>Mirabilis jalapa</i> L.	Extrato aquoso e etanólico.	<i>In vitro</i> , plantas popularmente utilizadas para a cicatrização de feridas no Estado do Rio Grande do Sul.	Atividade anti-inflamatória, aumento na produção de fibroblastos e queratinócitos.	ALERICO et al., 2015
Asteraceae	<i>Macela</i>	Extrato aquoso e etanólico.	<i>In vitro</i> , plantas popularmente utilizadas para a cicatrização de feridas no Estado do Rio Grande do Sul.	Atividade anti-inflamatória, aumento na produção de fibroblastos e queratinócitos.	ALERICO et al., 2015
	<i>Camomila</i>	Extrato aquoso e etanólico.	<i>In vitro</i> , plantas popularmente utilizadas para a cicatrização de feridas no Estado do Rio Grande do Sul.	Atividade anti-inflamatória, aumento na produção de fibroblastos e queratinócitos.	ALERICO et al., 2015
	<i>Ageratina pichinchensis</i>	Extrato aquoso, fração acetato de etila e fração aquosa.	<i>In vitro</i> (efeito na proliferação celular) e <i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas	Atividade anti-inflamatória e proliferativa.	CERECERO et al., 2011
	<i>Ageratum conyzoides</i>	Extrato aquoso e etanólico das folhas.	<i>In vitro</i> . Utilizando as nove plantas mais comuns, citadas pelos curandeiros tradicionais da região, que foram identificadas e testadas em ensaios de cicatrização de feridas.	Atividade antioxidante e antibacteriana.	ADETUTU; MORGANA CORCORANA, 2011
	<i>Tridax procumbens</i>	Extrato aquoso e etanólico das folhas.	<i>In vitro</i> , utilizando as nove plantas mais comuns, citadas pelos curandeiros tradicionais da região, que foram identificadas e testadas em ensaios de cicatrização de feridas.	Atividade antioxidante e antibacteriana.	ADETUTU; MORGANA CORCORANA, 2011
	<i>Vernonia amygdalina</i>	Extrato aquoso e etanólico das folhas.	<i>In vitro</i> , utilizando as nove plantas mais comuns, citadas pelos curandeiros tradicionais da região, que foram identificadas e testadas em ensaios de cicatrização de feridas.	Atividade antioxidante e antibacteriana.	ADETUTU; MORGANA CORCORANA, 2011
	<i>Achillea kellalensis</i>	Extrato aquoso da flor.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e proliferativa.	PIRBALOUTI; KOOHPAYEH; KARIMI, 2010.
	<i>Centaurea sadleriana</i>	Extrato metanólico, aquoso e n-hexânico.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e proliferativa.	CSUPOR et al., 2010
	<i>Sonchus oleraceus</i> L	Extrato hidroalcoólico.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante.	PRICHOA; ROMAN MANFREDINI, 2011.
	<i>Siegesbeckia pubescens</i>	Extrato metanólico das partes aéreas.	<i>In vitro</i> para avaliação do crescimento dos fibroblastos e <i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Ativação de fibroblastos, efeito adstringente, antioxidante e antimicrobiano.	WANG et al., 2011

Família	Espécie	Forma farmacêutica	Tipo de estudo	Possíveis fatores pró-cicatrizantes	Referências
Convolvulaceae	<i>Argyreia speciosa</i>	Pomada simples, desenvolvida por inclusão de etanol, etanol-água e extrato aquoso	<i>In vivo</i> , utilizando camundongos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória, aumento na produção de fibroblastos e período de epitelização reduzido.	YADAV et al., 2014
Betulaceae	<i>Bétula</i>	Extrato de triterpeno da casca exterior de bétula	<i>In vivo</i> , em modelos de cicatrização de feridas em porcos.	Atividade anti-inflamatória, estímulo da migração de queratinócitos, supostamente aumentando a formação de actin filopodia, lamellipodia e fibras de stress.	EBELING et al., 2014
Lythraceae	<i>Punica Granatum</i>	Extrato etanólico da flor	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e proliferativa	PIRBALOUTI; KOOHPAYEH; KARIMI, 2010.

A primeira descrição do processo cicatricial de forma sequencial e organizada ocorreu em 1910 pelo biólogo francês Alexis Carrel que discriminou este fenômeno em quatro períodos (CARREL, 1910). Posteriormente, Clark com o intuito de oferecer uma elucidação mais didática deste processo o dividiu em três fases, que são utilizadas atualmente: fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e fase de maturação ou remodelagem (CLARK, 1985).

A fase inflamatória é a resposta imediata a uma lesão com período de duração entre 01 a 04 dias, onde ocorre a liberação de substâncias vasoconstritoras, ativação do sistema de coagulação sanguínea formada por colágeno, plaquetas e trombina e consequente resposta inflamatória que desencadeará a vasodilatação e a liberação de mediadores químicos. Nesta fase, poderá verificar-se a presença dos sinais cardinais: dor, edema, rubor, calor e possível perda de função (LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

A fase de proliferação tem duração de 5 a 20 dias e é caracterizada pela formação de novos vasos sanguíneos, síntese do colágeno pelos fibroblastos e a ação de citocinas sintetizadas pelos queratinócitos que atuarão estimulando a cicatrização da lesão (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A fase de remodelagem é a última deste processo e pode durar meses, onde ocorre uma deposição organizada de colágeno com intuito de melhorar a resistência tecidual e o aspecto cicatricial. Neste período verifica-se um equilíbrio entre a produção e a degradação do colágeno (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH., 2007).

A inflamação é essencial para a defesa local e sistêmica contra patógenos e a reparação tecidual após a lesão. Esta reconstituição da pele é determinada inicialmente por uma resposta inflamatória através de um intenso infiltrado de neutrófilos polimorfonucleares

e macrófagos. Essas células são estimuladas por prostaglandinas e produzem mediadores inflamatórios e prostaglandinas que irão estimular a remodelação da matriz extracelular (AKKOL et al., 2012). No entanto, exagerado mecanismo inflamatório podem comprometer o processo de regeneração tecidual, especialmente onde há deiscência de tecido mole ou exposição à membrana celular (CHAUSHU et al., 2015)

Um processo inflamatório controlado proporciona uma rápida cicatrização de feridas, através dos eventos de reepitelização, proliferação de queratinócitos e fibroblastos, deposição de matriz extracelular e angiogênese (CHAUSHU et al., 2015). Assim, a atividade anti-inflamatória é essencial para o favorecimento da reepitelização da lesão, em vista que o prolongamento da fase inflamatória proporciona o retardamento da cura (AKKOL et al., 2012).

Os extratos metanólicos de *Ranunculus Pedatus* e *Ranunculus constantinapolitanus* apresentaram uma resposta cicatrizante positiva nas feridas de ratos, assim como eficazes no ensaio de atividade anti-inflamatória. Estes fatos podem ser atribuídos aos flavonóides e terpenóides presentes nas partes aéreas da planta, fornecendo evidência científica para as características etnomedicinais turcas das referidas espécie (AKKOL et al., 2012).

Os pacientes com diabetes mellitus (DM) apresentam redução na permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo, alterando a reparação tecidual e formação de fibras de colágeno. A aplicação tópica da emulsão óleo-em-água de *Cenostigma macrophyllum Tul.* em uma ferida cirúrgica em ratos com DM induzido apresentaram redução no número de células inflamatórias e aumento da fibroplasia, demonstrando os efeitos positivos do extrato na cicatrização de feridas em ratos diabéticos (COELHO et al., 2013).

As feridas infectadas são caracterizadas pela presença de agente infeccioso local e com evidências de intensa resposta inflamatória e destruição dos tecidos. O tratamento destas lesões possui o objetivo de proporcionar condições ideais para que ocorra o processo fisiológico de cicatrização, em vista que a multiplicação bacteriana prolonga a fase inflamatória e proporciona uma cura tardia da lesão. Assim, a aplicação tópica de antimicrobianos pode proporcionar uma reepitelização mais rápida e diminuir a resposta inflamatória inicial (BHAT et al., 2016).

A aplicação tópica do extrato de *Caesalpinia mimosoides* proporcionou uma completa reepitelização da camada epidérmica em um curto espaço de tempo. Este fato pode estar associado com a capacidade antioxidante e propriedades antimicrobianas, reduzindo a fase inflamatória de cicatrização, através do sequestro de radicais livres. As espécies reativas de oxigênio produzidas no local da ferida atuam como mecanismo de

defesa contra patógenos, entretanto, quando excessiva leva ao estresse oxidativo causando uma cicatrização tardia da lesão (BHAT et al., 2016).

O extrato da folha de *Hibiscus micranthus* demonstrou atividade antibacteriana significativa para a maioria dos organismos testados, sendo mais eficiente para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Esta proteção da ferida contra patógenos proporciona a formação de um leito mais próximo ao estado natural e favorece a contração da ferida e epitelização em ratos através da migração de células epiteliais e ação dos miofibroblastos, os quais podem ser atribuídos também a propriedades antioxidantes (BAGASHAW, 2017).

## 4. CONCLUSÃO

Com base no exposto, percebe-se que o processo de cicatrização de feridas é um evento fisiológico complexo e que necessita de uma intervenção específica voltada para as fases de reconstituição tecidual. Os estudos a respeito da utilização de plantas medicinais como cobertura de lesão relatam que um dos fatores pró-cicatrizantes mais recorrentes é a atividade anti-inflamatória, a qual frequentemente está associada com a atuação antimicrobiana e antioxidativa.

## 5. REFERÊNCIAS

ADETUTU, A.; MORGANA, W. A.; CORCORANA, O. Ethnopharmacological survey and in vitro evaluation of wound-healing plants used in South-western Nigeria. **J. Ethnopharmacol.**, v. 137, n.3, p.50-56, 2011.

AKKOL, E. K.; SUNTAR, I.; ERDOGAN, T. F.; KELES, H.; GOENÇ, T. M.; KIVÇAK, B. Wound healing and anti-inflammatory properties of *Ranunculus pedatus* and *Ranunculus constantinopolitanus*: a comparative study. **J. Ethnopharmacol.**, v. 139, n.2, p.478-484, 2012.

ALERICO, G. C.; BECKENKAMP, A.; SILVA, M. V.; BUFFON, A.; VONPOSER, G. L. Proliferative effect of plants used for wound healing in Rio Grande do Sul state, Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v.176, n.[s.i.], p.305-310, 2015.

BARDA, S.; HALIMA, N. B.; ALOUI, F.; MANSOUR, R. B.; JABEUR, H.; BOUAZIZ, M. Oil from pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds: evaluation of its functional properties on wound healing in rats. **Lip. Heal. Deseas.**, v.15, n.73, p.1-12, 2016.

BAGASHAW, B.; MISHRA, B.; TSEGAW, A.; SHEWAMENE, A. Methanol leaves extract *Hibiscus micranthus* Linn exhibited antibacterial and wound healing activities. **BMC Complement. Altern. Med.**, v.17, n.337, p.1-11, 2017.

BHAT, P. B.; HEGDE, S.; UPADHYA, V.; HEGDE, G. R.; HABBU, P. V.; MULGUND, G. S. Evaluation of wound healing property of *Caesalpinia mimosoides* Lam **J. Ethnopharmacol.**, v.193, n. [s.i.], p.712-724, 2016.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K.; Cicatrização de Feridas. **Arq. Bras. Cir. Dig.**, v.20, n.1, p.51-58, 2007.

CAPELLA, S. O.; TILLMANN, M. T.; FÉLIX, A. O. C.; FONTOURA, E. G.; FERNANDES, C. G.; FREITAG, R. A.; SANTOS, M. A. Z.; FÉLIX, S. R.; NOBRE, M. O. Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.68, n.1, p.104-112, 2016.

CARREL, A. The treatment of wounds. **J. A. M. A.**, v.55, n.[s.i], p.2148-2150, 1910.

CERECERO, O. R.; ÁLVAREZ, A. Z.; MORA, A. R.; CORTÉS, D. A.; FERRER, J. E. J.; REYES, M. E. H.; TORTORIELLO, J. Effect on the Wound Healing Process and *In vitro* Cell Proliferation by the Medicinal Mexican Plant *Ageratina pichinchensis*. **Plant. Med.**, v.77, n.10, p.979-983, 2011.

CHAUSHU, L.; WEINREB, M.; BEITLITUM, I.; MOSES, O.; NEMCOVSKY, C. E. Evaluation of a topical herbal patch for soft tissue wound healing: an animal study. **J Clin. Periodontol.**, v.42, n.3, p.288-293, 2015.

CLARK, R. A. F. Cutaneous tissue repair: Basic biologic considerations. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.13, n.5, p.701-725, 1985.

COELHO, N. P. M. F.; NOGUEIRA, V. C.; CARDOSO, M. A.; LOPES, L. S.; NASCIMENTO, P. P.; ROCHA, E. S.; SILVA, C. L. P. S.; ARISAWA, E. A. L. Cenostigma macrophyllum Tul. on the healing of skin wounds in rats with Diabetes mellitus. **Acta Cirúrgica Brasileira.**, 2013; 8 (28).

CORREIA, A. C. L.; HANS-FILHO, G.; DOURADO, D. M.; MATIAS, R.; SILVA, I. S.; SARRAGIOTTO, M. H. Healing Effect of the Ointment Made of *Equisetum pyramidale* in the Treatment of Cutaneous Lesions in Diabetic Rats. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.56, n.3, p.377-382, 2013.

CSUPOR, D.; BLAZSÓ, G.; BALOG, A.; HOHMANN, J. The traditional Hungarian medicinal plant *Centaurea sadleriana* Janka accelerates wound healing in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.127, n.1, p.193-195, 2010.

DORVIGNY, B. M.; PERERA, L. M. S.; AGUIRRE, S. D.; GOUCOHEA, C. B. REGALADO, A. I.; MEDINA, A. E.; MACHADO, E. C. Efecto cicatrizante de la pasta de clorofila-caroteno de *Pinus caribaea* var. *caribaea* sobre heridas abiertas asépticas. **Rev. Cubana Plant. Med.**, v.16, n.1, p.24-33, 2011.

EBELING, S.; NAUMANN, K.; POLLOK, S.; WARDECKI, T.; VIDAL, S.; NASCIMENTO, J. M.; BOERRIES, M.; SCHMIDT, G.; BRANDNER, J. M.; MERFORT, I. From a Traditional

Medicinal Plant to a Rational Drug: Understanding the Clinically Proven Wound Healing Efficacy of Birch Bark Extract. **Plos One.**, v.9, n.1, p.1-18, 2014.

EZZAT, S. M.; CHOUCRY, M. A.; KANDIL, Z. A. Antibacterial, antioxidant, and topical anti-inflammatory activities of *Bergia ammannioides*: A wound-healing plant. **Pharmac. Biol.**, v. 54, n.2, p.215-224, 2016.

GALVÃO, T. F.; PEREIRA, M. G. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.23, n.1, p.183-184, 2014.

GANGWAR, M.; GAUTAM, M. K.; GHILDIYAL, S.; NATH, G.; GOEL, R. K. *Mallotus philippinensis* Muell. Arg fruit glandular hairs extract promotes wound healing on different wound model in rats. **BMC Complement. Altern. Med.**, v.15, n.123, p. 1-9, 2015.

GRAMMA, L. S. S.; MARQUES, F. M.; VITTORAZZI, C.; ANDRADE, T. A. M.; FRADE, M. A. C.; ANDRADE, T. U.; ENDRINGER, D. C.; SCHERER, R.; FRONZA, M. *Struthanthus vulgaris* ointment prevents an over expression of inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. **J. Ethnopharmacol.**, v.190, n.[s.i.], p.319-327, 2016.

GÜVENÇ, A.; AKKOL, E. K.; HURKUL, M. M.; SUNTAR, I.; KELES, H. Wound healing and antiinflammatory activities of the *Michauxia L'Hérit* (Campanulaceae) species native to Turkey. **J. Ethnopharmacol.**, v.139, n.2, p.401-408, 2012.

JOSHI, A.; SENGAR, N.; PRASAD1, S. K.; GOEL, R. J.; SINGH, A.; HEMALATHA, S. Wound-Healing Potential of the Root Extract of *Albizia lebbek*. **Planta Med.**, v.79, n.9, p.737-743, 2013.

KHEDIR, S. B.; BARDAA, S.; CHABCHOUB, N.; MOALLA, D.; SAHNOUN, Z.; REBAI, T. The healing effect of *Pistacialentiscus* fruit oil on laser burn, **Pharmac. Biol.**, v.55, n.1, p.1407-1414, 2017.

LAI, J. C.; LAI, H.; RAO, N. K.; NG, S. Treatment for diabetic ulcer wounds using a fern tannin optimized hydrogel formulation with antibacterial and antioxidative properties. **J. Ethnopharmacol.**, v.189, n.[s.i.], p.277-289, 2016.

LAU, K.; LAI, K.; LIU, C.; TAM, J. C.; TO, M.; KWOK, H.; LAU, C.; KO, C.; LEUNG, P.; FUNGA, K.; POOND, S. K.; LAU, C. B. Synergistic interaction between *Astragali Radix* and *Rehmanniae Radix* in a Chinese herbal formula to promote diabetic wound healing. **J. Ethnopharmacol.**, v.141, n.1, p.250-256, 2012.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M.; Cicatrização de Feridas. **Revista da S.P.D.V.**, v.69, n.3, p.355-365, 2011.

LIEDKE, D. C. F.; JOHANN, D. A.; DANSKI, M. T. R. Consultório de enfermagem para tratamento de feridas em Hospital de ensino. **Cogitare Enferm.**, v.19, n.3, p.590-596, 2014.

MAVER, T.; MAVER, U.; KLEINSCHKE, K. S.; SMRKE, D. M.; KREFT, S. A review of herbal medicines in wound healing. **Inter. Journ. Derm.**, v.54, n.7, p.740-751, 2015.

NASIRI, E.; HOSSEINIMEHR, S. J.; HOSSEINZADEH, A. Z.; AZADBAKHT, M.; ARAKBARI, J.; AZADBAKHT, M. The effects of *Arnebia euchroma* ointment on second-

degreeburn wounds:a randomized clinical trial. **J. Ethnopharmacol.**, v.189, n.[s.i.], p.107-116, 2016.

NGUYEN, V.; TRUONG, C.; NGUYEN, B. C. Q.; VO, T. V.; DAO, T.; NGUYEN, V.; TRINH, D. T.; HUYNH, H. K.; BUI, C. Anti-inflammatory and wound healing activities of calophyllolide isolated from *Calophyllum inophyllum* Linn. **Plos One.**, v.12, n.10, p.1-16, 2017.

PARENTE, L. M. L.; SILVA, M. S. B.; BRITO, L. A. B.; LINO-JÚNIOR, R. S.; PAULA, J. R.; TREVENZOL, L. M. F.; ZATTA, D. T.; PAULO, N. M. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v.11, n.4, p.383-391, 2009.

PATHER, N.; VILJOEN, A. M.; KRAMER, B. A biochemical comparison of the in vivo effects of *Bulbine frutescens* and *Bulbine natalensis* on cutaneous wound healing. **J. Ethnopharmacol.**, v.133, n.[s.i.], p.364-370, 2011.

PINTO, S. C. G.; BUENO, F. G.; PANIZZON1, G. P.; MORAIS, G.; SANTOS, P. V. P.; BAESSO, M. C.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P. *Stryphnodendron adstringens*: Clarifying Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Planta Med.** v.81, n.12/13, p.1090-1096, 2015.

PIRBALOUTI, A. G.; KOOHPAYEH, A.; KARIMI, I. The wound healing activity of flower extracts of *punica granatum* and *achillea kellalensis* in wistar rats. **Acta Polon. Pharm.**, v.67, n.1, p.107-110, 2010.

PIRIZ, M. A.; ROESE, A.; LOPES, C. V.; SILVA, M. M.; HECK, R. M.; BARBIERI, R. L. Uso popular de plantas medicinais na cicatrização de feridas: implicações para a enfermagem. **Rev. Enferm. UERJ**, v.23, n.5, p.674-679, 2015.

PRICHOA, F. C.; ROMAN, S. S.; MANFREDINI, V. Tissue injuries of wistar rats treated with hydroalcoholic extract of *Sonchus oleraceus* L. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.47, n.3, p.605-613, 2011.

RIZZI, E. S.; DOURADO, D. M.; MATIAS, R.; MULLER, J. A. I.; GUILHERMINO, J. F.; GUERRERO, A. T. G.; MOREIRA, D. L.; SILVA, B. A. K.; BARBOSA-FERREIRA, M. Wound-Healing potential of *Sebastiania hispida* (Mart.) Pax (Euphorbiaceae) ointment compared to low power laser in rats. **Braz. J. Biol.** v.77, n.3, p.480-489, 2017.

SARATH, R.; HARISH, B. G.; KRISHNA, V.; SATHYANARAYANA, B. N.; SWAMY, H. M. K. Wound Healing and Protease Inhibition Activity of Bacoside-A, Isolated from *Bacopa monnieri* Wettst. **Phytoter. Res.**, v.24, n.[s.i.], p.1217-1222, 2010.

SARMENTO, P. A.; ATAÍDE, T. R.; PINTO, A. P. S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; LÚCIO, I. M. L.; BASTOS, M. L. A. Avaliação do extrato da *Zeyheria tuberculosa* na perspectiva de um produto para cicatrização de feridas. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v.22, n.1, p.1-8, 2014.

SAWATDEE, S.; CHOOCHUAY, K.; CHANTHORN, W.; SRICHANA, T. Evaluation of the topical spray containing *Centella asiatica* extract and its efficacy on excision wounds in rats. **Acta Pharm.**, v.66, n.2, p.233-244, 2016.

SILVA, M. I.; RIBAS-FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; NASSIF, P. A. N.; RIBAS, M. M.; VARASCHIM, M.; CZECHKO, L. E. A utilização da *Pfaffia glomerata* no processo de cicatrização de feridas da pele. **Arquiv. Bras. Cirur. Digest.**, v.23, n.4, p.228-233, 2010.

SÜNTAR, I.; TUMEN, I.; USTUN, O.; KELES, H.; AKKOL, E. K. Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of *Pinus* species by in vivo and in vitro experimental models. **J. Ethnopharmacol.**, v.139, n.2, p.533-540, 2012.

TAKZAREE, N.; HADJIAKHONDI, A.; HASSANZADEH, G.; ROUINI, M. R.; MANAYI, A.; ZOLBIN, M. M. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) activation in cutaneous wounds after topical application of *aloe vera* gel. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.94, n.12, p.1285-1290, 2015.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da Ferida e Cicatrização. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.41, n.3, p.259-264, 2008.

TONIN, T. D.; THIENSEN, L. C.; NUNES, M. L. O.; BROERING, M. F.; DONATO, M. P.; GOSS, M. J.; PETREANU, M.; NIERO, R.; MACHADO, I. D.; SANTIN, J. R. *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract and pure compound niga-ichigoside F1: wound healing and anti-inflammatory effects. **Arch. Pharmacol.**, v.389, n.11, p.1235-1244, 2016.

TUMEN, I.; AKKOL, E. K.; SUNTAR, I.; KELES, H. Wound repair and anti-inflammatory potential of essential oils from cones of Pinaceae: Preclinical experimental research in animal models. **Journ. Ethnopharm.**, v.137, n.3, p.1215-1220, 2011.

UDEGBUNAM, S. O.; UDEBUGNAM, R. I.; MUOGBO, C. C.; ANYANWU, M. U.; NWAEHUJOR, C. O. Wound healing and antibacterial properties of methanolic extract of *Pupalia lappacea* Juss in rats. **BMC Complement. Altern. Med.**, v.14, n.157, p.1-8, 2014.

VITORINO-FILHO, R. N. L. BATISTA, M. C. S.; VERÇOSA, B. L. A.; SILVA, S. M. M. S.; MACHADO, A. S. F.; BONFIM, J. M.; BRANDÃO, A. A. C.; SOUSA, J. B. B. Avaliação do uso de pomada à base de sementes de jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam) na terapêutica tópica de feridas. **Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.28, n.3, p.279-286, 2007.

WANG, R.; LECHTENBERG, M.; SENDKER, J.; PETEREIT, F.; DETERS, A.; HENSEL, A. Wound-healing plants from TCM: in vitro investigations on selected TCM plants and their influence on human dermal fibroblasts and keratinocytes. **Fitoter**, v.84, n.[s.i.], p.308-317, 2013.

YADAV, K. S.; YADAV, N. P.; RAWAT, B.; RAI, V. K.; SHANKER, K.; RAO, C. V. An Assessment of Wound Healing Potential of *Argyreia speciosa* Leaves. **Scien. Worl. Journ.**, v.2014, n.[s.i.], 2014.

PIRBALOUTI, A.G; AZIZI, S.; KOOHPAYEH, A. Healing potential of Iranian traditional medicinal plants on burn wounds in alloxan-induced diabetic rats. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.** 22(2): Mar./Apr. 201 397-403.

## EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE *Curcuma longa*

Natacha Pinheiro Melo Brozzo<sup>1</sup>, Renildo Moura da Cunha<sup>1,2</sup>

1. Universidade Federal do Acre (UFAC), Laboratório de Pesquisas em Fisiofarmacologia, Rio Branco, Acre, Brasil;

2. Universidade Federal do Acre (UFAC), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (BIONORTE), Rio Branco, Acre, Brasil.

### RESUMO

Doenças cardiovasculares estão entre as mais importantes causas de morte no mundo, sendo a hipertensão arterial um forte fator de risco para suas ocorrências. Este trabalho objetivou investigar o efeito cardiovascular do extrato aquoso de *Curcuma longa* (EACL) em ratos normotensos. Investigou-se seus efeitos sobre PA e FC e sobre aorta de ratos com ou sem endotélio funcional. Os anéis da artéria eram montados num sistema de banho de órgãos e no platô da contração induzida pela Fenilefrina, era feita incubação de concentrações crescentes do EACL antes e após a incubação de atropina ou L-name ou indometacina. Testou-se EACL sobre contrações por elevação de K<sup>+</sup> extracelular. EACL (1, 5, 10, 20 mg/kg, e.v.), induziu respectivamente, hipotensão (34 ± 3; 55 ± 3; 54 ± 2; 68 ± 4 %) e bradicardia (72 ± 3; 73 ± 4; 91 ± 5; 82 ± 2 %) significativas (p<0,01), bem como significativo vasorrelaxamento. O efeito vasorrelaxante em anéis com endotélio (CE<sub>50</sub> = 4,32±0,05 µg/mL) foi significativo (p<0,01). Após inibição da produção do ON, a CE<sub>50</sub> foi para 126,50±2,35 µg/ml, após inibição da prostaciclina, para 124,6±0,05 µg/ml e após o bloqueio muscarínico para 437,10±0,2 µg/mL. A abertura de canais K<sup>+</sup> (relaxamento de 56,98%) e bloqueio a VOCC's (relaxamento de 31,56%), foram significativamente evidentes. A *via* muscarínica parece ser a principal envolvida nesse efeito, seguida pela *via* da produção de ON e das Prostaciclina. A abertura de canais de K<sup>+</sup> pelo EACL parece ter maior expressão do que seu bloqueio a VOCC's.

**Palavras-chave:** Açafrão, hipertensão arterial e plantas medicinais.

### ABSTRACT

Cardiovascular diseases are among the most important causes of death in the world, and arterial hypertension is a strong risk factor for its occurrences. This study aimed to investigate the cardiovascular effect of the aqueous extract of *Curcuma longa* (AECL) in normotensive rats. It was investigated its effects on BP and HR and on the aorta of rats with or without functional endothelium. The artery rings were mounted in an organ bath system and on the plateau of the contraction induced by phenylephrine, incubation of increasing concentrations of the AECL was made before and after the incubation of atropine or L-NAME or indometacina. AECL was tested on contractions by elevating K<sup>+</sup> extracelular. AECL (1, 5, 10, 20 mg/kg, e.v.), respectively induced, hypotension (34 ± 3; 55 ± 3; 54 ± 2; 68 ± 4 %) and bradycardia (72 ± 3; 73 ± 4; 91 ± 5; 82 ± 2 %) significant (P < 0.01), as well significant vasorelaxation. The vasorelaxing effect in rings with endothelium (EC<sub>50</sub> = 4.32± 0.05 µg/mL) was significant (p < 0.01). After inhibition of NO production, EC<sub>50</sub> was for 126.50 ± 2.35 mg/ml, after inhibition of prostacyclines, to 124.6 ± 0.05 mg/ml and after muscarinic

blockade to  $437.10 \pm 0.2$  mg/ml. The opening of K<sup>+</sup> channels (relaxation of 56.98%) And blockade of VoCC's (relaxation of 31.56%) were significantly evident. The muscarinic pathway appears to be the main involved in this effect, followed by the production of NO and Prostacyclines. The opening of K<sup>+</sup> channels by the AECL appears to have greater expression than its blockage to VOCC's.

**Keywords:** Saffron, arterial hypertension and medicinal plants.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares estão entre as maiores causas de morte entre as doenças crônicas não transmissíveis no mundo. Seu aumento significativo aponta para a necessidade de intervenções eficazes e de baixo custo (GUIMARÃES et al., 2015; RIQUE, 2002). Segundo a American Heart Association, durante a última década pesquisada, de 2001 a 2011, a taxa de morte por hipertensão arterial (HA) aumentou 13,2% em mais de 190 países pesquisados (POWERS et al., 2015). Já no Brasil, as doenças cardiovasculares estão nas estatísticas de saúde como a primeira causa de morte há pelo menos quatro décadas (SOUZA, 2017).

A HA é observada como importante fator de risco cardiovascular e sua alta prevalência torna fundamental o conhecimento de sua ocorrência, assim como a correlação com outros possíveis fatores desencadeantes de distúrbios cardiovasculares, já que é apontada como um problema de saúde pública global, causando 9,4 milhões de mortes a cada ano em todo o mundo (MOURA, 2015).

A utilização de medicamentos para combate a HA é a principal forma terapêutica utilizada, mesmo sabendo que um dos maiores problemas no que concerne ao tratamento da HA são os efeitos colaterais que provocam os medicamentos (GUSMÃO et al., 2009). Há também outros recursos terapêuticos que são utilizados de forma alternativa, sendo o uso de plantas medicinais, um dos que se expande em diversas sociedades (BRUM et al., 2017).

O conhecimento sobre plantas medicinais representa, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL et al., 2002), pois apesar da grande revolução na medicina existem ainda obstáculos na utilização dos recursos mais elaborados e modernos pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de medicamentos (PEREIRA, 2013).

São inúmeros os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, de fontes naturais, especialmente de plantas, como a morfina (*Papaver*

*somniferum*), a digoxina (*Digitalis sp.*) (BOLDI, 2004). No Brasil apenas 5% dos medicamentos são de origem vegetal, mesmo com a grande diversidade de plantas medicinais conhecidas nesse país (RODRIGUES, 2011). O alho (*Allium sativum*) possui efeito vasorrelaxante por liberação de óxido nítrico (NO) (ALEXANDRE et al., 2008), a Laranja (*Citrus sp.*), por bloqueio aos receptores  $\beta$ -adrenérgicos (LONGO et al., 2011), Chuchu (*Sechium edule*), tem comprovado efeito anti-hipertensivo (LOMBARDO et al., 2014).

A espécie *Curcuma longa* Linnaeus da família Zingiberaceae, popularmente conhecida como Gengibre Amarelo ou Açafrão, é de origem Malaio-Indígena, mas é muito cultivada nos países tropicais como planta medicinal ou condimentar (FILHO et al., 2009). A parte mais utilizada é seu rizoma seco, muito usado na culinária propiciando aroma e sabor (GONZALVEZ; VISTEL, 2015).

*C. longa* apresenta como principal componente os curcuminóides (derivados fenólicos), peptídeos solúveis em água, proteínas e resíduos de metionina (FILHO et al., 2009). Esta planta é largamente utilizada na medicina popular no tratamento de diversas doenças (FILHO et al., 2009). Há estudos que comprovam suas propriedades antiparasitária, antiespasmódica, antiinflamatória e também o potencial anticancerígeno da curcumina, além das atividades como antibacteriana, onde o óleo da *C. longa* a inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus typhosus*; atividade anti-HIV, em que a curcumina é um inibidor da proteína integrase na replicação do HIV-1 (FILHO, 2009).

Em relação ao sistema cardiovascular, *C. longa* também apresenta efeito hipotensor e bradicárdico significativo, se apresentando como potente vasodilatador nas artérias mesentéricas dos ratos (ADAMAYORE, 2009). Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito hipotensor e vasorrelaxante do extrato aquoso de *Curcuma longa* (EACL) que ocorre no Acre, em ratos normotensos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Drogas e Soluções

Para realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes drogas: tiopental sódico, sal sódico de heparina, fenilefrina (FEN), sulfato de atropina, cloridrato de acetilcolina (ACh), NG-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), Nitroprussiato de sódio (NPS), indometacina (Indo). As soluções estoques de indometacina foram dissolvidas juntamente

com bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) a 5 N em água destilada. As demais soluções estoques foram dissolvidas em água destilada. Para os experimentos *in vitro* o meio de perfusão usado foi a solução de Krebs Henseleit (KH), contendo em mM: NaCl 118,4; KCl 4,75; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18; NaHCO<sub>3</sub> 25; MgSO<sub>4</sub> 1,18; CaCl<sub>2</sub> 1.9 e glicose 5. A solução nutritiva teve pH ajustado entre 7,3 e 7,4 através de HCl 1M ou NaOH 1M e quando nas cubas, contendo as montagens, era aerada com carbogênio, à temperatura de 37°C.

### 2.1.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar albinos (*Rattus norvegicus*) machos (figura 1), originários do biotério do Núcleo de Biologia Experimental (Nubex) da Universidade de Fortaleza, mantidos no Laboratório de Pesquisa em Fisiofarmacologia/ Bionorte/ UFAC, produzidos e criados de acordo com as normas e padrões exigidos para uso de animais em pesquisa.



**Figura 1.** Rato Wistar.  
Fonte: LAFFAR

Os experimentos foram realizados conforme o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, publicado pelo “US National Institute of Health” (NIH publicações 85-23, revisado em 1996) e analisados e aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal do Acre sob número 23107.018498/2016-40.

### 2.1.3 Coleta e Identificação Botânica

As folhas da espécie *Curcuma longa* Linnaeus foram coletadas de plantas de até 100 cm de altura, no período chuvoso em uma propriedade particular (10° 04' 26, 0078”S e 67° 17' 07, 1110”W), no município de Plácido de Castro, no estado do Acre. A espécie

possui registro no laboratório de Botânica da Universidade Federal do Acre, com número 20002.

#### **2.1.4 Obtenção do extrato**

As folhas com aparência saudável foram selecionadas, lavadas com água corrente e colocadas em estufa à temperatura de 40 ° C por 48 horas, onde ocorreu a secagem uniforme. As folhas secas foram trituradas em moinho tipo faca na Unidade de tecnologia de Alimentos (UTAL) da UFAC. Para a obtenção do extrato, foram seguidas metodologias diversas descritas nas seguintes referências: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1959; FOSTER, 1949; DOMINGUES, 1973. Utilizou-se para a extração 4 litros de água destilada e 370 g de folhas secas trituradas colocadas em balão de fundo redondo com capacidade de 5 litros, sendo aquecido durante 10 minutos a temperatura de 100 °C, seguido de filtração. O filtrado foi liofilizado e diluído em solução salina para os experimentos in vivo e em água para os experimentos in vitro.

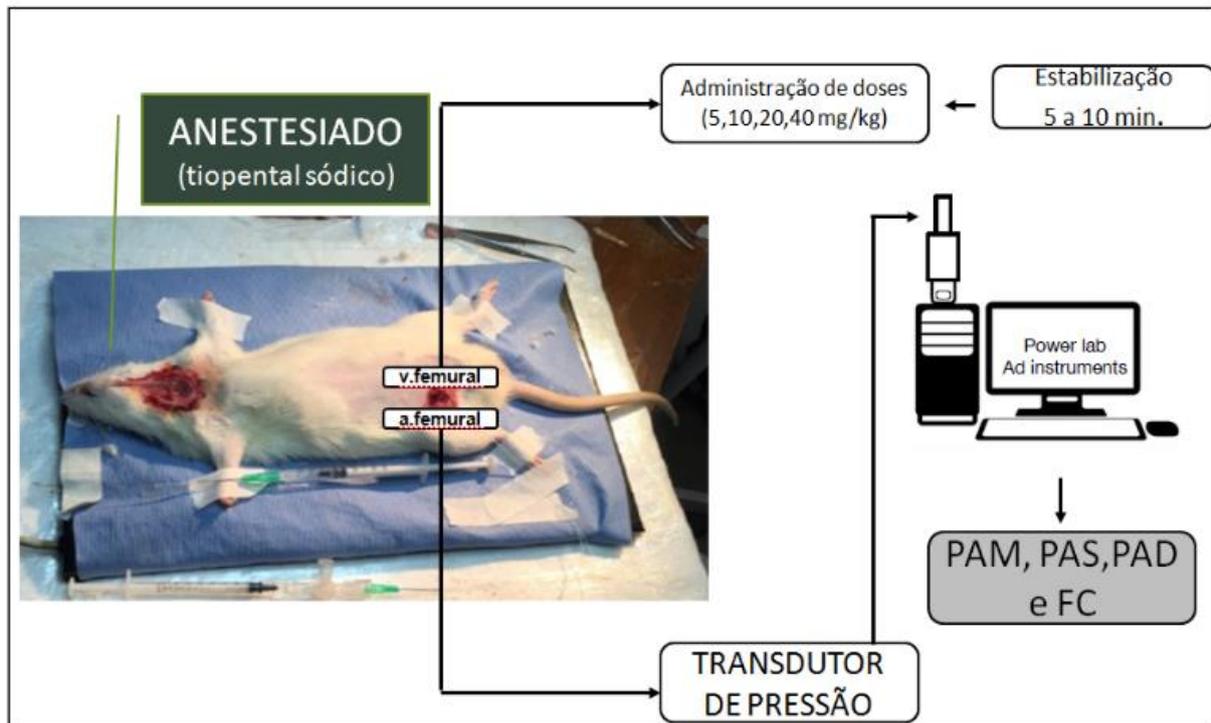
#### **2.1.5 Experimentos “in vivo”**

##### **2.1.5.1 Preparação dos animais**

Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital (50mg/kg, i.p.) Em seguida, dois cateteres heparinizados (125 UI/ml em salina isotônica), foram implantados na artéria femural (para registro da PA e da FC), e na veia femural (para administração de drogas), como descrito previamente (LAHLOU et al., 1990). Todos os experimentos de registro cardiovascular foram realizados 48 horas após o procedimento cirúrgico.

##### **2.1.5.2 Sistema de registro**

No momento do experimento, foi acoplado o cateter arterial a um transdutor de pressão fisiológica, conectado a um polígrafo digital ligado a um amplificador de sinal. A frequência cardíaca (FC) assim como a PAM foram obtidas através do Software Labchart 7.0 (AdInstruments) com o sinal obtido do transdutor (figura 2).



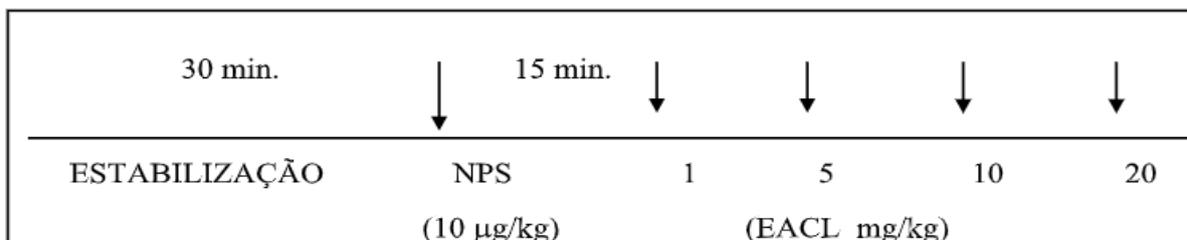
**Figura 2.** Esquema representativo do protocolo para aquisição de dados e registros da variação da Pressão Arterial Média (PAM), Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD) e Frequência Cardíaca (FC) em função do efeito de doses crescentes do EACL (5, 10, 20 e 40 mg/Kg, i.v.) em ratos não-anestesiado.

### 2.1.5.3 Avaliação das variações da PAM e da FC induzidas pela administração do EACL em ratos não anestesiados

Foram separados um grupo de 6 animais e realizada avaliação das variações da PA e FC induzidas pelo EACL. Para este protocolo foram utilizados os animais cateterizados do dia anterior sem efeito de anestésico.

Antes da aplicação de qualquer droga, os animais foram mantidos em aclimação durante 30 minutos para minimização do estresse, estabilização dos parâmetros cardiovasculares e para refletir maior fidelidade das variações dos parâmetros em teste frente a administração das drogas. Após esse período era injetado 10 g/kg de NPS para verificação do funcionamento dos cateteres e estabilizados durante 15 minutos para início dos experimentos.

Os animais receberam a primeira dose fixa do EACL por via endovenosa. Depois de cada dose, a seguinte era aplicada somente de 3 a 5 minutos após retomados os níveis basais de PA e FC. As variações na PAM e FC foram registradas, obtendo-se uma curva dose- resposta (figura 3).



**Figura 3.** Esquema representativo do protocolo experimental *in vivo* da administração endovenosa (e.v) de doses crescentes do EACL em ratos não-anestesiados.

## 2.2 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

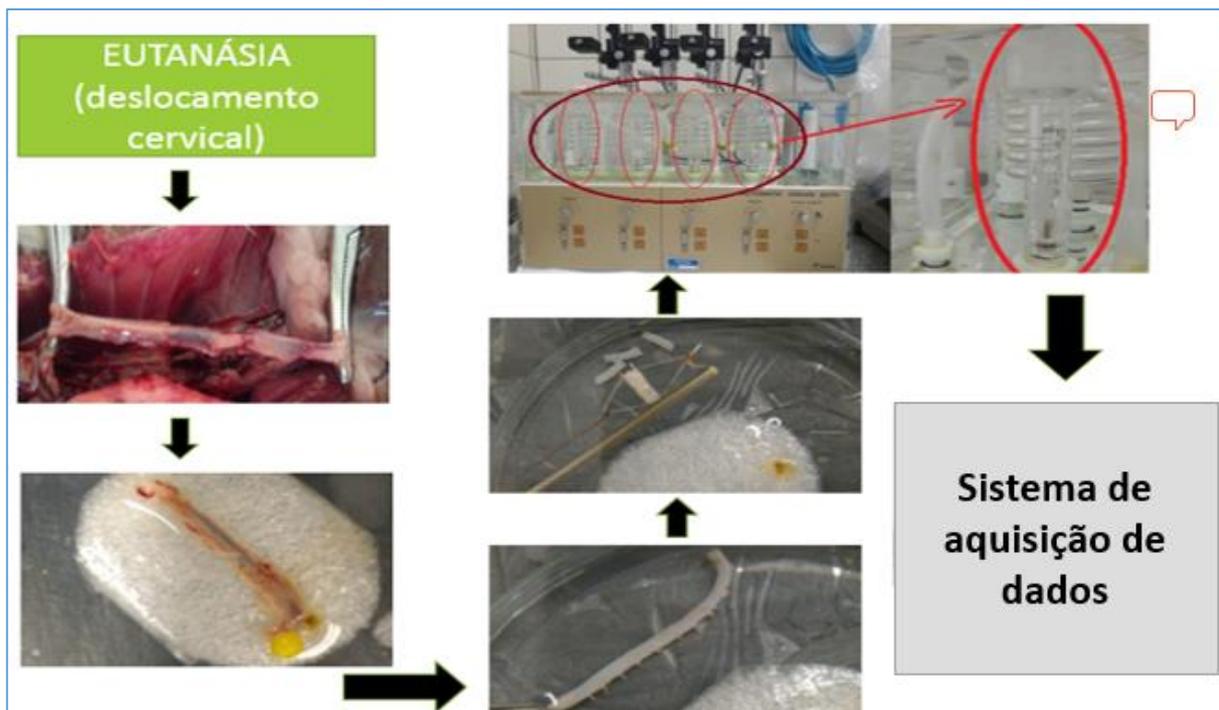
### 2.2.1 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, caracterizado pelo rompimento da medula espinhal por pressão aplicada posteriormente à base do crânio, produzindo imediata perda da consciência, perda total da sensibilidade e morte instantânea.

### 2.2.2 Preparo dos anéis de artéria aorta torácica isolada de ratos

O segmento da artéria aorta era dessecado e isolado através de uma incisão ventral e abertura da caixa torácica por excisão do esterno e de parte das costelas para visualização e retirada dos órgãos intratorácicos para o acesso à aorta torácica que era imediatamente transferida para uma placa de Petri contendo solução nutritiva KH, para remoção do tecido adiposo e do tecido conectivo.

Após a limpeza, os segmentos de aorta eram seccionados em anéis (4 a 5 mm de comprimento) (n=6), em seguida, presos entre 2 hastes inoxidáveis, sendo uma delas, através de um fio de algodão, fixada a extremidade e a haste superior, através de outro segmento de fio de algodão, fixada a um transdutor de força isométrica (figura 4) acoplado na parte superior do sistema de cubas do banho para órgãos isolados. As cubas onde os anéis permaneciam submersos continham o meio de perfusão solução KH (pH = 7,4), a 37 °C, aerada continuamente com solução carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>).



**Figura 4.** Representação esquemática da obtenção de anéis vasculares obtidos a partir do isolamento do segmento de artéria aorta torácica de rato e da sua montagem nas cubas do banho de órgãos do sistema de aquisição de dados.

As preparações de aorta eram contraídas com uma tensão passiva de 1 g registrada através do transdutor de força isométrica. Os sinais elétricos captados pelo transdutor foram decodificados e digitalizados pelos hardwares Pan Lab (AdInstruments). Os registros dos protocolos de contração da musculatura lisa foram obtidos através do software Protowin organ baths (Adinstruments) para posterior análise.

### 2.2.3 Avaliação da atividade do EACL em anéis de aorta com e sem endotélio contraídos com Fenilefrina

Imediatamente após o período de estabilização das preparações por 1 hora, era feita a verificação da presença ( $E^+$ ) ou ausência ( $E^-$ ) de endotélio funcional nos anéis por meio da adição de ACh sobre o platô da fase tônica sustentada da contração induzida por de FEN ficou estabelecido como  $E^+$  aqueles anéis cujos percentuais de relaxamento induzidos pela ACh fossem iguais ou superiores a 70 % e  $E^-$ , os com relaxamento da ACh menores que 5%. Os tecidos dos anéis preparados nas cubas eram novamente contraídos com FEN e, decorridos cinco a sete minutos de sustentação da fase tônica da contração, concentrações crescentes do EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) eram adicionadas

nas preparações nas cubas contendo anéis E<sup>+</sup> ou anéis E<sup>-</sup>. A porcentagem de relaxamento foi determinada através da comparação dos valores da contração da FEN antes e após adição cumulativa do extrato e também pelos valores calculados das CE<sub>50</sub>.

#### **2.2.4 Avaliação do efeito de EACL após inibição das enzimas da via da produção do óxido nítrico (NO) e da via de produção das Prostaciclina (PGE2 e PGI2) bem como do boqueio muscarínico endotelial**

Em preparações contendo anéis E<sup>+</sup> era feita a administração cumulativa do EACL sobre o platô da contração induzida pela FEN, antes e depois do L-NAME (100 µM) incubado durante 30 minutos, para avaliação do envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito do EACL. Para avaliar o envolvimento das prostaciclina, do mesmo modo, a indometacina (10 µM), ao invés do L-NAME, era incubada também por 30 minutos. Para verificar a também possível participação dos receptores muscarínicos, seguindo o mesmo protocolo experimental, era previamente feita a incubação de atropina (1 µM) por 15 minutos ao invés dos dois inibidores de enzimas.

#### **2.2.5 Avaliação da atividade do EACL em anéis de aorta contraídos com KCL**

Para avaliar o envolvimento de canais iônicos foram realizados experimentos utilizando-se anéis E<sup>-</sup>. Nessas abordagens, após estabilização das preparações e outros procedimentos preliminares obrigatórios, ao invés da contração por FEN, eram produzidas contrações induzidas por elevação da concentração de K<sup>+</sup> no banho – meio extracelular ([K<sup>+</sup>]<sub>e</sub>), operação realizada com solução KCl 20 mM ou KCl 80 mM, em montagens individuais distintas e, no platô delas feita a administração cumulativa de concentrações crescentes do EACL.

### **2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

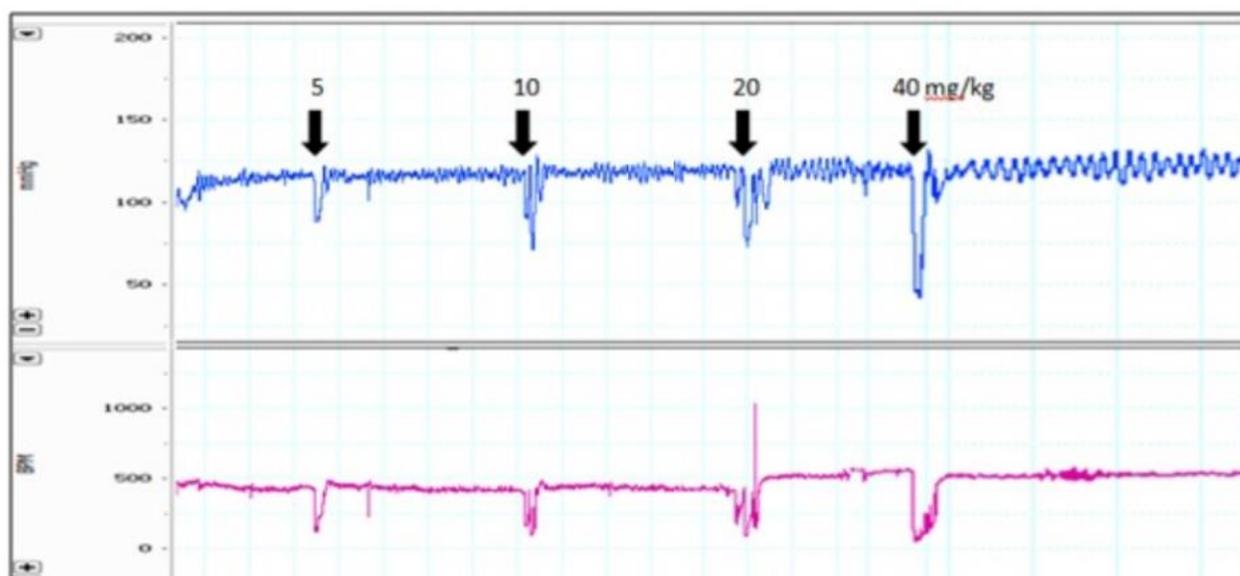
Para os experimentos *in vivo*, os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM, n = 6 por grupo). A significância (P < 0,05) dos resultados foi determinada pelo uso de testes T de Student (pareado ou não pareado). Os dados foram analisados através do programa GraphPad Prism 6.0. Para os *in vitro* todos os pontos plotados nos gráficos estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de um n=6 para cada concentração de um mesmo grupo da mesma natureza. Os valores de CE<sub>50</sub> das curvas concentração-resposta individuais foram calculados pelos valores médios para

cada concentração utilizada, dentro de um mesmo tipo de abordagem, a partir de regressão não-linear, e então, feitas as comparações estatísticas.

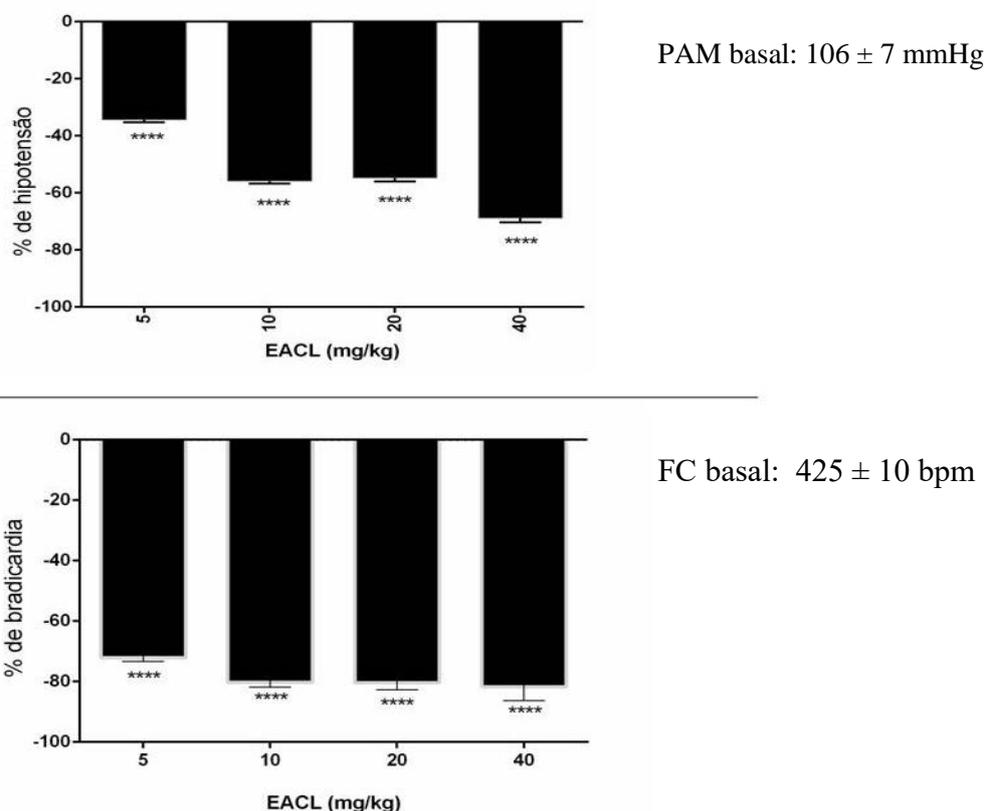
As diferenças estatísticas entre as médias dos resultados foram determinadas pelo teste t de Student pareado e, para comparações múltiplas usou-se a análise de variância (ANOVA). As análises e representações foram feitas no programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), sendo significativo quando  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os valores basais de PAM e FC nos animais controle antes da administração do EACL foram de  $106 \pm 7$  mmHg e  $425 \pm 10$  bpm, respectivamente. A administração de EACL (5, 10, 20 e 40 mg/Kg, e.v.) induziu uma resposta, dose-dependente, caracterizada inicialmente por uma hipotensão ( $34 \pm 3$ ;  $55 \pm 3$ ;  $54 \pm 2$ ;  $68 \pm 4$  %,  $n=6$ ) e bradicardia ( $72 \pm 3$ ;  $73 \pm 4$ ;  $91 \pm 5$ ;  $82 \pm 2$  %,  $n=6$ ) (figuras 5 e 6).



**Figura 5.** Registro original mostrando o efeito de doses crescentes do EACL (5, 10, 20 e 40 mg/kg, i.v.) sobre a PAM e FC em rato não-anestesiado.



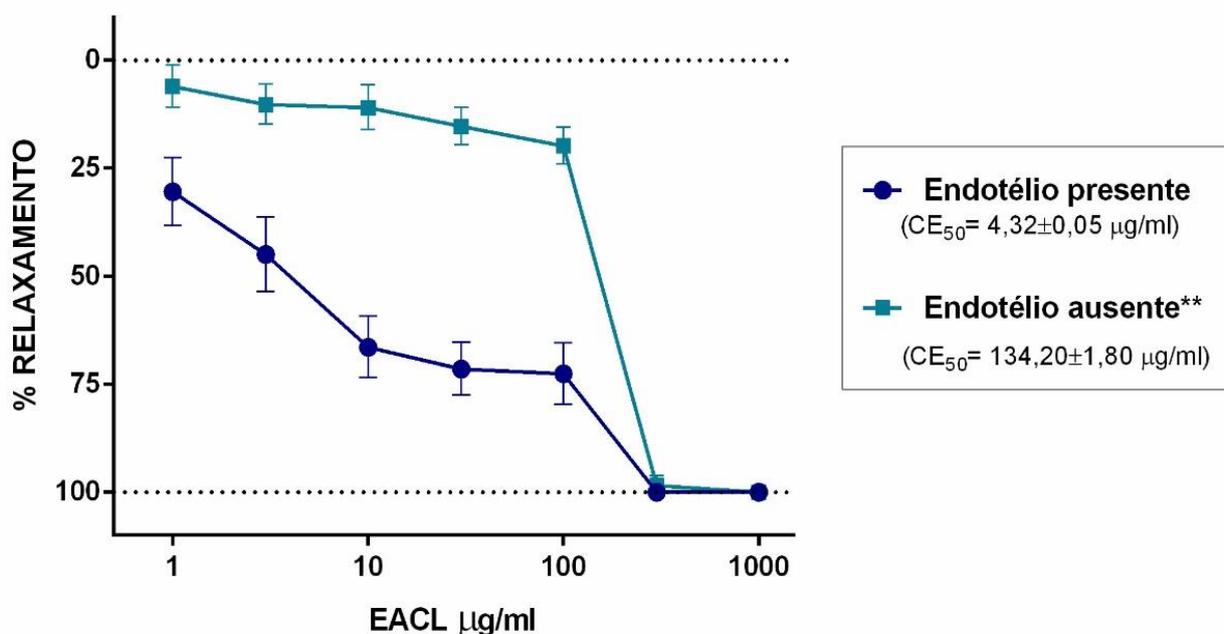
**Figura 6.** Efeito hipotensor e bradicárdico induzido pela administração aguda de doses crescentes de EACL (5, 10, 20 e 40 mg/Kg, i.v.) em ratos não-anestesiados. Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 6 experimentos.  $p < 0,0001$  vs controle. (A) percentual de queda de pressão. (B) percentual de queda de batimentos cardíacos.

Em animais não-anestesiados, a administração aguda de EACL foi caracterizada por hipotensão e bradicardia intensa. Uma das hipóteses para explicar este efeito é a diminuição da resistência vascular periférica, por ativação direta de receptores muscarínicos do tipo M2, presentes no coração, uma vez que esses ativados reduzem a frequência e força da contração cardíaca (VENTURA et al., 2010).

A estimulação de receptores muscarínicos localizados nas células endoteliais vasculares, produz hipotensão como consequência de uma intensa vasodilatação (BRUNNING et al., 1994) pelo um aumento na  $[Ca^{2+}]_i$ , promovendo a formação e liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), principalmente óxido nítrico (NO) (MONCADA et al., 1991). Vários estudos usando antagonistas muscarínicos seletivos demonstram que o subtipo de receptor muscarínico envolvido nestas respostas é o M3 (MICHEL; STEFANICH; WHITING, 1989); CAULFIELD, 1993; SAWAYER et al., 2000).

Outra hipótese para o mecanismo deste efeito seria o bloqueio dos receptores adrenérgicos cardíacos, mais especificamente do tipo  $\beta_1$ , que é capaz de causar redução da frequência cardíaca e da contratilidade, com a consequente redução do débito cardíaco (BORTOLOTTI, 2010). Para compreender melhor e confirmar a natureza do efeito hipotensor observado nos experimentos in vivo foi realizado o estudo para investigar possíveis efeitos relaxantes sobre anéis de artéria aorta torácica isolada de ratos.

Em anéis ( $E^+$ ) EACL aboliu as contrações induzidas com FEN. A administração de concentrações crescentes do EACL induziu significativo ( $p < 0,01$ ) efeito relaxante ( $CE_{50} = 4,32 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ ). O vasorrelaxamento ocorreu de modo dependente da concentração. A resposta de EACL foi significativamente ( $p < 0,01$ ) modificada pela remoção do endotélio vascular ( $EC_{50} = 134,20 \pm 1,80 \mu\text{g/mL}$ ), indicando que o efeito do EACL é muito dependente de fatores derivados do endotélio vascular (Figura 7).

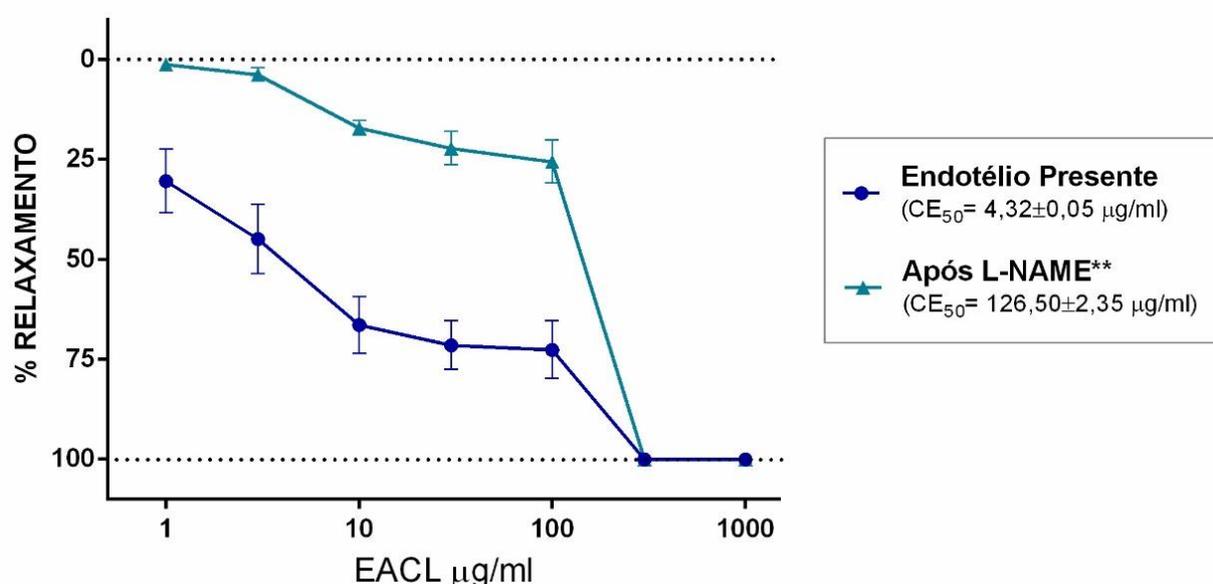


**Figura 7.** Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre contrações induzidas por FEN (0,1  $\mu\text{M}$ ) em anéis de aorta isolada de ratos na presença e na ausência de endotélio funcional. \*\*( $p < 0,01$ ) versus  $E^+$

Observou-se que o efeito do EACL é significativamente dependente de fatores derivados do endotélio vascular devido ao seu maior relaxamento em anéis  $E^+$ . O endotélio vascular, pela camada de células que o reveste internamente, produz substâncias mediadoras de várias naturezas, que regula o tônus da musculatura lisa vascular (CEBALLOS; GUTIÉRREZ, MEANEY, 2015). Há um controle natural da liberação desses

mediadores, no limite das funções fisiológicas a liberação dos fatores relaxantes se antecipa a dos contracturantes (PINTO; AREAS; REYES, 2003), sendo o NO o primeiro a ser liberado, seguido pelas prostaciclina e por outros agentes relaxantes derivados do endotélio (BATLOUNI, 2001).

Após inibição da enzima NO sintase pelo L-NAME, o efeito vasorrelaxante de EACL em anéis aórticos intactos foi significativamente ( $p < 0,01$ ) inibido, evento comprovado pela elevação da  $CE_{50}$  antes  $4,32 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$  para  $126,50 \pm 2,35 \mu\text{g/ml}$ , após (figura 8), indicando claro envolvimento da via da produção do NO no efeito do EACL.



**Figura 8.** Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN ( $0,1 \mu\text{M}$ ), antes (controle  $E^+$ ) e após a inibição da NO sintase. \*\*( $p < 0,01$ ) versus  $E^+$ .

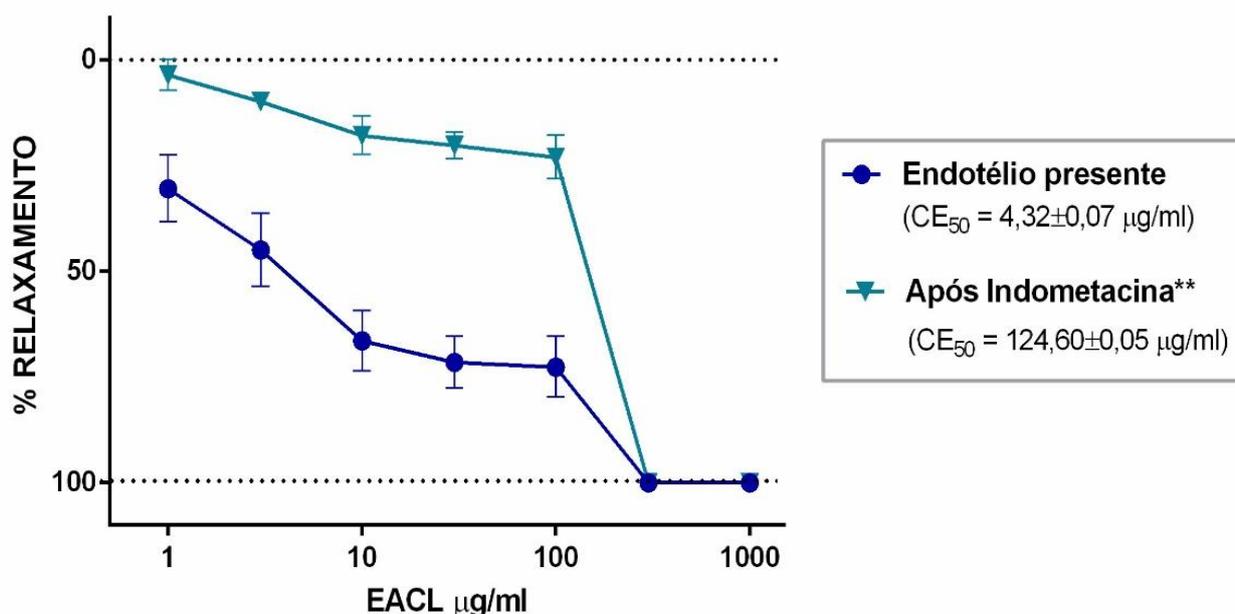
Mesmo com o envolvimento do NO no efeito de EACL, por tratar-se de um extrato, portanto um composto de muitas substâncias, é possível sugerir, que outras vias relaxantes derivadas do endotélio possam também estar envolvidas na atividade vasorrelaxante do EACL.

A partir do ácido araquidônico, que é liberado dos fosfolipídios da membrana das células endoteliais por fosfolipases ativadas (A2 e C), e através da ação das enzimas ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2) as prostaglandinas são sintetizadas (BATLOUNI, 2010). Uma vez liberadas, principalmente a PGI2 e PGE2, se difundem para as células musculares lisas

promovendo vasorrelaxamento por meio de receptores IP e EP4, aumento do AMPc e reduzindo Ca<sup>2+</sup> intracelular (ANDRÉ, 2000).

O bloqueio da síntese das prostaglandinas vasorrelaxantes se dá através da inativação das enzimas que degradam o ácido araquidônico (COX-1 e COX2) (BATLOUNI, 2010). A indometacina é um inibidor não seletivo à produção dessas prostaglandinas (5-RODWELL et al., 2015).

Após o bloqueio da síntese de prostaglandinas através da Indometacina, a resposta vasorrelaxante induzida por EACL foi significativamente ( $p < 0,01$ ) inibida após incubação da indometacina, fato revelado na elevação da CE<sub>50</sub> de  $4,32 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$  para  $124,6 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ , sugerindo que o efeito de EACL também é relacionado a via da produção das prostacilinas (Figura 9).

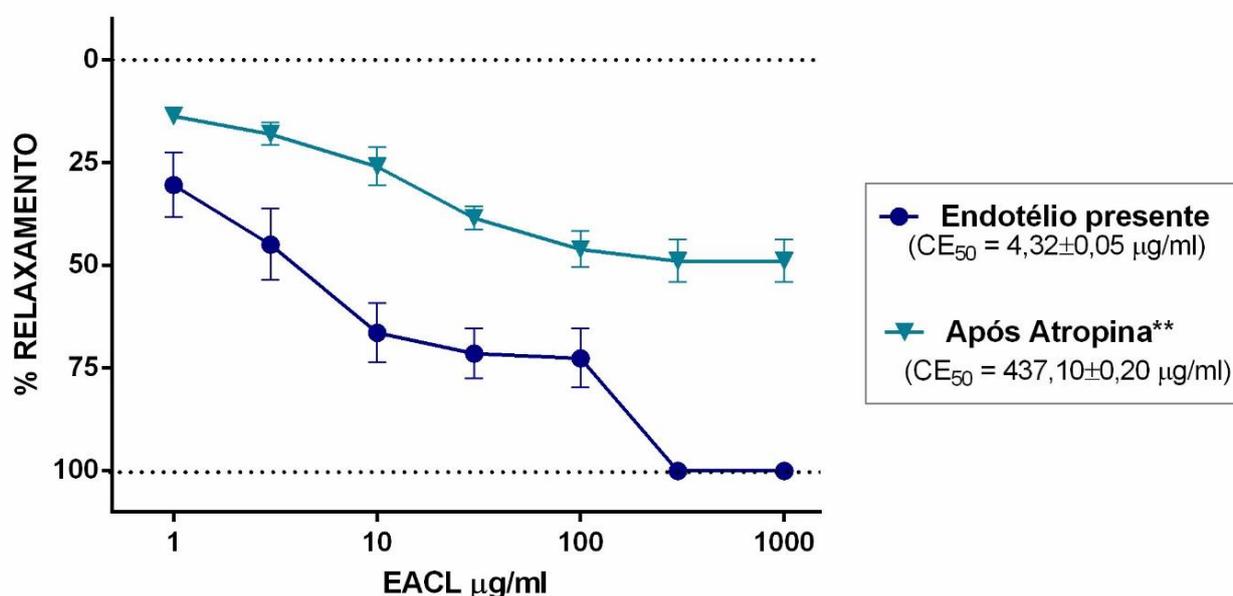


**Figura 9.** Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN ( $0,1 \mu\text{M}$ ), antes (controle E+) e após a inibição da cicloxigenase (COX-1). \*\*( $p < 0,01$ ).

Diante desses resultados foi possível sugerir também o envolvimento das prostaglandinas. Ainda no endotélio vascular estão presentes os receptores muscarínicos que existem em muitos tipos de células e participam da sinalização celular logo que ativados pelo ligante acetilcolina (OLIVEIRA, 2017). Para verificação do envolvimento da via muscarínica no efeito relaxante do EACL, foi realizado o antagonismo dos receptores

muscarínicos por meio da incubação de atropina, um antagonista dos receptores muscarínicos que age por competitividade nesses receptores, impedindo que a ACh se ligue e exerça sua atividade.

Nessa abordagem, a resposta vasorrelaxante induzida pelo EACL foi a mais significativamente atenuada, como mostra a proeminente ( $p < 0,01$ ) elevação da  $CE_{50}$  de  $4,32 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$  para  $437,10 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$  (figura 10). Esses dados sugerem que os receptores muscarínicos parecem ser os mais significativamente implicados ( $p < 0,01$ ) no efeito vasorrelaxante induzido pelo EACL em aorta torácica isolada de ratos.

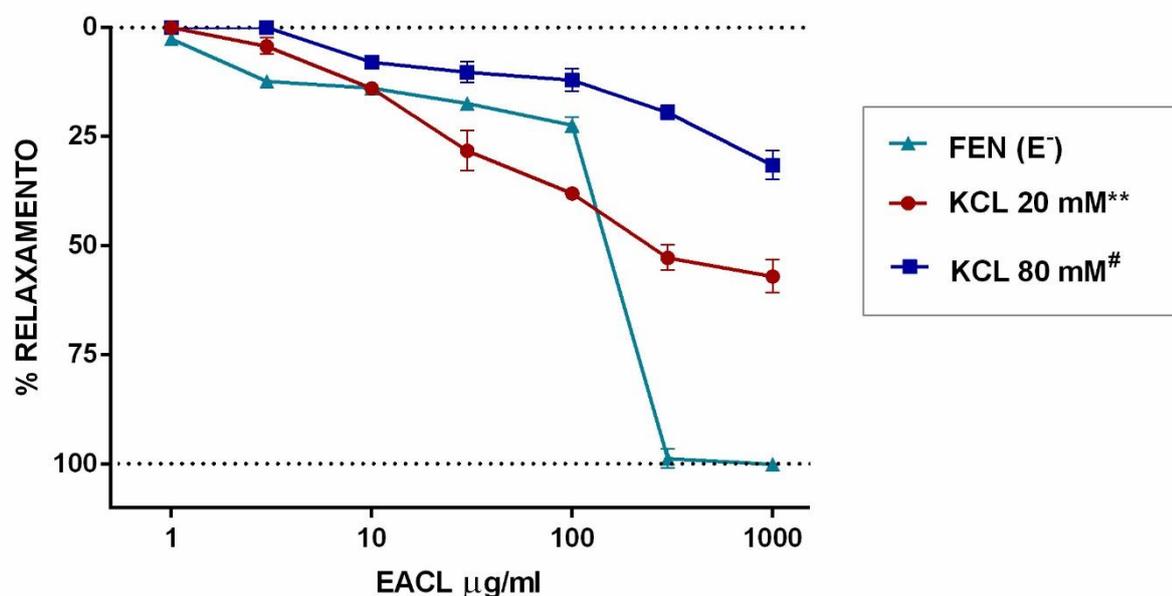


**Figura 10.** Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN ( $0,1 \mu\text{M}$ ), antes (controle  $E^+$ ) e após a incubação com atropina ( $1 \mu\text{M}$ ). \*\*( $p < 0,01$ ) versus  $E^+$ .

Em anéis desprovidos de endotélio, ainda que com expressão bem menor, EACL continuou apresentando atividade vasorrelaxante significativa ( $p < 0,01$ ). A resposta vasorrelaxante induzida por EACL em anéis de aorta torácica isolada de ratos pré-contraídos com KCL20 mM foi significativamente ( $p < 0,01$ ) menor que o relaxamento induzido por EACL sobre a contração dada pela FEN em anéis ( $E^-$ ) (figura 5). O percentual de vasorrelaxamento sobre a contração do KCL20 mM foi 56,98% e de 31,56% sobre a contração do KCL80 mM.

Nesse sentido, parece que o efeito de EACL tem maior significância na abertura de canais de  $K^+$  do que do que no bloqueio à canais de cálcio operados por voltagem

(VOCCS's) (Figura 11). Foi possível sugerir que canais iônicos parecem também envolvidos na significativa atividade vasorrelaxante do EACL, sendo maior sua expressão na abertura de canais de K<sup>+</sup> do que no bloqueio a VOCC's.



**Figura 11.** Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL) em anéis sem endotélio de aorta torácica isolada de rato pré-contráidos com FEN, KCl 20 e 80. <sup>\*\*</sup>(p<0,01) versus FEN. <sup>#</sup>(p<0, 01) versus KCl 20.

## 4. CONCLUSÃO

O presente estudo, fazendo uso de abordagens *in vivo* demonstrou que EACL diminui significativamente a pressão arterial com concomitante diminuição da frequência cardíaca em ratos não anestesiados. As constatações das abordagens *in vitro*, revelam que a queda da pressão arterial foi, provavelmente, por induzir significativo vasorrelaxamento, mais expressivo na presença de endotélio funcional. A via muscarínica parece ser a principal envolvida no efeito vasorrelaxante. A via da produção de NO e das Prostaciclina parecem também bastante envolvidos no efeito apresentado pelo EACL. A abertura de canais de K<sup>+</sup> pelo EACL parece ter maior expressão do que seu bloqueio à VOCC's. Há necessidade de estudos mais aprofundados tanto sobre a fitoquímica do EACL, assim como uma melhor investigação farmacológica tanto por meio de outras abordagens como do uso de outros modelos experimentais. O uso de outras ferramentas farmacológicas para

elucidação dos mecanismos de ação assumidos pelo EACL também são de suma importância e de reconhecida relevância para aprofundamento do presente estudo.

## 5. REFERÊNCIAS

ADARAMOYE, O.A. et al. Hypotensive and endothelium-independent vasorelaxant effects of methanolic extract from *Curcuma longa* L. in rats. **Journal of ethnopharmacology.**, v. 124, n. 3, p. 457-462, 2009.

ALEXANDRE, R.F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C.M.O. Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v. 18, p. 455-463, 2008.

ANDRE E. **Análise dos mecanismos envolvidos no relaxamento induzido pelo sesquiterpeno poligodial em vasos de coelho e cobaia e no corpo cavernoso de coelho in vitro.** Dissertação. (Florianópolis - SC), Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

BATLOUNI M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens.**, v. 8, n.3, p. 328-338, 2001.

BATLOUNI M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects. **Arq Bras Cardiol.**, v. 94, v. 4, p. 556-563, 2010.

BAUM, L. et al. Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease. **Journal of clinical psychopharmacology.**, v. 28, n. 1, p. 110-113, 2008.

BEVILACQUA, H. G. C. R. **Planejamento de horta medicinal e comunitária.** Divisão Tec. Esc. Municipal de Jardinagem / Curso de Plantas medicinais – São Paulo, 2010.

BOLDI, A.M. Libraries from natural product-like scaffolds. **Current opinion in chemical biology.**, v. 8, n. 3, p. 281-286, 2004.

BORTOLOTTO, L.A; CONSOLIM, F.M.C. Betabloqueadores adrenérgicos. **Revista Brasileira de Hipertensão.**, v. 16, n. 4, p. 215-220, 2010.

BRUM, V.S. et al. Uso de plantas medicinais por hipertensos assistidos em uma unidade básica de saúde de uruguaiana. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão.**, v. 8, n. 3, 2017.

BRUNING, T. A. et al. In vivo characterization of vasodilating muscarinic-receptor subtypes in humans. **Circulation research.**, v. 74, n. 5, p. 912-919, 1994.

CAMPOS, Débora Ribeiro. **Avaliação do efeito vascular do diterpeno esclareol em ratos normotensos e hipertensos.** 2017. 65 f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2017.

- CARNEIRO, F.M. et al., Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Rev Sapiê: Soc Sab Prát Educ.**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.
- CAULFIELD, M.P. Muscarinic receptors—characterization, coupling and function. **Pharmacology & therapeutics.**, v. 58, n. 3, p. 319-379, 1993.
- CEBALLOS G; GUTIÉRREZ SG, MEANEY E. The vascular endothelium: a review series I. Basic aspects of the vascular endothelium. **Rev Mex Cardiol.**, v.26, n.2, p. 95-100, 2015.
- CHAINANI-WU, Nita. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). **The Journal of Alternative & Complementary Medicine.**, v. 9, n. 1, p. 161-168, 2003.
- DA SILVA, W.M. et al., Conhecimento sobre as condições de saúde de policiais militares atuantes em uma Companhia Independente de Polícia Militar. **Revista Eletrônica Acervo Saúde.**, n. 19, p. e228-e228, 2019.
- DE GUSMÃO, J.L. et al. Adesão ao tratamento em hipertensão arterial sistólica isolada. **Revista Brasileira de Hipertensão.**, v. 16, n. 1, p. 38-43, 2009.
- DE SOUZA, E.B. Transição nutricional no Brasil: análise dos principais fatores. **Cadernos UniFOA.**, v. 5, n. 13, p. 49-53, 2017.
- DOMINGUES, X.A. Métodos de Investigação Fitoquímica. **Editorial Limusa.**, 1ed. 1973.
- DUARTE, O.O et al., Tratamento ambulatorial da hipertensão arterial sistêmica—revisão de literatura. **Revista UNINGÁ Review.**, v. 17, n. 2, 2018.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959.
- FILHO, A.B.C. et al., Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural.**, p. 171-177, 2000.
- FOSTER, A.S. Practical plant anatomy. **Princeton: D van Nostrand Company Inc.** 1949.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADSKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature Pittsfield.**, v. 288, p. 373-376, 1980.
- GRASSO, E.C; AOYAMA, E.M; FURLAN, M.R. AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA DE *Curcuma longa* L.(ZINGIBERACEAE). **Revista Eletrônica Thesis, São Paulo.**, n. 28, p. 117-129, 2017.
- GUIMARÃES, R.M. et al. Diferenças regionais na transição da mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil, 1980 a 2012. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 37, n. 2, p.83-89, 2015.
- KINUPP; LORENZI, G.A.D et al. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). **Revista Ciência em Extensão.**, v.6, n.2, p.143, 2014.

LAHLOU, S. et al. Rostrocaudal localization of cardiovascular responses induced by intrathecal administration of apomorphine in conscious, freely moving rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 16, n. 2, p. 331-337, 1990.

LOMBARDO, E.G. et al. Extracts and fractions from edible roots of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. with antihypertensive activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.**, v. 2014, 2014.

LONGO, M.A; MARTELLI, A.; ZIMMERMANN, A. Hipertensão Arterial Sistêmica: aspectos clínicos e análise farmacológica no tratamento dos pacientes de um setor de Psicogeriatria do Instituto Bairral de Psiquiatria, no Município de Itapira, SP. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia.**, v. 14, n. 2, p. 271-284, 2011.

LOPES, G.A.D et al. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). **Revista Ciência em Extensão.**, v.6, n.2, p.143, 2010.

MELO, Luciana Soares Furtado de. **As práticas integrativas complementares no cuidado pré-natal de risco habitual: uma revisão integrativa.**, 2017. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Saúde da Mulher da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro, 2017.

MENDES, G. M.; RODRIGUES, R. G.; CAMPIDELI, L. C. Evaluation of the content of antioxidants, flavonoids and phenolic compounds in culinary preparations. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais.**, v. 17, n. 2, p. 297-304, 2015.

MICHEL, A.D.; STEFANICH, E.; WHITING, R.L. Direct labeling of rat M3-muscarinic receptors by [3H] 4DAMP. **European journal of pharmacology.**, v. 166, n. 3, p. 459-466, 1989.

MONCADA, S; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine.**, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, 1993.

MOURA, I.H.D. et al. Prevalência de hipertensão arterial e seus fatores de risco em adolescentes. **Acta Paulista de Enfermagem.**, v.28 n.1, p. 81-6, 2015.

MOURA, I.H.D. et al. Prevalência de hipertensão arterial e seus fatores de risco em adolescentes. **Acta Paulista de Enfermagem.**, v.28 n.1, p. 81-6, 2015.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity—Fixed Dose Procedure. **Organisation for Economic Cooperation and Development.**, 2001.

OLIVEIRA G.M.M et al. Diretrizes de 2017 para manejo da hipertensão arterial em cuidados primários nos países de língua portuguesa. **Rev Port Cardiol.**, v. 6, n. 11, p. 789-798, 2017.

PACKIAVATHY, Issac Abraham Sybiya Vasantha et al. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin—an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. **Food chemistry**, v. 148, p. 453-460, 2014.

PEREIRA, Leonardo R.L. **Farmácia Clínica no Brasil: a formação de um profissional capacitado e seu impacto na construção de uma Assistência Farmacêutica de qualidade no Sistema Único de Saúde.** 2013. 53 f. Tese - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2013.

PINTO WJ, AREAS MA, REYES FGR. Óxido nítrico e o sistema vascular: uma revisão. **Acta Cient Biol Saud.**, v. 5, n.1, p.47-61, 2003.

POWERS, W.J. et al. American Heart Association/American Stroke Association focused update of the 2013 guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke regarding endovascular treatment: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke.**, v. 46, n. 10, p. 3020-3035, 2015.

RIQUE, A.B.R.; SOARES, E. D. A., MEIRELLES, C. D. M. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Revista Brasileira Medicina do Esporte.**, v. 8, n. 6, p. 244-54, 2002.

RODRIGUES, Karilane Maria Silvino. **Ação so Linalol sobre o sistema Cardiovascular de ratos normotensos.** Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológica) – Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza. 2010.

RODWELL VW, BENDER DA, BOTHAM KM, KENNELLY PJ, WEIL PA. Harper's illustrate biochemistry, 30<sup>a</sup> ed. New York: **McGraw Hill Global.**, 2015.

SAWYER, G.W.; LAMBRECHT, G.; EHLERT, J. Functional role of muscarinic M2 receptors in  $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene ATP induced, neurogenic contractions in guinea-pig ileum. **British journal of pharmacology.**, v. 129, n. 7, p. 1458-1464, 2000.

VENTURA, A.L.M.; ABREU, P.A.; FREITAS, R.C.C. Sistema colinérgico; revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo Colinergic system&58; revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Archives of Clinical Psychiatry.**, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.

YUE, G.G.L et al. Evaluation of in vitro anti-proliferative and immunomodulatory activities of compounds isolated from Curcuma longa. **Food and chemical toxicology.**, v. 48, n. 8-9, p. 2011-2020, 2010.

ZAFFARE, Denise. **Efeitos da ingestão de erva-mate e chá verde na função endotelial.** 2012. 65 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Medicina). Instituto de cardiologia do Rio Grande do Sul/ Fundação Universitária de Cardiologia. 2012.

## FABRICAÇÃO E ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE CERVEJA A PARTIR DO CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*)

Débora Taisa Keller da Silva<sup>1</sup>, Fernanda Rodrigues de Siqueira<sup>1</sup>, Stephanie Jedoz Stein<sup>1</sup>, Dandara da Silva Pereira<sup>1</sup>, Daniella da Silva Sousa<sup>1</sup>, José Antonio Avelar Baptista<sup>2</sup> Renato André Zan<sup>1</sup>

1. Instituto Federal de Rondônia (IFRO), Ji-Paraná, Rondônia, Brasil;
2. Instituto Federal do Mato Grosso do Sul (IFMS), Ponta Porã, Mato Grosso do Sul, Brasil.

### RESUMO

A cerveja é considerada uma das bebidas mais apreciadas em todo o mundo. O camu-camu (*Myrciaria dubia*) é uma fruta típica da região amazônica do Brasil e vem se destacando nos últimos anos pelo seu potencial antioxidante. A cerveja artesanal tem ganhado espaço no mercado cervejeiro. Baseando nesse crescimento, este trabalho teve o objetivo de produzir uma cerveja artesanal utilizando o camu-camu, podendo assim, através desta proposta valorizar os frutos da região e até mesmo garantir uma fonte de renda para os agricultores que comercializam estes frutos. A metodologia utilizada para a produção da cerveja com o camu-camu baseou-se em Vieira (2017) e Moura (2012) com adaptações, sendo que este fruto possui propriedades físico-químicas muito específicas. Após a fabricação da cerveja, foram avaliadas algumas características como: pH, grau Brix, densidade, acidez e teor alcoólico. Ao finalizar o processo fermentativo e comparar os resultados obtidos experimentalmente, confirma-se que os mesmos estão próximos ao padrão estipulado, sendo possível aplicar esta metodologia em cervejas artesanais frutadas.

**Palavras-chave:** Camu-camu, físico-química, cerveja artesanal.

### ABSTRACT

Beer is considered one of the most appreciated drinks in the world. The camu-camu (*Myrciaria dubia*) is a typical fruit from the Amazon region of Brazil and has been increasing its antioxidant potential in recent years. The artisan beer has gained space in the brewing market, based on this growth, this work had the objective of producing a craft beer using camu-camu, and thus, through this proposal can value the fruits of the region and even guarantee a source of income for farmers who market these fruits. The methodology used for the production of beer with camu-camu was based on VIEIRA (2017) and MOURA (2012) with adaptations, and this fruit has very specific physicochemical properties. After brewing, some characteristics such as pH, °Brix degree, density, acidity and alcohol content were evaluated. At the end of the fermentation process and to compare the results obtained experimentally, it is confirmed that they are close to the stipulated standard, being possible to apply this methodology in fruity artisan beers.

**Keywords:** Camu-camu, physicochemical, craft beer.

## 1. INTRODUÇÃO

Devido às condições climáticas, as regiões Norte e Nordeste do Brasil, apresentam uma variedade de espécies frutíferas tropicais nativas e exóticas, com boas perspectivas para utilização agroindustrial que até o momento são pouco exploradas (SOUZA FILHO et al., 2002).

Vários estudos foram divulgados sobre a preparação e caracterização de fermentados de frutas, onde podem ser citado o de cajá (DIAS, 2003), ata, ciriguela, mangaba (MUNIZ et al., 2002), caju (TORRES NETO et al., 2006), laranja (CORAZZA et al., 2001) e jabuticaba (ASQUIERI et al., 2004). Com isso, as indústrias de fermentados têm crescido com utilização de frutas características de cada região do país.

A cerveja, por exemplo, é a bebida alcoólica mais consumida no Brasil, segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Cerveja, em 2007, o Brasil estava entre os quatro maiores fabricantes de cerveja do mundo (SINDICERV, 2018). Dessa forma, há a necessidade dos cervejeiros buscarem inovações tecnológicas para seus processos.

A produção de cerveja artesanal na escala de microcervejaria já é bastante comercializada no estado de Rondônia, e com a adição da polpa de frutos que são diariamente consumidos e conhecidos na região, a tendência será de crescimento no ramo de produção e venda de cervejas artesanais frutadas.

Para isso, uma proposta seria a utilização do camu-camu (*Myrciaria dubia*) para fabricação de cerveja, tendo em vista, que é amplamente distribuído na Bacia Amazônica, com um grande potencial nutritivo e econômico. Além disso, é uma das plantas mais ricas em vitamina C e, é uma importante fonte de antioxidante natural.

Nesse sentido, avaliando os aspectos da fruta camu-camu, sua importância econômica na região, além das características da cerveja de frutas, este trabalho tem por objetivo apresentar a possibilidade de ofertar mais um produto oriundo dessa fruta, visto que trás ao mercado um produto inovador que tende a ganhar espaço pelos apreciadores de uma bebida encorpada e com um acentuado sabor frutado utilizando como matéria prima camu-camu.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A produção e as análises físico-químicas da cerveja a partir do fruto camu-camu (*Myrciaria dubia*) foram realizadas no Laboratório de Química Inorgânica do *Campus Ji-Paraná* do Instituto Federal de Rondônia.

## 2.1 PROCESSO DE PRODUÇÃO DA CERVEJA CAMU-CAMU

A metodologia utilizada no processo de produção foi de acordo com Vieira (2017) e Moura (2012), com adaptações.

### 2.1.1 Matéria-prima

As matérias-primas utilizadas na produção da cerveja artesanal foram: água, malte de cevada, cereais não maltados, levedura, lúpulo e polpa de camu-camu (*Myrciaria dubia*). Todas as matérias primas foram adquiridas com recursos da própria pesquisa.

### 2.1.2 Fabricação da cerveja

Para o preparo da cerveja artesanal frutada utilizou-se 2 kg de Malte Pilsen Agrária, 500 gramas de Malte Monique tipo II, 135 gramas de cereal Barley, 20 litros de água destilada, 15 gramas de lúpulo Columbus e 11 gramas de levedura.

O processo da fabricação iniciou-se na moagem dos maltes, sendo que cada tipo de malte necessitou de uma regulagem específica no moinho e após ser triturado reservou-se em recipientes.

A próxima etapa consistiu na mosturação, na qual adicionou água destilada em uma panela e aqueceu-a através de um aquecedor elétrico. Ao atingir 70°C, adicionaram-se lentamente os maltes e cereais, e, posteriormente, manteve durante uma hora a temperatura constante em 66°C.

Após esse procedimento realizou-se o teste do iodo, logo obteve uma recirculação de líquido até que não houvesse mais partículas em suspensão. Em seguida, o mesmo foi filtrado.

O mosto límpido e filtrado foi transferido para uma panela, a qual aqueceu-se durante 50 minutos com a tampa da panela aberta. No processo de aquecimento, adicionou-se também o lúpulo no mosto.

Com o término do aquecimento, adicionou-se a polpa da fruta ao mosto e submeteu-o em banho de gelo até atingir a temperatura de 30 C°, adicionando o fermento nesse momento.

Mais tarde, transferiu-se o mosto para o balde de fermentação, no qual permaneceu fechado durante 2 semanas sob temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) na primeira semana e de 16°C na segunda semana.

Após esse período o balde foi aberto, o líquido filtrado e transferido para uma panela, onde foi fervido com açúcar. Por fim, foi envasado, maturado e armazenado por 30 dias.

### 2.1.3 Caracterização físico-química da cerveja

As técnicas de análises físico-químicas basearam-se em metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

## 3. RESULTADO E DISCUSSÕES

### 3.1 DADOS ESTATÍSTICOS DA CERVEJA DURANTE O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

Durante o processo de fermentação da cerveja a partir do fruto camu-camu (*Myrciaria dubia*) foram feitas as análises físico-químicas periodicamente, registrando assim os dados obtidos (Tabela 1).

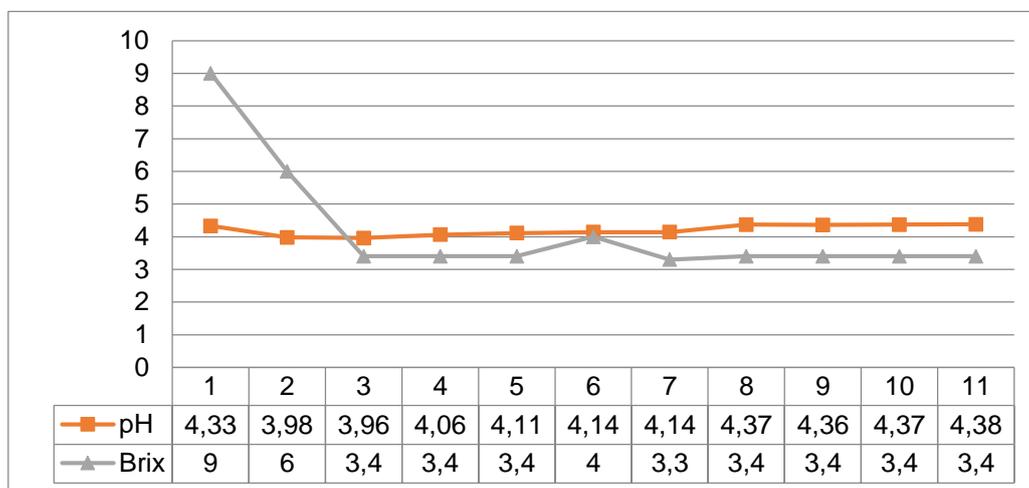
**Tabela 01** - Dados físico-químicos durante o processo de fermentação da cerveja.

<i>Densidade</i>	<i>pH</i>	<i>Acidez Total</i>	<i>Grau Brix</i>	<i>Temperatura °C</i>
1,0406	4,33	0,1252	9,0	27,35
1,0291	3,98	0,1471	6,0	27,01
1,0167	3,96	0,1550	3,4	26,08
1,0155	4,06	0,1680	3,4	25,07
1,0152	4,11	0,1434	3,4	27,08
1,0155	4,14	0,1308	4,0	22,09
1,0148	4,14	0,1512	3,3	23,02
1,0126	4,37	0,1528	3,4	23,09
1,0158	4,36	0,1539	3,4	22,01
1,0073	4,37	0,1587	3,4	23,03
0,9935	4,38	0,1615	3,4	22,07

Analisando os valores obtidos, constata-se que a levedura consome rapidamente os substratos, mostrando a redução do grau Brix de 9,0 para 3,4, sendo confirmado o consumo de açúcar e a produção de etanol e CO<sub>2</sub>.

Vale ressaltar que o ácido carbônico oriundo da fermentação do mosto eleva a acidez da bebida, entretanto existem outros ácidos presentes na cerveja que pertencem à

composição do mosto, e suas concentrações variam em função da matéria-prima e das condições de maltagem (SLEIMAN; VENTURINI FILHO, 2004).



**Figura 01** - Relação de pH e Brix.

O gráfico apresenta a relação do pH com o Brix, desde o momento em que a graduação alcoólica da cerveja com o fruto começou a ser medida a partir do tempo do primeiro dia.

Devido a oscilação do pH entre 4,33 e 4,38 durante o processo de fermentação, verifica-se, portanto que a sacarose inicial da cerveja (Brix) decai constantemente nos 5 primeiros dias até chegar em um ponto equilibrado no final da primeira semana onde a temperatura ambiente estava em torno de 25°C e permaneceu constante até o início da segunda semana em que a temperatura regulada para 16°C.

Por fim houve uma oscilação no Brix, onde ele decai por completo finalizando a degradação da sacarose pelas leveduras, nesse momento o pH aumenta, constatando a presença de etanol em função dos microrganismos.

O pH mostra que o ambiente está em condições essenciais de proliferação da levedura em relação a temperatura que esteve apropriada para favorecer o desenvolvimento da levedura.

A determinação do pH tem a finalidade de observar diariamente as ações enzimáticas em cada faixa de pH, sendo elas a redução de pH de 5,7 a 4,0 onde ocorre a transformação da maltose em álcool e CO<sub>2</sub> (CARVALHO, 2007).

## 4. CONCLUSÕES

Ao comparar os resultados obtidos, confirma-se que o fruto tem propriedades químicas essenciais para uma boa produção de bebidas alcoólicas, pois os resultados, como Brix e pH são bem próximos e ambos se encontram dentro do padrão estipulado.

Durante a fermentação alcoólica, obteve-se boa eficiência na transformação da sacarose em etanol. As análises físico-químicas mostraram que os valores são próximos aos estabelecidos pela Legislação Vigente e qualidade comparável a outros fermentados.

O camu-camu é uma fruta com um grande potencial comercial no Brasil, entretanto só é utilizado artesanalmente para consumo doméstico. A metodologia utilizada é satisfatoriamente aplicável na produção de cervejas artesanais, podendo ser comercializada por ser uma produção simples sendo uma prática viável originando um produto final de boa qualidade.

Ao comparar os resultados observou-se que a graduação alcoólica final estava de acordo com as cervejas artesanais produzidas por outros autores que tem um grau alcoólico um pouco mais alto do que as cervejas industriais.

A otimização do processo de fabricação está sendo desenvolvida para a obtenção de um grau alcoólico um pouco maior, a fim de classificar o fermentado como cerveja no estilo Fruit Beer.

## 5. REFERENCIAS

CARVALHO, L. G. **Dossiê Técnico - produção de cerveja.**, REDETEC: Rio de Janeiro, 2007.

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química Nova.**, v. 24, p. 449-452, 2001.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração do fermentado de cajá (*SpondiasmombinL.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n.3, p. 342–350, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.**, v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP, p. 332. 2008.

MUNIZ, C. R. et al. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos.**, v. 20, n. 2, p. 309–322, 2002.

SINDICERV. **Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja**. Disponível em: <[http://www.sindicerv.com.br/mercado/txt\\_mercado.htm](http://www.sindicerv.com.br/mercado/txt_mercado.htm)> acesso em 15/02/2018.

SOUZA FILHO, M.M.; LIMA, J.R.; NASSU, R.T.; BORGES, M.F.; MOURA, C.F.H. Avaliação Físico-química e Sensorial de Néctares de Frutas Nativas da Região Norte e Nordeste do Brasil: Estudo Exploratório. **Braz J Food Technol.**, v.5, p. 139-143. 2002.

TORRES NETO, A. B. et al. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale L.*). **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 489-492, 2006.

## COMPOSIÇÃO FLORÍSTICA E FITOSSOCIOLOGIA DE UM TRECHO DE MATA CILIAR NO RIO MACHADO, JI-PARANÁ (RONDÔNIA)

Lorena de Souza Tavares<sup>1</sup>, Gilmar Alves Lima Júnior<sup>1</sup>, Raimundo Gomes da Silva Junior<sup>1</sup>, Jocimar Rodrigues Coutinho Júnior<sup>1</sup>

1. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Ji-Paraná, Rondônia, Brasil;

### RESUMO

Este trabalho tem como objetivo avaliar a composição de espécies arbóreas e a estrutura da vegetação de um trecho de Área de Preservação Permanente (APP) do Rio Machado na cidade de Ji-Paraná – RO de forma a subsidiar projetos de recuperação de áreas degradadas no Rio Machado, em Ji-Paraná. A área apresentou elevada riqueza de espécies arbóreas e não apresenta espécies dominantes, conseqüentemente, considerável diversidade de espécies, o que justifica a conservação da área. Considerando a proximidade com o perímetro urbano, a área apresenta maior pressão nas bordas, contudo, no interior e proximidade com o leito do rio, está bem conservada.

**Palavras-chave:** Fitossociologia, mata ciliar e Amazônia.

### ABSTRACT

This work aims to evaluate the composition of tree species and vegetation structure of a section of the Permanent Preservation Area (APP) of Rio Machado in the city of Ji-Paraná - RO, in order to subsidize projects to recover degraded areas in Rio Machado, in Ji-Paraná. The area presented high tree species richness and does not present dominant species, consequently, a considerable diversity of species, which justifies the conservation of the area. Considering the proximity to the urban perimeter, the area presents greater pressure at the edges, however, in the interior and proximity to the river bed, is well preserved.

**Keywords:** Phytosociology, ciliary forest and Amazon.

## 1. INTRODUÇÃO

As áreas de preservação permanentes (APP) segundo o Código Florestal (Lei nº 12.651/2012) consistem em localidades protegidas, cobertas ou não por vegetação nativa, com o objetivo de preservar e resguardar o ambiente aquático, a paisagem, a estabilidade geológica, a biodiversidade, além de tornar mais fácil o fluxo gênico de fauna e flora, proteger o solo e assegurar o bem-estar da população humana.

A partir disto, entende-se que a vegetação natural, sendo arbórea ou não que está presente ao longo das margens dos rios, lagos, córregos, represas, ao redor de nascentes, de reservatórios, entre outros por lei, deve ser preservada (RICARDO, 2008).

Ao longo do processo de desenvolvimento socioeconômico do Brasil a ocupação de terras em sua maioria foi planejada sem considerar a importância de todo o ambiente terrestre, principalmente das matas ciliares, deixando em segundo plano o conceito de conservação ambiental e os objetivos expressos no código florestal.

Neste contexto, acumularam-se impactos ambientais em decorrência dos eventos que intensificam as mudanças ambientais em âmbito internacional, atividades envolvendo a pecuária, agricultura e principalmente o desmatamento descontrolado tornaram os solos mais susceptíveis a processos erosivos (STIPP; OLIVEIRA, 2004).

Com isso, ao passar dos anos, a preocupação com a conservação das matas ciliares vem se tornando foco de diversos estudos, visando conter a degradação ambiental que se firmou ao longo do processo histórico brasileiro. Várias plantações florestais vêm sendo estabelecidas desde o início do século XIX com muitas finalidades, incluindo as matas ciliares (CURY; CARVALHO JUNIOR, 2011). Estas possuem uma característica importante a ser levida em consideração no planejamento de recuperação, sendo à matriz vegetacional onde a localidade esta inserida para assim trabalhar com a espécies corretas para se obter um bom resultado que atenda aos objetivos de recuperação ambiental.

As matas ciliares, por sua vez, compõem uma formação florestal comum de áreas restritas ao longo dos corpos d'água e nascentes em lugares vulneráveis a inundações em períodos de chuva. Com isso, Durigan e Silveira (1999) ressaltam que as florestas ao longo dos corpos d'água desempenham função protetora sobre os recursos naturais bióticos e abióticos.

Além disto, a cobertura vegetal auxilia na fertilidade do solo por causa das folhas, frutos e outros materiais orgânicos, propiciando benefícios como proteção do solo contra a ação da chuva e do vento, diminuindo o feito erosivo destes. As espécies arbóreas ainda amortecem o impacto das gotas da chuva sobre o solo, ajudando na infiltração da água, o que diminui o escoamento superficial.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar a composição de espécies arbóreas e a estrutura da vegetação de um trecho de Área de Preservação Permanente (APP) do Rio Machado na cidade de Ji-Paraná – RO de forma a subsidiar projetos de recuperação de áreas degradadas no Rio Machado, em Ji-Paraná.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A área de estudo está localizada na área urbana do município de Ji-Paraná, às margens do Rio Machado, entre o anel viário e a RO – 135, que liga a sede do município ao distrito de Nova Londrina.

Para a coleta de dados fitossociológicos foi utilizando o método de parcelas múltiplas (Muller-Dombois e Ellenberg, 1974), incluindo todos os indivíduos arbóreos com diâmetro a altura do peito (DAP)  $\geq 5\text{cm}$ , medindo o diâmetro e estimando a altura. Foram amostradas 16 parcelas de  $25\text{m}^2$ , totalizando um hectare. As parcelas foram distribuídas aleatoriamente, considerando a tipologia vegetal e a proximidade com as margens do Rio Machado.

A lista florística das espécies arbóreas foi elaborada a partir da identificação de todos os indivíduos amostrados na área, dentro do nível de inclusão acima mencionado. O material botânico coletado foi identificado pela equipe do Laboratório de Botânica e Ecologia (LABEC) do Instituto Federal de Rondônia (IFRO) – *Campus Ji-Paraná* em campo e com auxílio de literatura especializada.

A validação dos nomes das espécies, autores e a exclusão das sinonímias botânicas foram definidos em consultas ao Vast (2007). A lista de espécies foi preparada em ordem alfabética de famílias de acordo com *Angiosperm Phylogeny Group* (APG) atualizado em APG II (2003). O material fértil foi coletado de acordo com Fidalgo e Bononi (1984) e depositado na Coleção Botânica do LABEC.

Para a estrutura da vegetação, as estimativas foram realizadas de acordo com a proposta por Mueller-Dombois e Ellenberg (1974). Onde foram estimados os valores absolutos e relativos de densidade, frequência e dominância. A soma desses parâmetros resultou no valor de importância (VI) das espécies. Todos os cálculos das análises fitossociológicas e dos índices de diversidade foram obtidos por meio do software Mata Nativa (CIENITEC 2006).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. COMPOSIÇÃO FLORÍSTICA

Foram amostradas 165 espécies distribuídas em 111 gêneros, 40 famílias botânicas e duas morfoespécies. Os gêneros com maior número de espécies foram *Inga* (10

espécies), *Pouteria* (6 ssp.) e *Attalea* (4 ssp.). O Quadro 1 mostra a lista florística obtida com os resultados do trabalho, evidenciando as espécies encontradas e suas respectivas famílias.

**Quadro 1.** Composição florística de espécies arbóreas amostradas nas margens do Rio Machado, município de Ji-Paraná, RO.

<b>Família</b>	<b>Nome científico</b>
Achariaceae	<i>Lindackeria paludosa</i> (Benth.) Gilg
Anacardiaceae	<i>Astronium gracile</i> Engl.
	<i>Spondias mombin</i> L.
	<i>Spondias</i> sp.
	<i>Tapirira obtusa</i> (Benth.) J.D. Mitch.
Annonaceae	cf. <i>Guatteria pleiocarpa</i> Diels
	<i>Duguetia stelechantha</i> (Diels) R.E. Fr.
	<i>Ephedranthus</i> sp.
	<i>Guatteria foliosa</i> Benth.
	<i>Guatteria olivacea</i> R.E. Fr.
	<i>Rollinia</i> sp.
	<i>Xylopia</i> sp.
Apocynaceae	<i>Aspidosperma parvifolium</i> A. DC.
Apocynaceae	<i>Himatanthus sucuuba</i> (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson
Arecaceae	<i>Astrocaryum aculeatissimum</i> (Schott) Burret
	<i>Astrocaryum aculeatum</i> G. Mey.
	<i>Astrocaryum jauari</i> Mart.
	<i>Attalea maripa</i> (Aubl.) Mart.
	<i>Attalea phalerata</i> Mart. ex Spreng.
	<i>Attalea</i> sp.
	<i>Attalea speciosa</i> Mart. ex Spreng.
	<i>Euterpe precatória</i> Mart.
	<i>Syagrus comosa</i> (Mart.) Mart.
Bignoniaceae	<i>Handroanthus roseo-albus</i> (Ridl.) Mattos
	<i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart.
	<i>Jacaranda</i> sp.
Bixaceae	<i>Cochlospermum orinocense</i> (Kunth) Steud.
Malvaceae	<i>Chorisia</i> sp.
	<i>Chorisia speciosa</i> A. St.-Hil.
Boraginaceae	<i>Cordia fallax</i> I.M. Johnst.
	<i>Cordia panicularis</i> Rudge
	<i>Cordia sellowiana</i> Cham.

Burseraceae	<i>Protium occultum</i> Daly
	<i>Protium</i> sp.
	<i>Protium subserratum</i> (Engl.) Engl.
Urticaceae	<i>Cecropia</i> cf. <i>pachystachya</i> Trécul
	<i>Cecropia purpurascens</i> C.C. Berg
	<i>Cecropia sciadophylla</i> Mart.
	<i>Pourouma cecropiifolia</i> Mart.
	<i>Pourouma ovata</i> Trécul
Chrysobalanaceae	<i>Hirtella</i> sp.
	<i>Licania octandra</i> (Hoffmanns. ex Roem. e Schult.) Kuntze
	<i>Licania reticulata</i> Prance
	<i>Licania sprucei</i> (Hook. f.) Fritsch
Clusiaceae	<i>Garcinia madruno</i> (Kunth) Hammel
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum mucronatum</i> Benth.
Euphorbiaceae	<i>Alchornea floribunda</i> Müll. Arg.
	<i>Hevea brasiliensis</i> (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.
	<i>Hevea spruceana</i> (Benth.) Müll. Arg.
	<i>Pogonophora schomburgkiana</i> Miers ex Benth.
	<i>Sapium marmieri</i> Huber
Fabaceae	<i>Abarema piresii</i> Barneby e J.W. Grimes
	<i>Acosmium nitens</i> (Vogel) Yakovlev
	<i>Andira unifoliolata</i> Ducke
	<i>Bauhinia acreana</i> Harms
	<i>Cassia fastuosa</i> Willd. ex Vogel
	<i>Chamaecrista negrensis</i> (H.S. Irwin) H.S. Irwin e Barneby
	<i>Colubrina glandulosa</i> Perkins
	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.
	<i>Dialium guianense</i> (Aubl.) Sandwith
	<i>Erythrina fusca</i> Lour.
	<i>Hymenaea reticulata</i> Ducke
	<i>Inga cayennensis</i> Sagot ex Benth.
	<i>Inga grandiflora</i> Ducke
	<i>Inga huberi</i> Ducke
	<i>Inga leiocalycina</i> Benth.
	<i>Inga marginata</i> Willd.
	<i>Inga melinonis</i> Sagot
	<i>Inga obidensis</i> Ducke
	<i>Inga rhynchocalyx</i> Sandwith
	<i>Inga rubiginosa</i> (Rich.) DC.
<i>Inga</i> sp.	
<i>Maclobium acaciifolium</i> (Benth.) Benth.	

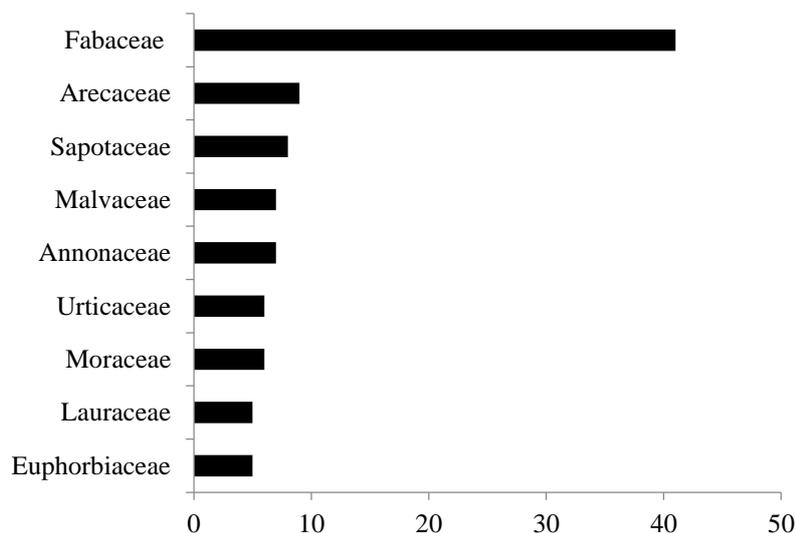
	<i>Macrolobium</i> sp.
	<i>Parkia igneiflora</i> Ducke
	<i>Piptadenia suaveolens</i> Miq.
	<i>Platimicium</i> sp.
	<i>Poecilanthe effusa</i> (Huber) Ducke
	<i>Pterocarpus amazonicus</i> Huber
	<i>Pterocarpus santalinoides</i> L'Hér. ex DC.
	<i>Pterodon pubescens</i> (Benth.) Benth.
	<i>Schizolobium parahyba</i> (Vell.) S.F. Blake
	<i>Senegalia polyphylla</i> (DC.) Britton
	<i>Senna macranthera</i> (DC. ex Collad.) H.S. Irwin e Barneby
	<i>Senna multijuga</i> (Rich.) H.S. Irwin e Barneby
	<i>Stryphnodendron pulcherrimum</i> (Willd.) Hochr.
	<i>Swartzia corrugata</i> Benth.
	<i>Swartzia cuspidata</i> Spruce ex Benth.
	<i>Swartzia polyphylla</i> DC.
	<i>Tachigali myrmecophila</i> (Ducke) Ducke
	<i>Zygia juruana</i> (Harms) L. Rico
	Morfoespécie 1
Lauraceae	<i>Licaria guianensis</i> Aubl.
	<i>Mezilaurus itauba</i> (Meisn.) Taub. ex Mez
	<i>Nectandra cymbarum</i> (Kunth) Nees
	<i>Pleurothyrium vasquezii</i> van der Werff
	<i>Rhodostemonodaphne grandis</i> (Mez) Rohwer
Lecythidaceae	<i>Eschweilera coriacea</i> (DC.) S.A. Mori
	<i>Gustavia longifolia</i> Poepp. ex O. Berg
	<i>Lecythis pisonis</i> Cambess.
Malpighiaceae	<i>Pterandra arborea</i> Ducke
Malvaceae	<i>Eriotheca globosa</i> (Aubl.) A. Robyns
	<i>Guazuma</i> sp.
	<i>Luehea divaricata</i> Mart.
	<i>Mollia lepidota</i> Spruce ex Benth.
	<i>Pachira faroensis</i> (Ducke) W.S. Alverson
Melastomataceae	<i>Mouriri dimorphandra</i> Morley
Meliaceae	<i>Cedrela fissilis</i> Vell.
	<i>Guarea guidonia</i> (L.) Sleumer
	<i>Guarea humaitensis</i> T.D. Penn.
	<i>Trichilia schomburgkii</i> C. DC.
Moraceae	<i>Brosimum guianense</i> (Aubl.) Huber
	<i>Brosimum longifolium</i> Ducke
	<i>Ficus capensis</i> Thunb.

	<i>Ficus gomelleira</i> Kunth e C.D. Bouché
	<i>Maquira guianensis</i> Aubl.
	<i>Naucleopsis ternstroemiiflora</i> (Mildbr.) C.C. Berg
Myristicaceae	<i>Virola calophylla</i> (Spruce) Warb.
Myrtaceae	<i>Eugenia omissa</i> McVaugh
	<i>Eugenia patrisii</i> Vahl
	<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.
Nyctaginaceae	<i>Neea floribunda</i> Poepp. e Endl.
	<i>Neea oppositifolia</i> Ruiz e Pav.
	<i>Neea ovalifolia</i> Spruce ex J.A. Schmidt
Ochnaceae	<i>Ouratea odora</i> Poepp. ex Engl.
Olacaceae	<i>Dulacia guianensis</i> (Engl.) Kuntze
	<i>Heisteria laxiflora</i> Engl.
Phyllanthaceae	<i>Margaritaria</i> sp.
Polygonaceae	<i>Coccoloba</i> sp.
	<i>Ruprechtia laxiflora</i> Meisn.
	<i>Triplaris americana</i> L.
	<i>Triplaris guanaiensis</i> Rusby
Rubiaceae	<i>Amaioua guianensis</i> Aubl.
	<i>Chomelia</i> sp.
	<i>Genipa americana</i> L.
	<i>Genipa spruceana</i> Steyerm.
Rutaceae	<i>Zanthoxylum djalma-batistae</i> (Albuq.) P.G. Waterman
	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam.
	<i>Zanthoxylum riedelianum</i> Engl.
Sabiaceae	Morfoespécie 2
	<i>Banara guianensis</i> Aubl.
	<i>Homalium guianense</i> (Aubl.) Oken
Sapindaceae	<i>Allophylus latifolius</i> Huber
	<i>Matayba guianensis</i> Aubl.
	<i>Pseudima</i> sp.
	<i>Vouarana guianensis</i> Aubl.
Sapotaceae	<i>Ecclinusa</i> sp.
	<i>Pouteria caimito</i> (Ruiz e Pav.) Radlk.
	<i>Pouteria eugeniifolia</i> (Pierre) Baehni
	<i>Pouteria krukovii</i> (A.C. Sm.) Baehni
	<i>Pouteria longifolia</i> (Mart. e Eichler) T.D. Penn.
	<i>Pouteria macrophylla</i> (Lam.) Eyma
	<i>Pouteria platyphylla</i> (A.C. Sm.) Baehni
<i>Pradosia cochlearia</i> (Lecomte) T.D. Penn.	
Sterculiaceae	<i>Sterculia frondosa</i> Rich.

	<i>Sterculia pruriens</i> (Aubl.) K. Schum.
	<i>Theobroma cacao</i> L.
	<i>Theobroma speciosum</i> Willd. ex Spreng.
Tiliaceae	<i>Apeiba tibourbou</i> Aubl.
Verbenaceae	<i>Vitex sprucei</i> Briq.
Violaceae	<i>Leonia glycyarpa</i> Ruiz e Pav.
Vochysiaceae	<i>Qualea</i> sp.
	<i>Vochysia guianensis</i> Aubl.
	<i>Vochysia</i> sp.
Rubiaceae	<i>Faramea</i> sp.
Indeterminada	Morfoespécie 3
Indeterminada	Morfoespécie 4

A riqueza de espécies foi menor do que a encontrada em outros estudos em ambientes florestais com proximidade com o leito de rios, no estado de Rondônia, onde Casulo (2012) cita 476 espécies em 33 hectares e Moser (2013) amostrou 279 em 20 hectares. Contudo, é necessário citar que a amostragem neste estudo foi de apenas uma hectare.

De acordo com a Figura 1, as famílias botânicas com maior riqueza foram Fabaceae (41 espécies), seguida por Arecaceae (13 spp.) e Sapotaceae (10 spp.).



**Figura 1** – Principais famílias botânicas, em riqueza de espécies, amostradas em um trecho de Floresta Ciliar do Rio Machado, município de Ji-Paraná, RO.

A riqueza de espécies e densidade elevada de indivíduos do gênero *Inga* é esperada para as florestas ripárias, de galeria ou ciliar da região, contudo, a ocorrência de dez espécies diferentes é uma característica a ser destacada.

Quanto a florística, em nível de família, os dados corroboram os resultados e discussão apresentados pelo Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas - INPA (2005) *apud* Salomão e Lisboa (1988) em três trechos de Floresta de Terra firme amostrados entre Ariquemes e Ouro Preto do Oeste, Ji-Paraná e Alvorada do Oeste, Jaru e Ouro Preto do Oeste, onde os autores citam as famílias Fabaceae e Moraceae como as mais importantes nas fitofisionomias amostradas.

### 3.2 FITOSSOCIOLOGIA

No Quadro 2 é apresentada a tabela fitossociológica, ordenada em valor decrescente de valor de importância (VI), onde as cinco espécies no topo da tabela corresponde apenas a aproximadamente 21%, os dados apontam que não há predominância, nem tampouco monodominância de espécies.

**Quadro 2.** Parâmetros fitossociológicos de um trecho de vegetação de Floresta ciliar no Rio Machado, município de Ji-Paraná, RO.

Nome Científico	N	U	AB	DR	FR	DoR	VI (%)
<i>Schizolobium parahyba</i>	25	5	5,947	5,08	1,72	19,68	8,83
<i>Attalea speciosa</i>	26	9	2,751	5,28	3,09	9,11	5,83
<i>Spondias mondim</i>	16	7	1,377	3,25	2,41	4,56	3,41
<i>Apeiba tiborbaw</i>	11	7	0,922	2,24	2,41	3,05	2,56
mortos	13	8	0,691	2,64	2,75	2,29	2,56
<i>Bauhinia acreana</i>	15	8	0,240	3,05	2,75	0,79	2,20
<i>Vitex sprucei</i>	11	2	0,918	2,24	0,69	3,04	1,99
<i>Atallea phalerata</i>	6	4	0,987	1,22	1,37	3,27	1,95
<i>Orbynia speciosa</i>	9	3	0,843	1,83	1,03	2,79	1,88
<i>Sapium marmieri</i>	11	4	0,600	2,24	1,37	1,98	1,86
<i>Myrcia splendens</i>	15	4	0,319	3,05	1,37	1,06	1,83
<i>Astrocaryum aculeatissimum</i>	10	6	0,253	2,03	2,06	0,84	1,64
<i>Platimicium sp.</i>	6	4	0,690	1,22	1,37	2,28	1,63
<i>Protimum subserratum</i>	8	6	0,279	1,63	2,06	0,92	1,54
<i>Zanthoxylum riedelianum</i>	3	2	0,802	0,61	0,69	2,65	1,32
<i>Colubrina glandulosa</i>	7	3	0,452	1,42	1,03	1,50	1,32
<i>Chorisia spectabilis</i>	6	2	0,609	1,22	0,69	2,02	1,31
<i>Theobroma cacao</i>	6	3	0,499	1,22	1,03	1,65	1,30
<i>Copaifera langsdorfii</i>	2	2	0,809	0,41	0,69	2,68	1,26
<i>Attalea maripa</i>	4	2	0,549	0,81	0,69	1,82	1,11
<i>Himatanthus sucuuba</i>	8	3	0,197	1,63	1,03	0,65	1,10

<i>Licania octandra</i>	4	2	0,431	0,81	0,69	1,43	0,98
<i>Margaritaria</i> sp.	9	1	0,104	1,83	0,34	0,34	0,84
<i>Coclospermum orinocensis</i>	5	2	0,237	1,02	0,69	0,78	0,83
<i>Pourouma cecropifolia</i>	6	3	0,062	1,22	1,03	0,20	0,82
<i>Ecclinusa</i> sp.	5	3	0,100	1,02	1,03	0,33	0,79
<i>Pouteria macrophylla</i>	4	3	0,144	0,81	1,03	0,48	0,77
<i>Hevea spruceana</i>	6	1	0,224	1,22	0,34	0,74	0,77
<i>Hirtella</i> sp.	4	3	0,136	0,81	1,03	0,45	0,76
<i>Macrobium acaciifolium</i>	3	2	0,299	0,61	0,69	0,99	0,76
<i>Aspidosperma parvifolia</i>	6	1	0,204	1,22	0,34	0,68	0,75
Morfoespécie 2	5	2	0,160	1,02	0,69	0,53	0,74
<i>Inga grandiflora</i>	6	1	0,162	1,22	0,34	0,54	0,70
<i>Lindacheria paludosa</i>	4	3	0,071	0,81	1,03	0,23	0,69
<i>Poecilanthus effusa</i>	4	3	0,049	0,81	1,03	0,16	0,67
<i>Handroanthus roseoalba</i>	4	2	0,151	0,81	0,69	0,50	0,67
<i>Inga huberi</i>	3	3	0,084	0,61	1,03	0,28	0,64
<i>Pterocarpus amazonicus</i>	4	2	0,106	0,81	0,69	0,35	0,62
<i>Qualea</i> sp.	2	2	0,223	0,41	0,69	0,74	0,61
<i>Mollia lepidota</i>	3	2	0,147	0,61	0,69	0,49	0,59
<i>Chorisia speciosa</i>	2	2	0,206	0,41	0,69	0,68	0,59
<i>Hevea brasiliensis</i>	2	2	0,201	0,41	0,69	0,67	0,59
<i>Pterandra arborea</i>	5	1	0,111	1,02	0,34	0,37	0,58
<i>Piptademia suaveolens</i>	2	1	0,286	0,41	0,34	0,95	0,57
<i>Virola calophylla</i>	3	2	0,078	0,61	0,69	0,26	0,52
<i>Cordia fallax</i>	3	2	0,060	0,61	0,69	0,20	0,50
<i>Pachira globosa</i>	2	2	0,114	0,41	0,69	0,38	0,49
<i>Genipa americana</i>	2	2	0,106	0,41	0,69	0,35	0,48
<i>Erythrina fusca</i>	2	2	0,102	0,41	0,69	0,34	0,48
<i>Vouarana guianensis</i>	3	2	0,040	0,61	0,69	0,13	0,48
<i>Qualea guianensis</i>	1	1	0,246	0,2	0,34	0,82	0,45
<i>Ruprechtia laxiflora</i>	3	1	0,122	0,61	0,34	0,40	0,45
<i>Cordia paniculares</i>	2	2	0,074	0,41	0,69	0,25	0,45
<i>Faramea</i> sp.	2	2	0,058	0,41	0,69	0,19	0,43
<i>Guarea guidonea</i>	2	2	0,056	0,41	0,69	0,18	0,43
<i>Cecropia pachystachya</i>	3	1	0,098	0,61	0,34	0,33	0,43
<i>Handroanthus rosealla</i>	1	1	0,219	0,20	0,34	0,73	0,42
<i>Cordia selowiana</i>	2	2	0,049	0,41	0,69	0,16	0,42
<i>Euterpe precatória</i>	2	2	0,045	0,41	0,69	0,15	0,41
<i>Senegalia polyphylla</i>	2	2	0,039	0,41	0,69	0,13	0,41
<i>Matayba guianensis</i>	3	1	0,074	0,61	0,34	0,24	0,40
<i>Neea oppositifolia</i>	2	2	0,029	0,41	0,69	0,10	0,40
<i>Pseudima folioides</i>	2	2	0,027	0,41	0,69	0,09	0,39
<i>Tachigali mymercophila</i>	2	2	0,021	0,41	0,69	0,07	0,39
<i>Triplaris americana</i>	2	2	0,017	0,41	0,69	0,06	0,38
<i>Attalea</i> sp.	2	1	0,115	0,41	0,34	0,38	0,38
<i>Pouteria krukovii</i>	3	1	0,053	0,61	0,34	0,18	0,38
<i>Dulacia guianensis</i>	2	1	0,108	0,41	0,34	0,36	0,37
<i>Astrocaryum jauari</i>	1	1	0,167	0,20	0,34	0,55	0,37

<i>Licania reticulata</i>	2	1	0,100	0,41	0,34	0,33	0,36
<i>Inga obidensis</i>	3	1	0,039	0,61	0,34	0,13	0,36
<i>Cecropia purpurascens</i>	2	1	0,097	0,41	0,34	0,32	0,36
<i>Eugenia patrisii</i>	3	1	0,027	0,61	0,34	0,09	0,35
<i>Hidrocorea inundata</i>	2	1	0,086	0,41	0,34	0,29	0,35
<i>Pachira faroensis</i>	1	1	0,132	0,20	0,34	0,44	0,33
<i>Theobroma speciosa</i>	1	1	0,128	0,20	0,34	0,42	0,32
<i>Pogonophora schomburgkiana</i>	2	1	0,066	0,41	0,34	0,22	0,32
<i>Banara guianensis</i>	1	1	0,126	0,20	0,34	0,42	0,32
<i>Pleurothyrium vasquezii</i>	2	1	0,057	0,41	0,34	0,19	0,31
<i>Brosimum guianensis</i>	2	1	0,051	0,41	0,34	0,17	0,31
<i>Maquira guianensis</i>	1	1	0,107	0,20	0,34	0,35	0,30
<i>Heisteria laxiflora</i>	2	1	0,042	0,41	0,34	0,14	0,30
<i>Senna sp.</i>	1	1	0,098	0,20	0,34	0,32	0,29
<i>Trichilia schomburgkii</i>	2	1	0,030	0,41	0,34	0,10	0,28
<i>Licaria guianenses</i>	2	1	0,026	0,41	0,34	0,09	0,28
<i>Pradosia cocliata</i>	1	1	0,083	0,20	0,34	0,27	0,27
<i>Jacaranda sp.</i>	1	1	0,076	0,20	0,34	0,25	0,27
<i>Neea floribunda</i>	1	1	0,073	0,20	0,34	0,24	0,26
<i>Vochysia sp.</i>	1	1	0,073	0,20	0,34	0,24	0,26
<i>Ficus capensis</i>	1	1	0,069	0,20	0,34	0,23	0,26
<i>Pterodon pubescens</i>	1	1	0,069	0,20	0,34	0,23	0,26
<i>Spondias sprucei</i>	1	1	0,063	0,20	0,34	0,21	0,25
<i>Zanthoxylum djalma-batistae</i>	1	1	0,062	0,20	0,34	0,20	0,25
<i>Pouteria longifolia</i>	1	1	0,060	0,20	0,34	0,20	0,25
<i>Pourouma ovata</i>	1	1	0,056	0,20	0,34	0,19	0,24
<i>Hidrocoria inundata</i>	1	1	0,048	0,20	0,34	0,16	0,24
<i>Astrocaryum vulgare</i>	1	1	0,046	0,20	0,34	0,15	0,23
<i>Swartzia corrugata</i>	1	1	0,046	0,20	0,34	0,15	0,23
<i>Dialium guianensis</i>	1	1	0,044	0,20	0,34	0,14	0,23
<i>Neea ovalifolia</i>	1	1	0,044	0,20	0,34	0,14	0,23
<i>Nectandra cymbarum</i>	1	1	0,041	0,20	0,34	0,14	0,23
<i>Astrocarium aculeatum</i>	1	1	0,040	0,20	0,34	0,13	0,23
<i>Parkia igneiflora</i>	1	1	0,037	0,20	0,34	0,12	0,22
<i>Mouriri dimorphandra</i>	1	1	0,036	0,20	0,34	0,12	0,22
<i>Sterculia frondosa</i>	1	1	0,036	0,20	0,34	0,12	0,22
<i>Xylopia sp.</i>	1	1	0,036	0,20	0,34	0,12	0,22
<i>Inga leiocalycina</i>	1	1	0,035	0,20	0,34	0,11	0,22
<i>Abarema piresii</i>	1	1	0,034	0,20	0,34	0,11	0,22
<i>Duguetia stelechantha</i>	1	1	0,032	0,20	0,34	0,10	0,22
<i>Inga rhynchocalix</i>	1	1	0,031	0,20	0,34	0,10	0,22
<i>Hymenaea reticulata</i>	1	1	0,030	0,20	0,34	0,10	0,21
<i>Rollinia neoinsignes</i>	1	1	0,029	0,20	0,34	0,09	0,21
<i>Genipa spruceana</i>	1	1	0,028	0,20	0,34	0,09	0,21
<i>Lecythis pisonis</i>	1	1	0,026	0,20	0,34	0,09	0,21
<i>Guatteria olivacea</i>	1	1	0,026	0,20	0,34	0,09	0,21
<i>Tapirira retusa</i>	1	1	0,025	0,20	0,34	0,08	0,21
<i>Pouteria caimito</i>	1	1	0,024	0,20	0,34	0,08	0,21

<i>Rodosthemonodaphyne grandis</i>	1	1	0,023	0,20 0	0,34	0,08	0,21
<i>Senna macranthera</i>	1	1	0,023	0,20	0,34	0,08	0,21
<i>Syagrus comosa</i>	1	1	0,023	0,20	0,34	0,08	0,21
<i>Acosmium nitens</i>	1	1	0,022	0,20	0,34	0,07	0,21
<i>Jacaranda cuspidifolia</i>	1	1	0,022	0,20	0,34	0,07	0,21
<i>Stryphnodendron pulcherrimum</i>	1	1	0,022	0,20	0,34	0,07	0,21
<i>Cecropia sciadophylla</i>	1	1	0,021	0,20	0,34	0,07	0,21
<i>Guazuma sp.</i>	1	1	0,021	0,20	0,34	0,07	0,21
<i>Ouratea odora</i>	1	1	0,020	0,20	0,34	0,07	0,20
<i>Macrolobium multipinata</i>	1	1	0,020	0,20	0,34	0,07	0,20
<i>Zygia juruana</i>	1	1	0,020	0,20	0,34	0,07	0,20
<i>Licania sprucei</i>	1	1	0,018	0,20	0,34	0,06	0,20
<i>Piptadenia suaveolens</i>	1	1	0,018	0,20	0,34	0,06	0,20
<i>Cecropia sciadophylla</i>	1	1	0,018	0,20	0,34	0,06	0,20
<i>Eugenia omissa</i>	1	1	0,017	0,20	0,34	0,06	0,20
<i>Pterocarpus santalinoides</i>	1	1	0,017	0,20	0,34	0,06	0,20
<i>Ficus gomeleira</i>	1	1	0,016	0,20	0,34	0,05	0,20
<i>Alchorneopsis floribunda</i>	1	1	0,015	0,20	0,34	0,05	0,20
<i>Alophyllus latifolia</i>	1	1	0,015	0,20	0,34	0,05	0,20
<i>Cedrela fissilis</i>	1	1	0,015	0,20	0,34	0,05	0,20
<i>Pouteria eugenifolia</i>	1	1	0,015	0,20	0,34	0,05	0,20
<i>Chamaecrista negrensis</i>	1	1	0,013	0,20	0,34	0,04	0,20
<i>Erythroxylum mucronatum</i>	1	1	0,013	0,20	0,34	0,04	0,20
<i>Inga melinonis</i>	1	1	0,013	0,20	0,34	0,04	0,20
<i>Inga paraense</i>	1	1	0,013	0,20	0,34	0,04	0,20
<i>Luehopsis divaricata</i>	1	1	0,013	0,20	0,34	0,04	0,20
<i>Swartzia cuspidata</i>	1	1	0,013	0,20	0,34	0,04	0,20
<i>Amaioua guianensis</i>	1	1	0,012	0,20	0,34	0,04	0,20
<i>Eschweilera coriacea</i>	1	1	0,012	0,20	0,34	0,04	0,20
<i>Inga marginata</i>	1	1	0,012	0,20	0,34	0,04	0,20
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	1	1	0,012	0,20	0,34	0,04	0,20
<i>Andira unifoliata</i>	1	1	0,011	0,20	0,34	0,04	0,19
<i>Bainiea acreana</i>	1	1	0,011	0,20	0,34	0,04	0,19
<i>Leonia glycyarpa</i>	1	1	0,011	0,20	0,34	0,04	0,19
<i>Triplaris guianensis</i>	1	1	0,011	0,20	0,34	0,04	0,19
<i>Coccoloba sp.</i>	1	1	0,011	0,20	0,34	0,04	0,19
<i>Inga cayennensis</i>	1	1	0,011	0,20	0,34	0,04	0,19
<i>Neea ovafolia</i>	1	1	0,011	0,20	0,34	0,04	0,19
<i>Senna multijulga</i>	1	1	0,011	0,20	0,34	0,04	0,19
<i>Astronum gracile</i>	1	1	0,010	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Ephedrandus sp.</i>	1	1	0,010	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Inga umbratica</i>	1	1	0,010	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Mezilaurus itauba</i>	1	1	0,010	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Protium oculatum</i>	1	1	0,010	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Homalium guianensis</i>	1	1	0,010	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Protium sp.</i>	1	1	0,010	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Coccoloba sp.</i>	1	1	0,009	0,20	0,34	0,03	0,19

<i>Naocleopsis ternstroemiiflora</i>	1	1	0,009	0,20	0,34	0,03	0,19
Sabiaceae	1	1	0,009	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Swartzia polyphylla</i>	1	1	0,009	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Chomelia</i> sp.	1	1	0,009	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Brosimum longifolium</i>	1	1	0,008	0,20	0,34	0,03	0,19
Morfoespécie 1	1	1	0,008	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Guarea humaitensis</i>	1	1	0,008	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Guatteria foliosa</i>	1	1	0,008	0,20	0,34	0,03	0,19
Morfoespécie 3	1	1	0,008	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Pradosia cochlearia</i>	1	1	0,008	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Inga rubiginosa</i>	1	1	0,008	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Sterculia pruriens</i>	1	1	0,008	0,20	0,34	0,03	0,19
<i>Bocageopsis pleiocarpa</i>	1	1	0	0,20	0,34	0	0,18
Morfoespécie 4	1	1	0	0,20	0,34	0	0,18
	492	17	30,214	100	100	100	c

Os indivíduos da espécie *Schizolobium parahyba* que domina a vegetação estudada possui o maior número de indivíduos, com grande porte, características que justificam a posição da espécie no topo da tabela fitossociológica. Contudo, quanto a frequência, a maior parte dos indivíduos estavam localizados em áreas mais altas, distantes da margem do Rio Machado e área de alagamento. Também é importante citar que esta espécie possui como estratégia de reprodução o elevado número de sementes e dispersão pelo vento.

Quanto a estrutura horizontal da vegetação estudada no Rio Machado não possui similaridade com demais áreas próximas, de acordo com dados apresentados por INPA (2005) *apud* Salomão e Lisboa (1988), contudo, não há dados na região sobre áreas de mata ciliar ou de galeria para discussão.

Nos demais estudos na região, com áreas de floresta, nos trechos amostrados durante o projeto POLONOROESTE, ao longo das rodovias federais, no município de Ji-Paraná (SALOMÃO; LISBOA, 1988), os autores encontraram elevada diversidade, riqueza de espécies, biomassa e volume de madeira. Maciel e Lisboa (1989) amostraram uma área com alta densidade de *Theobroma cacao*, baixa densidade de espécies com madeiras de interesse econômico, em uma área próxima ao município de Presidente Médici para conservação. Procurando avaliar o grau de impacto da colonização no Estado, sobre as florestas nativas, Lisboa (1989) estudou uma floresta secundária ao longo da Rodovia Estadual 429, entre os municípios de Presidente Médici e Costa Marques, citando uma drástica alteração na composição florística e biomassa, mas ainda um potencial econômico

para os colonos da região. Na Reserva Biológica do Guaporé, Alves et al. (2014) iniciaram as amostragens em Floresta Ombrófila Densa de Terra Firme a noroeste da Unidade e Conservação, onde encontraram baixa densidade de árvores e menor área basal, tanto no subbosque, quanto no dossel, quando comparada com outros trechos desta tipologia em outras regiões do estado.

Comparando com os resultados encontrados às margens do Rio Machado, as fitofisionomias florestais na região central de Rondônia apresentam diversas faces, não apresentando similaridade quanto as principais espécies citadas por outros autores nos levantamentos na região central do estado, mesmo que em fitofisionomia distinta, a proximidade geográfica não influenciou na composição de espécies. Desse modo, um maior número de levantamentos devem ser realizados buscando identificar os padrões de florística, estrutura e características abióticas, como inundações.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A escassez de levantamento florísticos e estruturais em áreas de matas ciliares no estado de Rondônia dificulta a comparação de dados, mas também, justifica a continuidade de estudos no Rio Machado e na bacia hidrográfica.

A área apresentou elevada riqueza de espécies arbóreas e não apresenta espécies dominantes, conseqüentemente, considerável diversidade de espécies, o que justifica a conservação da área.

Apenas um indivíduo não foi identificado, mesmo em nível de família e o acompanhamento para coleta de material botânico deverá ser realizado para identificação da espécie.

Considerando a proximidade com o perímetro urbano, a área apresenta maior pressão nas bordas, contudo, no interior e proximidade com o leito do rio, está bem conservada.

#### 5. REFERÊNCIAS

ALVES S. L.; et al. Aspectos estruturais e ecológicos da floresta de terra firme na Reserva Biológica do Guaporé, sudoeste da Amazônia brasileira. Brasília, **Anais**. VI Seminário de Pesquisa e Iniciação Científica do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasil, 2014.

BRASIL. **Código Florestal - Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012.** Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2011-2014/2012/Lei/L12651.htm#art83](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2012/Lei/L12651.htm#art83)>. Acesso em: 08 fev. 2014.

CASULO, K.R. **Análise da Similaridade florística e estrutural das formações florestais inundáveis em um trecho do alto Rio Madeira e de seus Afluentes.** Dissertação apresentada à Fundação Universidade Federal de Rondônia para obtenção do grau de Mestre em Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente, 2012.

CIENTEC. **Mata Nativa 2: Manual do usuário.** Viçosa: CIENTEC, 2006.

CURY, R. T. S.; CARVALHO JUNIOR, O. **Manual para restauração florestal: florestas de transição.** IPAM - Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia. Belém, v. 5, 2011.

DURIGAN, G.; SILVEIRA, E. R. Recomposição da mata ciliar em domínio de cerrado, Assis, SP. **Scientia Forestalis.**, n. 56, p. 135-144, 1999.

FIDALGO, O.; BONONI, V.L.R. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico.** São Paulo: Instituto de Botânica, 1984, 61p. (Série Documentos – manual nº 4).

INPA. **Estudos botânicos na área de influência da BR-364.** In: Pesquisa Ecológica da Região POLONOROESTE: Brasília, MCT/CNPq. p. 28-33, 2005 *apud* SALOMÃO R. P.; LISBOA P. L. B. Análise ecológica da vegetação de uma floresta pluvial Tropical de Terra Firme, Rondônia. **Boletim Museu Emílio Goeldi**, nº 4, v. 2, p. 195-233, 1988.

LISBOA P. L. B. Estudo florístico da vegetação arbórea de uma Floresta secundária, em Rondônia. **Boletim Museu Emílio Goeldi.**, n.5, v. 2, p. 145-162, 1989.

MACIEL U. N.; LISBOA, P. L. B. **Estudo florístico de 1 hectare de mata de terra firme no km 15 da Rodovia Presidente Médici – Costa Marques (RO – 429), Rondônia.** **Boletim Museu Emílio Goeldi**, nº 5, v. 1, p. 25-37, 1989. (Série Botânica).

MOSER, P. 2013. **Vegetação arbórea e sua relação com fatores ambientais e espaciais em florestas de terra firme no noroeste de Rondônia, Brasil.** Dissertação apresentada à Universidade de Brasília para obtenção do grau de Mestre em Ciências Florestais. 119p.

MULLER-DOMBOIS D.; ELLEMBERG H. **Aims and methods of vegetation ecology.** Canadá, 1974.

RICARDO, V. P. **Projeto de recuperação das matas ciliares.** Trabalho de conclusão do curso (Graduação em Administração) – Faculdade Centro Paulista de Ibitinga. Ibitinga, 2008.

SALOMÃO R. P.; LISBOA P. L. B. Análise ecológica da vegetação de uma floresta pluvial Tropical de Terra Firme, Rondônia. **Boletim Museu Emílio Goeldi.**, n.4, v.2, p.195-233, 1988.

STIPP, N. A. F.; OLIVEIRA, J. **Estudos ambientais na área da microbacia do Ribeirão dos Apertados – Londrina – PR.** Universidade Estadual de Londrina. Geografia, v. 13, n. 2, p. 52-64, jul/dez., 2004.

VAST. Vascular Trópicos. **Nomenclatural database and associated authority files of Missouri Botanical Garden.** 2007. Disponível em: <<http://www.mobot.org>>. Acesso em: setembro 2010.

## PROJETO ESTRADAS: COLETA, IDENTIFICAÇÃO E COMPOSIÇÃO FLORÍSTICA NO ESTADO DE RONDÔNIA

Gilmar Alves Lima Júnior<sup>1</sup>, Joseane Barbosa Bessa<sup>2</sup>, Julio Henrique Germano de Souza<sup>2</sup>

1. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Ji-Paraná, Rondônia, Brasil;

2. Centro Universitário São Lucas, Ji-Paraná, Rondônia, Brasil;

### RESUMO:

Este estudo teve como objetivo registrar a ocorrência da espécie, nas áreas de estudo, municípios, regiões do Estado e conseqüentemente, os dados podem ser utilizados para relacionar com a vegetação. As espécies que apresentaram maior distribuição em dois Sítios de coleta foram *Apuleia leiocarpa*, *Cecropia distachya*, *Ceiba pentandra*, *Chorisia speciosa*, *Cochlospermum orinocense*, *Inga laurina*, *Inga macrophylla*, *Macrolobium acaciifolium*, *Mollia lepidota*, *Myrcia splendens*, *Physocalymma scaberrimum*, *Spondias mombin* e *Sterculia excelsa*.

Palavras-chave: Botânica, Composição florística e Amazônia.

### ABSTRACT:

This study had as objective to record the occurrence of the species, in the study areas, municipalities, State regions and consequently, the data can be used to relate to the vegetation. The species that presented the greatest distribution in two collection sites were *Apuleia leiocarpa*, *Cecropia distachya*, *Ceiba pentandra*, *Chorisia speciosa*, *Cochlospermum orinocense*, *Inga laurina*, *Inga macrophylla*, *Macrolobium acaciifolium*, *Mollia lepidota*, *Myrcia splendens*, *Physocalymma scaberrimum*, *Spondias mombin* and *Sterculia excelsa*.

**Keywords:** Botany, Floristic Composition and Amazon.

## 1. INTRODUÇÃO

O “Projeto Estradas: Coletas, Identificação e Composição Florística no Estado de Rondônia” iniciou em 2013, com o objetivo de contribuir com o conhecimento da florística de diferentes fitofisionomias no Estado, enriquecendo as coleções botânicas e informações sobre a distribuição das espécies de plantas, principalmente, arbóreas, pelo estado.

Em paralelo a contribuição científica, o projeto foi desenvolvido no Instituto Federal de Rondônia, no Campus Ji-Paraná, com a coordenação de professores e colaboração de

pesquisadores externos, mas principalmente, com participação de alunos de iniciação científica, matriculados no curso técnico em Florestas. Portanto, teve o objetivo de treinar técnicos na coleta, manuseio e identificação botânica, em campo e no laboratório.

O Projeto foi dividido em etapas, buscando atingir o maior número de pontos de coletas, buscando parcerias para acesso às áreas, considerando a sazonalidade da região, com período de chuvas acentuados, o calendário de atividades dos alunos no Instituto, e o período de fomento dos editais de pesquisas.

A partir da divisão de coleta e análise de dados, este capítulo apresenta os resultados da composição de espécies em cinco áreas de estudo, cada uma localizada em um município distinto. Outras etapas estão em andamento, que deverão produzir dados em diferentes pontos, com o intuito de elaborar um banco de dados mais robusto, contribuindo para conhecimento das espécies de plantas em Rondônia.

Todas as proposições para reunir dados de coletas botânicas no estado são bem aceitas e de valiosa contribuição para a formação de recursos humanos e conhecimento da biodiversidade da região, buscando aumentar o volume de depósitos nas coleções do estado e a identificação das plantas nativas.

O conhecimento da flora local deve contribuir para identificação e reconhecimento de plantas nativas com potencial para restauração florestal, recuperação de áreas degradadas e subsidiar investimentos em tecnologia no uso da madeira, conservação e emprego na indústria local.

O Projeto Estradas, não apresenta informações sobre a composição de espécies por fitofisionomias, o objetivo é registrar a ocorrência da espécie, nas áreas de estudo, municípios, regiões do Estado e conseqüentemente, os dados podem ser utilizados para relacionar com a vegetação.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 ÁREAS DE ESTUDO**

Foram amostradas cinco áreas de estudo, denominadas aqui, de Sítios, distribuídas em municípios em três diferentes regiões do estado de Rondônia, a saber: Chupinguaia e Parecis, na divisa com o cone sul do estado; Ji-Paraná, Urupá na região central e Seringueiras, na região próxima ao Pantanal do Rio Guaporé.

O clima da região é do tipo equatorial quente e úmido, com temperatura média anual de 25 °C e índice pluviométrico anual variando entre 2.000 e 2.200 mm. O período chuvoso, de novembro a março, concentra cerca de 70% do total da precipitação anual enquanto que o inverno (junho, julho, agosto) corresponde à estação seca (IBDF 1984; CUNHA et al., 2007).

As áreas de estudos foram caracterizadas, sendo: **Sítio 1**: localizado no município de Chupinguaia, área de transição entre Cerrado e Floresta, nas coordenadas geográficas 216925/84673325 (Figura 1).



**Figura 1.** Interior do transecto amostrado na transição entre Cerrado e Floresta, em Chupinguaia, Rondônia.

Área com vegetação em estado sucessional primário, não foram encontrados troncos queimados, porém há pressão antrópica, pela retirada de madeira e abertura de áreas para produção agrícola e de pastagem para criação de gado. Com a análise

identificamos a presença de três estratos verticais distintos: arbóreo (8-25m), arbustivo (2-8m) e herbáceo (até 2m) com e estacionalidade semidecídua. Os estratos epífitas e lianas foram escassos nesse ponto. A densidade da cobertura é média e com abundante presença clareiras na área. Apresentou média ocorrência de solo descoberto, drenagem moderada e local sem presença de vegetação geralmente apresentavam camada de húmus e madeira decomposta.

**Sítio 2:** Caracterizado como mata ciliar do Rio Machado, localizado às margens do Anel Viário da cidade de Ji-Paraná. Área de Preservação Permanente, não foram encontrados troncos queimados, porém há pressão antrópica, pois está localizado no perímetro urbano da cidade, com ocupação para esportes (pescaria, trilhas), retirada seletiva de madeira para lenha e remédios naturais. Com a análise identificamos a presença de três estratos verticais distintos: arbóreo (10-30m), arbustivo (2-10m) e herbáceo (até 2m) com e estacionalidade sempre-verde. Os estratos epífitas e lianas foram abundantes nesse ponto. A densidade da cobertura é média e com abundante presença clareiras na área, pela retirada seletiva de madeiras e quedas de árvores por ação de ventos. Apresentou média ocorrência de solo descoberto e drenagem moderada.

**Sítio 3:** Localizado na área de preservação permanente de uma propriedade particular de criação de gado, no município de Parecis, caracterizado por uma vegetação de porte florestal, no limite com a transição entre Floresta e Cerrado, nas coordenadas geográficas 069567/8645825 (Figura 2).



**Figura 2.** Vista do interior da vegetação florestal, na transição entre Cerrado e Floresta, no município de Parecis, Rondônia.

Área com vegetação em estado sucessional primário, não foram encontrados troncos queimados, porém há pressão antrópica, pela retirada seletiva de madeira e abertura de áreas de pastagem para criação de gado. Com a análise identificamos a presença de três estratos verticais distintos: arbóreo (8-30m), arbustivo (2-8m) e herbáceo (até 2m) com e estacionalidade semidecídua. Os estratos epífitas e lianas foram escassos nesse ponto. A densidade da cobertura é média e com abundante presença clareiras na área, devido a retirada seletiva de madeira, queda de árvores por ação dos ventos, e trechos de solo úmido, com alagamentos temporários dos córregos nas proximidades.

**Sítio 4:** A vegetação caracteriza-se como contato entre um Cerradão e pastagem, em uma região de Floresta Ombrófila, no município de Seringueiras, às margens na estrada vicinal que recebe o nome de Linha Primavera (Figura 3). Sob as coordenadas geográficas 0502553/8659142.



**Figura 3.** Coleta botânica com uso do podão, às margens da Linha Primavera, Zona Rural do município de Seringueiras, Rondônia.

Área com vegetação em estado sucessional primário, não foram encontrados troncos queimados, porém há pressão antrópica, pela retirada de madeira e abertura de áreas para produção agrícola e de pastagem para criação de gado. Com a análise identificamos a presença de três estratos verticais distintos: arbóreo (8-20m), com árvores emergentes de até 30m; arbustivo (2-8m) e herbáceo (até 2m) com e estacionalidade decídua. Os estratos epífitas e lianas foram escassos nesse ponto. A densidade da cobertura é média e com abundante presença clareiras na área, recorrentes pela retirada de madeira e queda de árvores de grande porte por ação dos ventos. Apresentou média ocorrência de solo descoberto, drenagem acentuada e solo arenoso. A área é um enclave de Cerradão na Floresta Ombrófila. Não foram observados outros pontos dessa vegetação ao longo do caminho percorrido naquela região.

**Sítio 5:** Localizado no município de Urupá, em uma propriedade particular, demarcada como plantio para restauração florestal, utilizando espécies nativas das áreas ao redor. Esta área diferencia-se das demais, por ser pelo estado sucessional secundário. Foi totalmente aberta para o plantio de pastagem, posteriormente, abandonada a criação de gado de corte, iniciou-se o plantio das espécies nativas. A área de aproximadamente 200x200m, foi toda inventariada e, segundo os relatos dos proprietários o plantio de espécies nativas possuía 3 anos, e as sementes foram coletadas nas áreas ao redor e em propriedades próximas, catadas do chão. Os indivíduos lenhosos amostrados, possuíam entre 3 e 5 metros de altura. A área é totalmente cercada, e deverá ser utilizada em breve para educação ambiental, como um laboratório para aulas práticas pelas escolas da região.

## 2.2 COLETA DE DADOS

Para amostragem da florística nos pontos amostrados, foram utilizados dois métodos:

Amostragem pontual (PO – Ponto de Observação), de acordo com a metodologia de AER (Avaliação Ecológica Rápida) desenvolvida por Sobrevila & Bath (1992), para verificar tipos vegetacionais, identificar grupos florísticos dominantes, estágios de sucessão e estado de conservação.

Transectos, com o uso de trilhas de identificação, ao longo de trilhas 3km em cada Sítio de amostragem, no interior da vegetação, identificando todas os espécimes com porte arbóreo, com diâmetro a altura do peito (DAP)  $\geq 30$  cm, localizados até 2 metros de largura,

de cada lado da trilha. Este método foi utilizado nas áreas de estudo localizadas em Chupinguaia (I) , Ji-Paraná (II), Parecis (III) e Seringueiras (IV).

Inventário, com a identificação de todos os indivíduos arbóreos localizados na área demarcada, método utilizado apenas na área amostrada em Urupá (V).

O esforço amostral foi baseado nas condições de campo, considerando períodos de chuva e seca, acesso às áreas e reconhecimento do local, demarcação de pontos e coleta de dados, além da repetição das espécies na amostragem.

Os indivíduos férteis foram coletados, com o uso de tesoura de poda, identificados, triados e prensados no laboratório com o uso de jornal e prensa de madeira, levados a estufa à 45°C, por até 3 dias.

A lista florística das espécies arbóreas foi elaborada a partir da identificação de todos os indivíduos amostrados nas áreas de estudo, dentro do nível de inclusão acima mencionado. O material botânico coletado foi identificado pela equipe do Laboratório de Botânica e Ecologia (LABEC) do Instituto Federal de Rondônia (IFRO) – *Campus* Ji-Paraná em campo e com auxílio de literatura especializada e profissionais com experiência em identificação botânica. O material botânico fértil foi enviado para depósito no herbário do CEULJI-ULBRA.

A validação dos nomes das espécies, autores e a exclusão das sinonímias botânicas foram definidos em consultas ao Vast (2007). A lista de espécies foi preparada em ordem alfabética de famílias de acordo com *Angiosperm Phylogeny Group* (APG) atualizado em APG III (2009).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foram amostradas 154 espécies, distribuídas em 103 gêneros e 43 famílias botânicas. No Sítio I, foram amostradas 13 espécies, 10 gêneros e 9 famílias botânicas, onde a família Sapotaceae destacou-se em riqueza, com cinco espécies, sendo quatro do gênero *Pouteria*.

No sítio II, foram amostradas 39 espécies, 36 gêneros e 23 famílias botânicas. Nesta área de coleta, destaca-se a riqueza de gêneros e famílias botânicas, onde apenas três gêneros apresentaram duas espécies e a família Fabaceae destacou-se com seis espécies.

No sítio III foram amostradas 41 espécies, 38 gêneros e 22 famílias. O padrão de elevada riqueza de gênero se repetiu, sendo apenas três gêneros apresentaram duas espécies.

No sítio IV foram amostradas 27 espécies, 26 gêneros e 18 famílias botânicas. Esta área, a riqueza de gêneros foi ainda mais acentuada, onde apenas *Swartzia* apresentou duas espécies.

No sítio V foram amostradas 49 espécies, distribuídas em 41 gêneros e 21 famílias. A área apresentou um padrão diferente das demais amostradas, com um maior número de gêneros com riqueza de espécies.

A lista de espécies amostradas nas áreas de estudo está descrita no Quadro 1.

**Quadro 1** – Composição de espécies de trechos de vegetação nativas e de reflorestamento amostrados em cinco municípios do estado de Rondônia. Sendo: I (Chupinguaia); II (Ji-Paraná); III (Parecis); IV (Seringueiras) e V (Urupá).

Família	Nome científico	I	II	III	IV	V
Anacardiaceae	<i>Spondias mombin</i> L.			■		■
Annonaceae	<i>Annona</i> sp.					■
	<i>Bocageopsis</i> sp.		■			
	<i>Ephedrantus</i> sp.		■			
	<i>Guatteria foliosa</i> Benth.				■	
Apocynaceae	<i>Aspidosperma araracanga</i> Marc.-Ferr.					■
	<i>Hymatantus sucuuba</i> (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson		■			
Arecaceae	<i>Astrocaryum jauari</i> Mart.		■			
	<i>Astrocaryum vulgare</i> Mart.			■		
	<i>Attalea maripa</i> (Aubl.) Mart.		■			
	<i>Attalea phalerata</i> Mart. ex Spreng.					■
	<i>Attalea</i> sp.			■		
	<i>Bactris gasipaes</i> Kunth					■
	<i>Bactris maraja</i> Mart.			■		
	<i>Oenocarpus disticus</i>	■				
	<i>Oenocarpus minor</i> Mart.					■
Bignoniaceae	<i>Handroanthus albus</i> (Cham.) Mattos					■
	<i>Handroanthus roseo-albus</i> (Ridl.) Mattos					■
	<i>Handroanthus ochraceus</i> (Cham.) Mattos					■
Bixaceae	<i>Cochlospermum orinocense</i> (Kunth) Steud.		■	■		
Boraginaceae	<i>Cordia alliodora</i> (Ruiz & Pav.) Oken					■
	<i>Cordia seleriana</i> Fernald			■		

Bursaceae	<i>Protium aracouchini</i> (Aubl.) Marchand								
	<i>Protium occultum</i> Daly								
	<i>Protium spruceanum</i> (Benth.) Engl.								
	<i>Protium subserratum</i> (Engl.) Engl.								
Caryocaraceae	<i>Caryocar villosum</i> (Aubl.) Pers.								
Celastraceae	<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek								
	<i>Salacia multiflora</i> (Lam.) DC.								
	<i>Tontelea fluminensis</i> (Peyr.) A.C. Sm.								
Chrysobalanaceae	<i>Hirtella gracilipes</i> (Hook. f.) Prance								
	<i>Licania octandra</i> (Hoffmanns. ex Roem. & Schult.) Kuntze								
	<i>Licania pallida</i> Spruce ex Sagot								
	<i>Licania reticulata</i> Prance								
	<i>Licania sandwithii</i> Prance								
	<i>Parinari excelsa</i> Sabine								
Clusiaceae	<i>Caraipa</i> sp.								
	<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.								
Combretaceae	<i>Buchenavia grandis</i> Ducke								
Crysobalanaceae	<i>Licania</i> sp.								
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum mucronatum</i> Benth.								
Euphorbiaceae	<i>Alchorneopsis floribunda</i> (Benth.) Müll. Arg.								
	<i>Hevea brasiliensis</i> (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.								
	<i>Hevea spruceana</i> (Benth.) Müll. Arg.								
	<i>Pera glabrata</i> (Schott) Poepp. ex Baill.								
	<i>Pera schomburgkiana</i> (Klotzsch) Müll. Arg.								
	<i>Pera</i> sp.								
	<i>Sapium glandulatum</i> (Vell.) Pax								
Fabaceae	<i>Amburana acreana</i> (Ducke) A.C. Sm.								
	<i>Apuleia leiocarpa</i> (Vogel) J.F. Macbr.								
	<i>Caesalpinia brasiliensis</i> L.								
	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.								
	<i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Forsyth f.								
	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong								
	<i>Enterolobium maximum</i> Ducke								

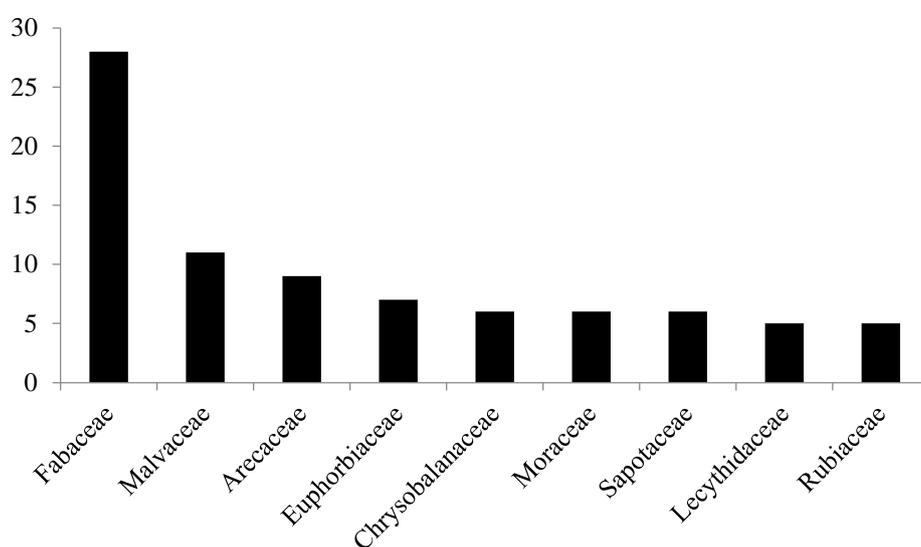
	<i>Erythrina</i> sp.								
	<i>Hymenaea courbaril</i> L.								
	<i>Hymenaea intermedia</i> Ducke								
	<i>Hymenaea parvifolia</i> Huber								
	<i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd.								
	<i>Inga macrophylla</i> Humb. & Bonpl. ex Willd.								
	<i>Inga</i> sp.								
	<i>Leptolobium nitens</i> Vogel								
	<i>Macrolobium acaciifolium</i> (Benth.) Benth.								
	<i>Parkia multijuga</i> Benth.								
	<i>Platimicium</i> sp.								
	<i>Pterocarpus amazonicus</i> Huber								
	<i>Pterodon pubescens</i> (Benth.) Benth.								
	<i>Stryphnodendron guianense</i> (Aubl.) Benth.								
	<i>Stryphnodendron pulcherrimum</i> (Willd.) Hochr.								
	<i>Swartzia grandiflora</i> J.F. Gmel.								
	<i>Swartzia ingifolia</i> Ducke								
	<i>Swartzia polyphylla</i> DC.								
	<i>Swartzia</i> sp.								
	<i>Tachigali setifera</i> (Ducke) Zarucchi & Herend.								
	<i>Zygia juruana</i> (Harms) L. Rico								
Lauraceae	<i>Licaria guianensis</i> Aubl.								
	<i>Nectandra</i> sp.								
Lecythidaceae	<i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl.								
	<i>Cariniana rubra</i> Gardner ex Miers								
	<i>Lecythis parviflora</i> Aubl.								
	<i>Lecythis pisonis</i> Cambess.								
	<i>Lecythis zabucajo</i> Aubl.								
Lythraceae	<i>Physocalymma scaberrimum</i> Pohl								
Malpighiaceae	<i>Byrsonima chrysophylla</i> Kunth								
Malvaceae	<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn.								
	<i>Chorisia speciosa</i> A. St.-Hil.								
	<i>Guazuma</i> sp.								





Quanto aos gêneros, 13 apresentaram três ou mais espécies, onde destaca-se *Attalea*, *Cecropia*, *Handroanthus*, *Hymenaea*, *Inga*, *Lecythis*, *Pera* e *Theobroma* com três espécies cada. Ainda, *Ficus*, *Protium* e *Swartzia* com quatro espécies cada e *Licania* (5 spp) e *Pouteria* com o maior número de espécies, oito. Moser (2013), estudando as florestas na região do Rio Madeira, encontrou 278 espécies e cita Sapotaceae como uma das principais famílias, devido a riqueza de espécies do gênero *Pouteria*.

Do total de 43 famílias, apenas nove apresentaram 5 ou mais espécies, com destaque para Fabaceae (28), Malvaceae (11), Arecaceae (09). Estas e as demais famílias botânicas com maior riqueza de espécies estão representadas na Figura 4.



**Figura 4.** Famílias botânicas com maior riqueza de espécies nas cinco áreas amostradas no estado de Rondônia.

A similaridade florística entre as áreas amostradas foi baixa, do total de 154 espécies, apenas 14 ocorreram em duas parcelas. No Sítio I, todas as espécies foram exclusivas, não sendo amostradas em nenhum dos outros quatro pontos.

As áreas com maior similaridade com as demais foram Urupá (10 espécies em comum com todas as outras áreas), seguida por Parecis (7 spp) e Ji-Paraná (6 spp). Comparando apenas duas áreas, os Sítios III e V apresentaram maior similaridade, com seis espécies em comum.

## 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A localização geográfica, sendo a área mais ao sul do estado, pode ter relação da baixa similaridade entre a área I e as demais. O ponto de coleta, embora seja uma fitofisionomia florestal, está na área de transição entre Cerrado e Floresta. Quanto a baixa riqueza de espécies nessa área, deve-se considerar que, apesar do porte florestal, em áreas de transição ou Cerradão, o número de indivíduos com DAP  $\geq 30$  é muito menor do que em uma Floresta Ombrófila, assim, o nível de inclusão interferiu na riqueza de espécies, os resultados assim, caracterizam o dossel emergente da vegetação local.

O Sítio IV, localizado em Seringueiras apresentou menor similaridade florística, é um enclave de cerradão, no meio de Floresta Ombrófila e pastagens. Os demais quatro sítios apresentam proximidade maior com a Floresta Ombrófila, sendo assim, a composição de espécies do sítio 4 merece estudos, de conexão florística, por exemplo.

As espécies que apresentaram maior distribuição em dois Sítios de coleta foram *Apuleia leiocarpa*, *Cecropia distachya*, *Ceiba pentandra*, *Chorisia speciosa*, *Cochlospermum orinocense*, *Inga laurina*, *Inga macrophylla*, *Macrolobium acaciifolium*, *Mollia lepidota*, *Myrcia splendens*, *Physocalymma scaberrimum*, *Spondias mombin* e *Sterculia excelsa*.

Conforme estudo, as espécies utilizadas na restauração florestal no Sítio V apresentou elevada similaridade com áreas nativas no estado. Com o avanço dos estudos, os dados devem confirmar se as demais espécies utilizadas no plantio pertencem a flora da região, já que a lista florística apresentada é composta de espécies nativas da flora no norte do país.

O sucesso no uso das espécies amostradas deve servir como base para escolha de plantas para restauração de trechos de florestas na região central do estado, viabilizando o conhecimento das espécies com potenciais de desenvolvimento em áreas degradadas e para restauração, evitando assim prejuízos financeiros de implantação ocasionados pela mortandade de espécies inadequadas.

O treinamento de profissionais na área de coleta e identificação botânica para o estado de Rondônia é muito importante, há escassez desse profissional, principalmente que tenha experiência em trabalhar com as tipologias e com as espécies da região. Atualmente, a maioria dos profissionais estão próximos a aposentadoria.

## 5. REFERÊNCIAS

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society.**, v.161, p.105-121, 2009.

CLINEBELL, R.R.; PHILLIPS, O.L.; GENTRY, A.H.; STARK, N.; ZUURING, H. **Prediction of neotropical.** 1995.

CUNHA, A.M.C.; LIMA, C.A.; DIETZSCH, L. **Levantamento de áreas de maior risco de incêndios através de dados NOAA12. Estudo de caso: Reserva Biológica do Guaporé.** Anais do XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Florianópolis, 2007.

GENTRY, A.H. **Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients.** Annals of the Missouri Botanical Garden. 1988.

IBDF. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. **Plano de Manejo da Reserva Biológica do Guaporé.** Brasília, 1984.

MOSER, P. **Vegetação arbórea e sua relação com fatores ambientais e espaciais em florestas de terra firme no noroeste de Rondônia, Brasil.** Dissertação apresentada à Universidade de Brasília para obtenção do grau de Mestre em Ciências Florestais, 2013.

SOBREVILA, C.; BATH, P. **Evaluación Ecológica Rápida; un manual para usuarios de América Latina y el Caribe.** The Nature Conservancy, Arlington, USA. 1992.

STEEGE, H.; SABATIER, D.; CASTELLANOS, H.; ANDEL, T.V.; DUIVENVOORDEN, J.; OLIVEIRA, A.A.; et al. A regional perspective: Analysis of Amazonian floristic composition and diversity that includes a Guyana Shield. In: Steege, H. (Ed.). **Plant Diversity in Guyana: Whit recommendations for a National Protected Areas Strategy.** The Tropenbos Foundation, Wageningen, 2000.

VAST. Vascular Trópicos. **Nomenclatural database and associated authority files of Missouri Botanical Garden.** 2007. Disponível em: <<http://www.mobot.org>>. Acesso em: setembro 2010.

## COLETA DE DADOS DE VEGETAÇÃO E FLORA – ENFOQUE NA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL, ESTADO DE RONDÔNIA

Gilmar Alves Lima Júnior<sup>1</sup>

1. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Ji-Paraná, Rondônia, Brasil.

### RESUMO:

Este capítulo reúne informações de os estudos científicos sobre a vegetação nativa do estado, com foco nos levantamentos florísticos e fitossociológicos. Entende-se que o conhecimento da vegetação e flora pode ser a base para planejamento de uso dos recursos naturais, bem como preservação do patrimônio genético e até para subsidiar a recuperação de áreas degradadas e restauração de habitats naturais. O elevado número de espécies amostradas nos estudos apresentados, característicos de ambientes de floresta ombrófila, confirma que o estado possui áreas de elevada riqueza e diversidade, que deve haver maior investimento no estudo, conhecimento da flora e pesquisas para uso além da conversão em lavoura e pecuária.

Palavras-chave: Vegetação, Flora e Amazônia.

### ABSTRACT:

This chapter gathers information from scientific studies on the native vegetation of the state, focusing on floristic and phytosociological surveys. It is understood that knowledge of vegetation and flora can be the basis for planning the use of natural resources, as well as preservation of genetic heritage and even to subsidize the recovery of degraded areas and restoration of natural habitats. The high number of species sampled in the studies presented, characteristic of environments of ombrophilous forest, confirms that the state has areas of high richness and diversity, that there should be greater investment in the study, knowledge of the flora and research for use besides the conversion in agriculture and livestock.

**KEYWORDS:** Vegetation, Flora and Amazon.

## 1. INTRODUÇÃO

O rápido crescimento do Estado de Rondônia, baseado principalmente na produção agropecuária, gera uma demanda por resultados de pesquisas para conhecer e propor estratégias para preservação e conservação da vegetação nativa, uso e ocupação do solo.

Depois de um primeiro ciclo de colonização a partir da década de 1970, o estado pode ser considerado uma nova fronteira agrícola, após o *boom* na produção agrícola em Mato

Grosso, grandes empresas e produtores tem migrado para Rondônia. A cada ano, pode-se observar a transformação de pastagens e de áreas naturais em grandes lavouras na região do cone sul, onde destaca-se o município de Vilhena, até o Vale do Guaporé, em áreas dos municípios de São Miguel do Guaporé, Seringueiras e São Francisco do Guaporé.

Esta transformação na paisagem é muito rápida e tem grande apelo social, apoiado na promessa de desenvolvimento econômico e social. Contudo, procura-se responder a demanda sobre os estudos ambientais no estado, com foco na vegetação e florística, principalmente destas áreas, localizadas em pontos de interesse para o abertura de novas frentes para agricultura de grande escala.

Este capítulo reúne informações de os estudos científicos sobre a vegetação nativa do estado, com foco nos levantamentos florísticos e fitossociológicos. Entende-se que o conhecimento da vegetação e flora pode ser a base para planejamento de uso dos recursos naturais, bem como preservação do patrimônio genético e até para subsidiar a recuperação de áreas degradadas e restauração de habitats naturais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um levantamento dos trabalhos científicos publicados em periódicos, dissertações e teses com o tema relacionado com levantamento florístico e fitossociológicos no estado de Rondônia. Não foi utilizado um período específico, buscou-se o máximo de informações nas plataformas digitais, bibliotecas físicas de instituições públicas e privadas nos municípios de Porto Velho e Ji-Paraná, e digitais, plataformas de compartilhamento de publicações sobre o tema, buscando esgotar os dados disponíveis na literatura.

Os dados foram compilados em planilhas do Excel, com critérios/características escolhidas pelos autores, como importantes para comparação entre os trabalhos, identificando diferentes na metodologia adotada por cada autor, que possa interferir na interpretação dos dados.

Quanto a metodologia utilizada pelos autores, determinou-se que o local (município) de coleta, nível de inclusão e tamanho da área amostrada (sendo parcela ou ponto quadrante) seriam as principais informações. Quanto aos resultados, a riqueza de espécies, Índice de Diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ), as principais famílias, priorizando a riqueza

de espécies por família deveriam ser destacadas. Por fim, optou-se por repetir a denominação da fitofisionomia adotada por cada autor.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

É apresentada a compilação dos estudos científicos sobre a vegetação e flora do estado de Rondônia de 15 levantamentos realizados, com coleta de 28 áreas de amostragem, em nove fitofisionomias diferentes, de acordo com a classificação de cada autor, que variam desde áreas campestres até florestais (Quadro 1).

O levantamento apresentado compreende estudos realizados em 31 anos, no período de 1986 a 2017, com a citação das principais famílias quanto a riqueza de espécies, com exceção das áreas estudadas por Absy et al. (1986), Salomão e Lisboa (1988), Maciel e Lisboa (1989) que citam as principais famílias quando ao valor de importância da estrutura da vegetação e Casulo (2012), que destaca as famílias botânicas quanto a abundância na área de estudo.

Apenas quatro estudos ou nove áreas amostradas não apresentaram o Índice de Diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ), contudo, é possível avaliar e comparar os resultados entre as demais áreas, principalmente para fitofisionomia Floresta Ombrófila de Terra Firme.

Exceto o trabalho de Miranda (2000), que utilizou pontos quadrantes como metodologia de amostragem da vegetação, todos os demais utilizaram parcelas, contudo, dentro da escolha por parcelas, houve grande variação quanto ao tamanho das parcelas, não discutida neste capítulo, pois não se priorizo a metodologia e os dados foram apresentados pelos autores dentro dos parâmetros fitossociológicos usuais.

**Quadro 1.** Informações dos levantamentos florísticos e fitossociológicos realizados no estado de Rondônia, no período entre 1986 e 2017.

Referência	Ano	Local	Área amostrada	Nível de inclusão	Riqueza de espécies	H'	Principais famílias	Vegetação
Absy, M.L.; Prance, G.T.; Barbosa, E.M.	1986/1987	Machadinho do Oeste e Jaru	6 hectares	DAP ≥ 10cm	278		Leguminosae, Moraceae, Sapotaceae, Lecythidaceae, Burseraceae e Arecaceae	Floresta Ombrófila de Terra Firme
Salomão, R.P.; Lisboa, P.L.B.	1988	Ji-Paraná-Presidente Médici	1 hectare	DAP ≥ 10cm	171	4,44	Moraceae, Leguminosae, Sapotaceae, Burseraceae, Arecaceae e Annonaceae	Floresta Pluvial Tropical de Terra Firme
Maciel, U.N.; Lisboa, P.L.B.	1989	Presidente Médici-Costa Marques	1 hectare	DAP ≥ 10cm	90	4,26	Sterculiaceae, Meliaceae, Moraceae	Floresta Pluvial Tropical de Terra Firme
Miranda, I.	2000	Pimenta Bueno	50 pontos quadrantes	CAP ≥ 10cm	71	3,88		Floresta Ombrófila de Terra Firme
			50 pontos quadrantes		71	3,93		Floresta Ombrófila de Terra Firme
			50 pontos quadrantes		72	3,88		Floresta Ombrófila de Terra Firme
			50 pontos quadrantes		56	3,61		Mata ciliar
			50 pontos quadrantes		55	3,44		Mata ciliar
			50 pontos quadrantes		58	3,47		Mata ciliar
			50 pontos quadrantes		53	3,46		Mata ciliar
			50 pontos quadrantes		67	3,69		Mata ciliar
			50 pontos quadrantes		30	2,87		Mata alagada
			50 pontos quadrantes		23	2,51		Mata alagada
Vieira, A.H.; Martins, E.P.; Silveira, A.L.P.; Pequeno, P.L.L.; Locatelli, M.	2002	Machadinho d'Oeste	5 hectares	DAP ≥ 10cm	70	3,2	Caealpinaceae, Fabaceae, Lecythidaceae, Moraceae e Annonaceae	Floresta Ombrófila Densa

Miranda, I.S.; Almeida, S.S.; Dantas, P.J.	2006	Vilhena	1 hectare	CAS ≥ 10cm	60		Vochysiaceae, Fabaceae, Malpighiaceae e Rubiaceae	cerradão
			1 hectare		26		Myrtaceae, Melastomataceae e Sapotaceae	campo sujo
			1 hectare		39		Ochnaceae, Clusiaceae, Myrtaceae, Vochysiaceae, Melastomataceae	cerrado sensu stricto
			1 hectare		45		Ochnaceae, Vochysiaceae, Melastomataceae, Myrtaceae e Sapotaceae	cerrado sensu stricto
Reis, N.F.C.	2007	Porto Velho	0,5 hectares	PAP ≥ 10cm	173	3,95	Fabaceae, Arecaceae, Moraceae, Lauraceae	Floresta Omrófila Aberta de Terras Baixas
Santos, N.B.	2007	Porto Velho	0,5 hectares	PAP ≥ 10cm	243	4,6	Fabaceae, Moraceae, Lauraceae, Annonaceae e Meliaceae	Floresta Omrófila Densa Aluvial
Silva, A.P.F.F; Bentes-Gama, M.M.	2008	Porto Velho	3,5	DAP ≥ 15cm	69	3,41	Caesalpinaceae, Fabaceae, Lecythidaceae, Moraceae	Floresta Omrófila Aberta
Bentes-Gama, M.M.; Leal, G.S.; Barros, J.O.; Lopes, R.H.; López, G.F.Z.; Silveira, J.C.	2009	Porto Velho	9 hectares	DAP ≥ 15	99 espécies	3,63	Caesalpinaceae, Mimosaceae, Fabaceae, Moraceae, Annonaceae, Arecaceae e Lecythidaceae.	Floresta Omrófila de Terra Firme
Casula, K.R.	2012	Porto Velho	33,25 hectares	DAP ≥ 5cm	476		Fabaceae, Euphorbiaceae, Moraceae, Sapotaceae	Floresta de várzea
Moser, P.	2013	Porto Velho	1 hectare	1cm ≤ DAP ≥ 10cm	630		Fabaceae, Sapotaceae, Crhysobalanaceae, Rubiaceae, Moraceae	Floresta Omrófila de Terra Firme
			10 hectares	10cm ≤ DAP ≥ 30cm	499		Fabaceae, Moraceae, Sapotaceae, Chrysobalanaceae, Annonaceae	Floresta Omrófila de Terra Firme

			20 hectares	DAP ≥ 30cm	279		Fabaceae, Moraceae, Sapotaceae, Chrysobalanaceae e Lecythidaceae	Floresta Ombrófila de Terra Firme
Azevedo, G.B.	2014	Ji-Paraná	1,5 hectares	DAP ≥ 10cm	298		Fabaceae, Sapotaceae, Moraceae, Annonaceae, Malvaceae	Floresta Ombrófila com palmeiras
Andrade, R.T.G.; Pansini, S.; Sampaio, A.F.; Ribeiro, M.S.; Cabral, G.S.; Manzato, A.G.	2017	Porto Velho	30 hectares	DAP ≥ 10cm	196	3,81	Fabaceae, Arecaceae, Moraceae, Rubiaceae, Melastomataceae e Urticaceae	Floresta Ombrófila de Terra Firme

Observa-se uma grande lacuna na publicação de dados nos anos 90, com um número de estudos relacionados a grandes programas institucionais, como o Plano Agropecuário e Florestal de Rondônia (PLANAFLORO), aprovado em 1992 e o POLONOROESTE, que suscitou de alguma forma estudos ambientais, no planejamento de ocupação e infraestrutura da região. Depois de uma década dos primeiros estudos publicados por pesquisadores, principalmente vinculados a Instituições em Manaus, após os primeiros anos da implantação da Universidade Federal no estado, estabelecimento de profissionais, que iniciou-se a coleta de dados e publicação, principalmente a partir dos anos 2000.

Há uma escassez de dados em parcelas permanentes de estudos florísticos e ecológicos, apenas o trabalho de Andrade et al. (2017) vinculado ao Programa de Biodiversidade com a metodologia RAPELD, apresenta essa característica. A maioria dos levantamentos são avaliações rápidas, e que na maioria das vezes, tem a identificação botânica confirmada com material vegetativo e em campo, baixo número de coletas de material reprodutivo e depositado nas coleções. Salvo em alguns casos de espécies amplamente reconhecidas, essa metodologia pode comprometer resultados ou não ser tão eficaz quanto estudos de longa duração.

O uso de parcelas permanentes, em áreas de conservação, como Unidades de Conservação, mas também em áreas de preservação permanentes de propriedades rurais e até mesmo áreas de restauração florestal, com diferentes estágios sucessionais pode ser priorizado, buscando responder perguntas como apresentadas Moura et al. (2017), em uma discussão ecológica interessante sobre o planejamento do uso e ocupação do estado.

Os dados levantados revelam uma concentração de estudos na região de Porto Velho, indicada por alguns fatores, como os levantamentos e trabalhos de estudantes de pós-graduação nas áreas de construção das usinas hidroelétricas Santo Antônio e Jirau (CASUAL, 2012; MOSER, 2013), pela presença do maior campus da Universidade Federal de Rondônia, com o programa de pós-graduação na área ambiental, pela grande extensão territorial e ainda, pela cobertura por grandes áreas de florestas bem conservadas.

Contudo, as demais áreas do estado estão “descobertas” de levantamentos florísticos e fitossociológicos, principalmente quanto a demais tipologias florestais e campestres, nas áreas de enclave de cerrado e transição.

Espera-se que parte desta lacuna seja preenchida com os resultados do Inventário Florestal Nacional, etapa Rondônia, que tem realizado levantamentos de fatores abióticos e da vegetação e flora do estado desde 2014.

Não citados no Quadro 1, por não serem levantamentos florísticos e fitossociológicos, mas importantes para o tema são os estudos de Perigolo (2014), que descreveu cinco fitofisionomias de floresta ombrófila, uma floresta estacional e quatro fitofisionomias de campinarana, desde florestais a campestres, na região XX, descrevendo as principais espécies que caracterizam as tipologias e que pode ser base para estudos da estrutura nos locais. Carleial e Bigio (2014) deram uma contribuição importante com o *checklist* das plantas coletas durante o estudo do PLANAFLORO. São espécimes depositados no maior herbário do estado e informações que compiladas ajudam na discussão quanto a ocorrência de espécies no estado, principalmente porque são coletas realizadas antes da grande ocupação do estado.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não há uma padronização na metodologia utilizada na coleta de dados, em que pese, um número pequeno de estudos, não é possível formar um banco de dados sobre a composição de espécies, em diferentes níveis de inclusão, para tipologias vegetacionais específicas no estado de Rondônia.

O elevado número de espécies amostradas nos estudos apresentados, característicos de ambientes de floresta ombrófila, confirma que o estado possui áreas de elevada riqueza

e diversidade, que deve haver maior investimento no estudo, conhecimento da flora e pesquisas para uso além da conversão em lavoura e pecuária.

Recomenda-se o uso de parcelas permanentes, com estudos de longa duração, em áreas de conservação, como Unidades de Conservação, mas também em áreas de preservação permanentes de propriedades rurais e até mesmo áreas de restauração florestal, com diferentes estágios sucessionais.

Os resultados do Inventário Florestal Nacional – Rondônia, devem contribuir de forma significativa com o conhecimento da flora do estado, principalmente quanto a ocorrência e distribuição de espécies já conhecidas e ocorrência de novas espécies para o estado, pois apresenta uma grande área de extensão, abrangendo todo o estado e diversas tipologias de vegetação.

Em um estado com colonização recente, baixo número de cursos de pós-graduação, que possuem relação direta com a fixação de profissionais qualificados, captação de recursos financeiros para pesquisa e publicação científica qualificada, há ainda uma grande demanda a ser suprimida quanto ao conhecimento científico da vegetação e da flora do estado.

Os órgãos dos Governos Estadual e Federal, que possuem como função fomentar e executar políticas públicas quanto a pesquisa, inovação e desenvolvimento, ou quanto a conservação e preservação dos recursos naturais devem renovar o compromisso junto a comunidade acadêmica para novos estudos na área, principalmente no interior do estado.

Este primeiro levantamento sobre os trabalhos desenvolvidos na área deve ser intensificado, como forma de consulta e guia para reunir instituições e pesquisadores com o objetivo comum de conhecer a flora do estado, para conservar.

## 5. REFERÊNCIAS

ABSY, M.L.; PRANCE, G.T.; BARBOSA, E.M. Inventário Florístico de Floresta Natural na Área da Estrada Cuiabá-Porto Velho (BR-364). **Acta Amazonica**, v.17, p.85-121, 1987.

ANDRADE, R.T.G.; PANSINI, S.; SAMPAIO, A.F.; RIBEIRO, M.S.; CABRAL, G.S.; MANZATO, A.G. Fitossociologia de uma floresta de terra firme na Amazônia Sul-Occidental, Rondônia, Brasil. **Biota Amazônica**, v.7, n.2, p.36-43, 2017.

BENTES-GAMA, M.M.; LEAL, G.S.; BARROS, J.O.; LOPES, R.H.; LÓPEZ, G.F.Z.; SILVEIRA, J.C. **Características da estrutura de uma floresta de terra firme em Porto Velho, Rondônia**. Circular técnica 109, EMBRAPA Porto Velho, 2009.

CARLEIAL, S.; BIGIO, N.C. What survived from the PLANAFLORO Project: Angiosperms of Rondônia State, Brazil. **Check List.**, v. 10, p. 33-45, 2014.

CASULO, K.R. **Análise da Similaridade florística e estrutural das formações florestais inundáveis em um trecho do alto Rio Madeira e de seus Afluentes.** Dissertação (Mestrado Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente). Fundação Universidade Federal de Rondônia. 2012.

MACIEL U.N; LISBOA P.L.B. Estudo florístico de 1 hectare de mata de terra firme no km 15 da Rodovia Presidente Médici – Costa Marques (RO – 429), Rondônia. **Boletim Museu Emílio Goeldi.**, v.5, n.1, p.25-37, 1989.

MIRANDA I.S.; ALMEIDA S.S.; DANTAS P.J. Florística e estrutura de comunidades arbóreas em Cerrados de Rondônia, Brasil. **Acta Amazonica.**, v.36, n.4, p.419-430, 2006.

MOSER, P. **Vegetação arbórea e sua relação com fatores ambientais e espaciais em florestas de terra firme no noroeste de Rondônia, Brasil.** Dissertação (Mestrado Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente). Fundação Universidade Federal de Rondônia. 2013.

MOURA, V.; ROSSELL, E.C.F.; MASCARENHAS, A.R.P. Análise fitossociológica de uma floresta ombrófila aberta em diferentes modelos de colonização da Amazônia. **Nativa.**, v.5, n.2, p.18-126, 2017.

PERIGOLO, N.A. **Caracterização dos tipos vegetacionais do Médio Rio Madeira, Rondônia.** Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, 2014.

REIS N.F.C. **Estrutura Fitossociológica em um Trecho da Floresta Ombrófila Aberta. Localizado no Campus Universitário José Ribeiro Filho, Porto Velho – RO.** Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Fundação Universidade Federal de Rondônia, 2007.

SALOMÃO, R.P.; LISBOA, P.L.B. Análise ecológica da vegetação de uma floresta pluvial Tropical de Terra Firme, Rondônia. **Boletim Museu Emílio Goeldi, Série Botânica.**, v.4, n.2, p.195-233, 1988.

SANTOS, N.B. **Análise da estrutura fitossociológica da comunidade arbustiva e arbórea de uma floresta ombrófila densa aluvial no município de Porto Velho, Rondônia.** Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Fundação Universidade Federal de Rondônia, 2007.

SILVA, A.P.F.F.; BENTES-GAMA, M.M. Fitossociologia de uma Floresta Ombrófila Aberta em área de assentamento rural no distrito de Jaci Paraná, Porto Velho, Rondônia. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais.**, v.4, n.3, p. 435-452, 2008.

VIEIRA, A.H.; MARTINS, E.P.; SILVEIRA, A.L.P.; PEQUENO, P.L.L.; LOCATELLI, M. **Fitossociologia de um Fragmento Florestal na Região de Machadinho d'Oeste, RO.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. EMBRAPA, Porto Velho, 2002

## TECNOLOGIAS EM GENÉTICA MOLECULAR PARA INTENSIFICAÇÃO DO USO DE AMENDOIM FORRAGEIRO EM PASTAGENS NA AMAZÔNIA

Jônatas Chagas de Oliveira<sup>1</sup> e Tatiana de Campos<sup>1,2</sup>

1. Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Rede Bionorte), Rio Branco, Acre, Brasil;
2. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (PPG CITA), Rio Branco, Acre, Brasil.

### RESUMO

O setor agropecuário brasileiro tem apresentado crescente participação na economia, especialmente no mercado exportador mundial, onde a pecuária de corte tem destaque. O desafio é continuar a aumentar a produção e, simultaneamente, reduzir o desmatamento. Investimentos em tecnologia buscam tornar a pecuária mais sustentável, como o uso de gramíneas consorciadas com leguminosas forrageiras. O amendoim forrageiro (*Arachis pintoï*) destaca-se dentre as leguminosas forrageiras por seu alto teor de proteína, boa cobertura do solo e compatibilidade com gramíneas, além da fixação biológica de nitrogênio. O programa de melhoramento do amendoim forrageiro tem como objetivo desenvolver novas cultivares adaptadas aos diversos climas do território brasileiro. Os marcadores moleculares são ferramentas importantes nesse processo, fornecendo informações sobre a divergência genética em banco de germoplasma, taxa de reprodução cruzada, e também no processo de certificação de hibridação.

**Palavras-Chave:** *Arachis pintoï*, marcadores moleculares, diversidade genética.

### ABSTRACT

The Brazilian agricultural sector has shown an increasing participation in the economy, especially in the world export market, where the beef cattle industry is highlighted. The challenge is to continue to increase production while reducing deforestation. Investments in technology seek to make livestock more sustainable, such as the use of grasses consorted with forage legumes. Forage peanuts (*Arachis pintoï*) stands out among forage legumes due to their high protein content, good soil cover and compatibility with grasses, as well as biological nitrogen fixation. The forage peanut breeding program aims to develop new cultivars adapted to the different climates of the Brazilian territory. Molecular markers are important tools in this process, providing information on genetic divergence in germplasm bank, cross-breeding rate, and also in the hybridization certification process.

**Keywords:** *Arachis pintoï*, molecular markers, genetic diversity.

## 1. INTRODUÇÃO

A agropecuária brasileira tem conquistado cada vez mais o mercado internacional. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC), o agronegócio contribuiu com 22% do produto interno bruto (PIB) brasileiro, o que correspondeu a R\$ 1,42 trilhões em 2017. Considerando somente o PIB do agronegócio, a pecuária contribuiu com 31%, o equivalente a R\$ 430 bilhões.

O rebanho brasileiro tem crescido significativamente ao longo dos anos. Em 1974, o efetivo do rebanho era de 92,49 milhões de cabeças. Já em 2017, o efetivo foi de 221,81 milhões (IBGE, 2018), o que representou um crescimento de 132,34%.

A ocupação territorial da Amazônia legal influenciou diretamente no crescimento do rebanho na região. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2018), o rebanho bovino na Amazônia legal em 1974 era de 8,58 milhões de cabeças e teve um aumento de 896,37%, passando para 85,50 milhões em 2017. Assim, a pecuária é uma das atividades primárias mais importantes para a região. Considerando os municípios da Amazônia legal, 54,48% possuem uma pecuária bovina com baixo nível tecnológico e apenas 9,34% com nível tecnológico mais avançado (SANTOS et al., 2017). Isso significa que o sistema predominante ainda é o extensivo.

Nos últimos anos, a pressão pela redução do desmatamento tem crescido especialmente no mercado internacional onde os consumidores estão cada vez mais em busca do “boi verde” ou “boi de capim”. O desafio da pecuária brasileira é encontrar alternativas que permitam atender as demandas do mercado interno e externo, evitando a expansão do desmatamento através do aumento de produtividade (DIAS-FILHO, 2011; GARCIA et al., 2017; ZU ERMGASSEN et al., 2018).

O uso de pastagens consorciadas de gramíneas com leguminosas forrageiras apresenta vantagens, pois além de realizar a fixação biológica de nitrogênio também são uma fonte importante de proteína aos animais (LIMA et al., 2003), contribuindo na melhoria da fertilidade do solo e na produtividade animal.

Dentre as leguminosas forrageiras, o amendoim forrageiro tem-se destacado por possuir elevados teores de proteína bruta (entre 13 a 22%) e alta compatibilidade com gramíneas vigorosas sob pastejo intensivo, aumentando a produtividade em relação às pastagens exclusivas de gramíneas (LASCANO, 1994; LIMA et al., 2003). No Estado do Acre, o amendoim forrageiro apresentou um impacto positivo de aproximadamente R\$ 104

milhões ao ano em pastagens consorciadas (EMBRAPA, 2018). Entretanto, apesar disso ainda existem poucas cultivares disponíveis aos produtores. Por esse motivo, o programa de melhoramento de amendoim forrageiro tem o objetivo de desenvolver novas cultivares adaptadas as diversas condições edafoclimáticas do território brasileiro.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 USO DE AMENDOIM FORRAGEIRO EM PASTAGENS CONSORCIADAS NA AMAZÔNIA

Dentre as alternativas para uma pecuária sustentável, a intensificação do sistema produtivo na agropecuária tem-se destacado. A intensificação parte do princípio que uma maior quantidade de animais pode ser criada em uma mesma área (SWAIN et al., 2018), o que permite o aumento da produtividade sem a necessidade da expansão das pastagens através da derrubada de novas áreas. Entretanto, para que isso seja possível é necessário o investimento em tecnologias que irão permitir o aumento da produtividade, tais como: ambiente de produção altamente controlado, uso de alimentação comercial com otimização nutricional e aplicação de técnicas avançadas de melhoramento animal, o que produzirá animais maiores e que estarão prontos para o abate mais rápido do que no sistema extensivo tradicional (SWAIN et al., 2018).

Algumas medidas para a implementação da intensificação da produção pecuária na Amazônia têm sido avaliadas, dentre elas destacam-se os sistemas de pastejo rotacional, os sistemas silvipastoris com pastejo rotacional e o uso de pastagens consorciadas com leguminosas forrageiras.

O uso de pastagens consorciadas de gramíneas com leguminosas forrageiras é apontado como uma das possibilidades até para os pequenos produtores na região Amazônica. Essa prática permite a fixação biológica do nitrogênio ao solo, evitando a degradação das pastagens e melhorando a qualidade produtiva do solo, além de agregar maior valor nutricional ao pasto (SÁ; BAYMA; CARNEIRO JÚNIOR, 2008).

A implementação desse sistema no Estado do Acre ocorreu em 1976, pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). A puerária (*Pueraria phaseoloides*) foi a primeira leguminosa a ser adotada (VALENTIM; ANDRADE, 2005). A produtividade a partir desse consórcio foi de 4,9 a 12,5@/ha/ano. No entanto, houve baixa compatibilidade com o capim Estrela Africano sob pastejo intensivo.

Diante desse problema, a Embrapa divulgou o uso do amendoim forrageiro (*Arachis pinto* Krapov. & W.C. Greg.), através da cultivar Belomonte (Figura 1). O efeito da introdução de amendoim forrageiro em pastos de braquiária (*Brachiaria humidicola* cv. Comum) representaram um aumento de 42% na produtividade sobre o ganho de peso de novilhos Nelore (URBANSKI, 2016). A média de ganho de peso diário foi de 0,263kg/animal/dia na pastagem consorciada, enquanto que na pastagem exclusiva de gramínea foi de 0,186kg/animal/dia. Tais ganhos representaram a redução no tempo de abate de 37 para 29 meses.



Jônatas Chagas de Oliveira

**Figura 1.** Acessos do Banco Ativo de Germoplasma localizado na Embrapa Acre.

O ganho em animais castrados também foi expressivo. Animais castrados do pasto consorciado apresentaram produtividade 37% superior aos castrados do pasto puro (MACHADO, 2017). E ainda, os animais não castrados do pasto consorciado apresentaram desempenho 46,8% superior aos castrados de pasto puro.

Em outro estudo realizado por Maia (2018), os animais Nelore do pasto consorciado apresentaram acréscimo de 29,25% no ganho de peso total em relação aos de pasto puro. Animais cruzados com Aberdeen Angus tiveram ganho de peso total 65,46% maior do que os animais cruzados de pasto puro.

Esses ensaios demonstram a significativa rentabilidade do uso do amendoim forrageiro em pastagens consorciadas no processo de engorda do rebanho.

Na pecuária de leite os resultados também foram positivos. Lascano (1994) relatou um aumento de 17% a 20% na produção de leite. Em consórcio do amendoim forrageiro com capim Estrela foram observados aumentos de 1,4 kg de leite/vaca (GONZALES et al., 1996). Em uma pequena propriedade familiar no Estado do Acre, o amendoim forrageiro foi utilizado como banco de proteína e resultou no aumento na produção de leite de 3,6 para 5,2 L/vaca/dia (VALENTIM; CARNEIRO; SALES, 2001).

Ainda existem apenas seis cultivares catalogadas no Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2019). Dentre essas cultivares, Amarillo e Belomonte são as mais utilizadas no mercado.

A cultivar Amarillo foi a primeira a ser lançada. Foi obtida a partir do primeiro acesso de *A. pintoi* coletado em 1954, por Geraldo Pinto no vale do rio Jequitinhonha, o qual chegou até o Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, onde recebeu a identificação CIAT 17434. Foi levada à Austrália, onde foi lançada com o nome de Amarillo. Esse genótipo foi liberado comercialmente na Colômbia em 1992 (Maní Forrajero Perene), no México e Honduras em 1993 (Pico Bonito), na Costa Rica em 1994 (Maní Mejorador), e no Brasil em 1995 (Matsuda Genética 100 ou MG-100), onde recebeu o BRA 013251 (VALLS, 1992; BARCELLOS et al., 2000).

A cultivar Belomonte foi lançada no Brasil em 1999, tendo sua propagação por estolões, uma vez que possui baixa produção de sementes (PEREIRA; RESENDE; SANTANA, 1999; PAGANELLA; VALLS, 2002).

A cultivar BRS Mandobi foi obtida por meio de seleção massal, através de uma rede de avaliação de acessos instalada em 1999 (ASSIS; VALENTIM, 2009). Foi registrada em 2008 no Registro Nacional de Cultivares, e foi protegida segundo as normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em 2011. É uma cultivar bem adaptada a região tropical e equatorial, com boa produtividade de biomassa, bom estabelecimento, boa tolerância a solos bem drenados ou com baixa permeabilidade (ASSIS, 2011). A principal característica dessa cultivar é a elevada produção de sementes, aproximadamente 3 t/ha/ano de sementes puras, após 18 a 21 meses de plantio. Tal característica a coloca como uma alternativa para a redução de custo do plantio do amendoim forrageiro pelos produtores (ASSIS; VALENTIM; ANDRADE, 2013).

Com a evolução das técnicas da genética molecular, o conhecimento sobre a espécie tem sido ampliado. Por esse motivo, os programas de melhoramento têm investido cada vez mais na genética molecular como um suporte.

## 2.2 ESTUDOS GENÉTICOS COM AMENDOIM FORRAGEIRO

### 2.2.1 Marcadores moleculares

O uso de marcadores moleculares em estudos com plantas tem sido cada vez maior, especialmente, por permitir a identificação precisa de diferenças (polimorfismo) entre genótipos. Os marcadores moleculares baseados no DNA permitem que o polimorfismo seja visualizado sem a interferência do ambiente, o que não ocorre com marcadores morfológicos (RAMALHO et al., 2012).

Dentre os marcadores moleculares, os microssatélites, também conhecidos como SSRs (*Simple Sequence Repeats*), são sequências curtas de DNA repetitivo compostas de um a seis nucleotídeos que ocorrem em todos os organismos (KALIA et al., 2011; RAMALHO et al., 2012). Sua amplificação é realizada *in vitro* por meio de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), o que permite que pequenas quantidades de DNA possam ser analisadas (KALIA et al., 2011).

As principais vantagens desses marcadores são: natureza codominante, que possibilita a identificação de indivíduos heterozigotos; seu alto grau de polimorfismo, permite detectar um grande número de alelos por loco; regiões flaqueadoras aos microssatélites, em geral, são altamente conservadas dentro de cada gênero, o que permite a transferência entre espécies (KALIA et al., 2011). A principal desvantagem é o custo envolvido em seu desenvolvimento.

No gênero *Arachis* existem, aproximadamente, 4,5 mil marcadores microssatélites (HE et al., 2003; FERGUSON et al., 2004; MORETZSOHN et al., 2005; MARTINS et al., 2006; GIMENES et al., 2007; PROITE et al., 2007; CUC et al., 2008; GUO et al., 2008; NAITO et al., 2008; LIANG et al., 2009; QIN et al., 2012; SHIRASAWA et al., 2012, 2013; TANG et al., 2012; WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2012; HUANG et al., 2016; ZHOU et al., 2016). A maioria foi desenvolvida para o amendoim comum (*A. hypogaea*), em virtude de sua importância econômica.

Para o amendoim forrageiro (*A. pinto*), existem atualmente 25 locos (PALMIERI et al., 2002; PALMIERI et al., 2005; PALMIERI et al., 2010). Estes locos apresentaram elevados índices de polimorfismo e transferibilidade dentro do gênero *Arachis* (BRAVO et al., 2006; GIMENES et al., 2007; ANGELICI et al., 2008; PALMIERI et al., 2010; AZÊVEDO et al., 2016). Um protocolo foi desenvolvido para identificar híbridos em cruzamentos controlados de amendoim forrageiro, indicando os melhores locos (CAMPOS et al., 2016). Essa é uma etapa essencial para o desenvolvimento de novas cultivares, pois permite a

identificação entre genótipos que, na maior parte dos casos, não podem ser identificados através de descritores morfológicos.

Quando se considera características ideais para genotipagem, como ausência de bandas inespecíficas e elevado polimorfismo, esse número se restringe a 10 locos com adequado padrão (AZÊVEDO et al., 2016). Dessa forma, como há a necessidade de ampliar a quantidade de marcadores moleculares, novas metodologias têm sido utilizadas. Dentre essas, o RNA-Seq (*RNA sequencing*) é uma técnica robusta e tem permitido o estudo do genoma funcional de espécies que ainda não possuem sequências genômicas disponíveis (WIT et al., 2012). O RNA-Seq acessa diretamente regiões codificantes do genoma, além de possuir resolução de uma base, o que a torna útil para estudos de organismos com genomas funcionais (transcriptomas) complexos (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

Com o uso do RNA-Seq é possível desenvolver milhares de SSRs com menor custo e esforço do que as técnicas tradicionais (TAHERI et al., 2018). No gênero *Arachis* essa técnica tem sido empregada, principalmente, no amendoim comum e nas espécies silvestres mais próximas filogeneticamente (*A. hypogaea*, *A. ipaensis* e *A. duranensis*) (CHOPRA et al., 2014), permitindo a identificação de, aproximadamente, 250 mil SSRs através das sequências depositadas em bancos de dados públicos e novos dados de transcriptomas (ZHANG et al., 2012; PENG et al., 2016; LOU et al., 2017; WANG et al., 2018). Atualmente, Oliveira JC executa um projeto de doutorado com essa técnica para o desenvolvimento de microssatélites funcionais para *A. pintoii* (comunicação pessoal).

## **2.2.2 Estudos moleculares associados ao programa de melhoramento**

### **2.2.2.1 Caracterização da diversidade genética molecular de amendoim forrageiro**

Uma das formas de conservação de espécies é *ex situ*, na qual as espécies são conservadas fora do seu ambiente natural. A conservação de uma espécie em banco ativo de germoplasma (BAG) tem por objetivo preservar a variabilidade genética, evitando a perda de alelos. Para este fim, são coletadas amostras (acessos) silvestres e domesticados, visando obter a representatividade da máxima variabilidade genética possível da espécie conservada (BORÉM; MIRANDA, 2009). No entanto, os bancos de germoplasma podem ter uma grande quantidade de acessos e, em muitos casos, pode haver duplicatas, o que aumenta o custo e trabalho na manutenção (MOURA et al., 2013). Por esse motivo, estudos de caracterização molecular dos BAGs são importantes, pois

permitem a identificação de acessos redundantes, além de fornecer maiores informações sobre a divergência genética que podem auxiliar no trabalho dos pesquisadores.

Azêvedo (2014) avaliou a diversidade genética de todos os 145 acessos do BAG de amendoim forrageiro das espécies *A. pintoii*, *A. repens*, *A. glabrata*, *A. helodes* e híbridos intra e interespecíficos localizados na Embrapa Acre, com marcadores microssatélites. Foram encontrados valores elevados de diversidade genética e ausência de duplicatas, indicando que os acessos possuem uma boa representatividade da base genética dos centros de origem. Não houve a detecção de grupos definidos com base nas espécies *A. pintoii* e *A. repens*, confirmando a similaridade filogenética compartilhada entre essas espécies (AZÊVEDO et al., 2016).

Os dados de genotipagem também forneceram informações para a estimativa de uma coleção nuclear com base molecular. Foram identificados 15 acessos representativos da diversidade do BAG existente para *A. pintoii* e *A. repens* (AZÊVEDO et al., 2015). Dentre os acessos da coleção nuclear, houve também a representação de características morfológicas únicas no germoplasma: a maior média para o comprimento do folíolo basal, único acesso com flor branca, presença de florescimento precoce. Assim, a análise molecular conseguiu discriminar efetivamente genótipos divergentes. Conclui-se que houve a detecção de um número mínimo de acessos para ser usado como coleção de trabalho e referência da diversidade da espécie.

Os resultados da diversidade molecular de amendoim forrageiro forneceram informações inéditas e valiosas para o conhecimento e o avanço do melhoramento na espécie. A divergência molecular também poderá ser usada juntamente à caracterização morfológica para escolha de genitores do programa de melhoramento.

#### 2.2.2.2 Estimativa da reprodução cruzada em amendoim forrageiro

O sistema reprodutivo define como os genes são transmitidos para a próxima geração. Por isso, seu conhecimento é fundamental para estudos de conservação *ex situ* e melhoramento de plantas, pois permite delinear estratégias que aperfeiçoem a amostragem da variabilidade genética, além de nortear as melhores formas de multiplicação de sementes e os modelos mais adequados de melhoramento. Apesar disso, informações sobre a taxa de cruzamento no gênero *Arachis*, são limitadas a espécie *Arachis hypogaea*, o amendoim comum (COFFELT, 1989; KNAUFT; CHIYEMBEKEZA; CORBET, 1992) e são baseadas em marcadores morfológicos.

Em relação ao sistema reprodutivo, as plantas podem ser classificadas em autógamias, alógamas e mistas. Os métodos tradicionais de determinação do sistema de reprodução consistem na observação dos cruzamentos, comportamento dos polinizadores, exame da morfologia floral e resultados de experimentos controlados de polinização (MORAES; MONTEIRO, 2002).

A determinação do sistema reprodutivo pode ser feita por meio de marcadores moleculares, que possuem muitos locos com alelos codominantes e segregantes, e são encontrados frequentemente nas populações, possibilitando a obtenção de estimativas mais acuradas da taxa de cruzamento (RITLAND; JAIN, 1981).

Para avaliar a reprodução cruzada em *A. pintoii*, Oliveira (2015) analisou 14 acessos do BAG localizado na Embrapa Acre. A taxa de cruzamento variou entre os acessos analisados (2% a 91%), com valor médio de 36% para a espécie (Tabela 1).

**Tabela 1.** Estimativas da taxa de cruzamento para os acessos de *A. pintoii*.  $t_m$ : taxa de cruzamento multilocos;

<b>Acesso</b>	<b><math>t_m</math></b>
V 6727	0,704 ±0,071
V 6784	0,625 ±0,154
W 34	0,173 ±0,074
W 647	0,564 ±0,062
V 5895	0,168 ±0,065
V 6740	0,792 ±0,096
V 13196	0,118 ±0,040
V 13198	0,425 ±0,074
V 6791wf	0,309 ±0,064
Belomonte	0,916 ±0,001
W 1000	0,265 ±0,094
BRS Mandobi	0,864 ±0,193
Amarillo MG-100	0,019 ±0,000
V 13888	0,266 ±0,062
<i>A. pintoii</i>	0,367 ±0,076

Esses valores indicaram que a espécie possui um sistema de cruzamento misto com predominância de autogamia, e que os polinizadores podem influenciar significativamente a taxa de cruzamento. Até a realização desse estudo, acreditava-se que as espécies do gênero *Arachis* eram autógamias restritas devido aos estudos com marcadores morfológicos em amendoim comum que detectaram valores de fecundação

cruzada entre 1,5 e 8% (COFFELT, 1989; KNAUFT; CHIYEMBEKEZA; CORBET, 1992) e devido a anatomia do sistema floral (COSTA, 2012). O resultado da estimativa molecular conseguiu detectar com maior acurácia o fluxo gênico entre os acessos e comprovou uma mudança conceitual na perspectiva da biologia reprodutiva da espécie.

A partir dessas informações, novas estratégias de conservação do BAG devem ser adotadas para evitar a atuação dos polinizadores, o que pode resultar no efetivo cruzamento entre acessos da coleção. Além disso, as estratégias para melhoramento de *A. pintoi* também devem ser alteradas, o que interfere na forma como são realizados os cruzamentos, o avanço de gerações e produção de sementes, por exemplo.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção da pecuária brasileira precisa acompanhar a demanda crescente do mercado nacional e internacional. No entanto, para que ocorram mudanças reais na pecuária, especialmente na Amazônia, são necessárias medidas que facilitem o acesso dos produtores ao sistema produtivo com nível tecnológico elevado, o que irá resultar em redução do desmatamento e no aumento da renda dos produtores. Estratégias e tecnologias estão sendo desenvolvidas para alcançar esse objetivo. O uso do amendoim forrageiro em pastagens consorciadas é uma alternativa que tem resultados positivos não somente no ganho de peso e produção de leite, mas também na recuperação da fertilidade do solo e qualidade das pastagens. Com o objetivo de tornar o uso do amendoim forrageiro mais atrativo aos produtores, pesquisadores têm buscado desenvolver novas cultivares. Estudos moleculares têm fornecido informações importantes sobre a biologia do amendoim forrageiro, o que tem contribuído no avanço do conhecimento da espécie para uso no melhoramento.

A perspectiva é que nos próximos anos seja possível empregar técnicas ainda mais avançadas que fornecerão respostas em relação a expressão gênica, transcriptoma, desenvolvimento de mapas de ligação e mapeamento de QTLs, seleção genômica ampla.

### 4. REFERÊNCIAS

ABIEC. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. **Abiec: Perfil da pecuária no Brasil**. Disponível em: <<https://www.beefpoint.com.br/abiec-perfil-da-pecuaria-no-brasil/>> acesso em 23/01/2019.

ANGELICI, C.M.L.C.D.; HOSHINO, A.A.; NÓBILE, P.M.; PALMIERI, D.A.; VALLS, J.F.M.; GIMENES, M.A.; LOPES, C.R. Genetic diversity in section *Rhizomatosae* of the genus *Arachis* (Fabaceae) based on microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 79-88, 2008.

ASSIS, G.M.L. **Produção de sementes de *Arachis pinto* cv. BRS BRS Mandobi no Acre.** Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amendoim/ProducaoSementesArachisAcre/index.htm>>. Acessado em 13/05/2018.

ASSIS, G.M.L.; VALENTIM, J.F. Forage peanut breeding program in Brazil. **Proceedings of the 2nd International Symposium of Forage Breeding**, 2009.

ASSIS, G.M.L.; VALENTIM, J.F.; ANDRADE, C.M.S. BRS Mandobi: a new forage peanut cultivar propagated by seeds for the tropics. **Tropical Grasslands-Forrajões Tropicais**, v. 1, n. 1, p. 39-41, 2013.

AZÊVEDO, H.S.F.S. **Caracterização da diversidade genética de amendoim forrageiro com marcadores microssatélites.** (Dissertação) Mestrado em Ciência, Inovação e Tecnologia para Amazônia – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, 2014.

AZÊVEDO, H.S.F.S.; ALVES FILHO, J.; SOUSA, A.C.B.; ASSIS, G.M.L.; CAMPOS, T. A coleção nuclear de germoplasma de amendoim forrageiro. **I Congresso Regional de Pesquisa do Estado do Acre e XXIV Seminário de Iniciação Científica da UFAC**, 2015.

AZÊVEDO, H.S.F.S.; SOUSA, A.C.B.; MARTINS, K.; OLIVEIRA, J.C.; YOMURA, R.B.T.; SILVA, L.M.; VALLS, J.F.M.; ASSIS, G.M.L.; CAMPOS, T. Genetic diversity of the forage peanut in the Jequitinhonha, São Francisco, and Paranã River valleys of Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n. 3, p. 1-11, 2016.

BARCELLOS, A.O.; ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T.; VILELA, L. Potencial e uso de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucena*. **Simpósio sobre Manejo da Pastagem**, 2000.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares.** 2ª ed. Editora UFV, 2009.

BRAVO, J.P.; HOSHINO, A.A.; ANGELICI, C.M.L.C.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A. Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 516-524, 2006.

CAMPOS, T.; AZÊVEDO, H.S.F.S.; OLIVEIRA, J.C.; FERREIRA FILHO, J.A.; YOMURA, R.B.T.; SILVA, L.M. **Protocolo para identificação de híbridos de amendoim forrageiro utilizando marcador molecular microssatélite.** Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/156276/1/26263.pdf>>. Acessado em 22/02/2019.

CHOPRA, R.; BUROW, G.; FARMER, A.; MUDGE, J.; SIMPSON, C.E.; BUROW, M.D. Comparisons of *de novo* transcriptome assemblers in diploid and polyploid species using peanut (*Arachis* spp.) RNA-seq data. **PLoS ONE**, v.9, n.12, p. 1-16, 2014.

COFFELT, T.A. Natural crossing of peanut in Virginia. **Peanut Science.**, v.16, p. 46-48, 1989.

COSTA, L.C. **Biologia floral de espécies do gênero *Arachis* L. (Fabaceae-Papilionoideae), com ênfase em aspectos da morfologia floral e na anatomia de ovários.** (Tese) Doutorado em Botânica – Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2012.

CUC, L.M.; MACE, E.S.; CROUCH, J.H.; QUANG, V.D.; LONG, T.D.; VARSHNEY, R.K. Isolation and characterization of novel microsatellite markers and their application for diversity assessment in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **BMC Plant Biology.**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2008.

DIAS FILHO, M.B. Os desafios da produção animal em pastagens na fronteira agrícola brasileira. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v. 40, p. 243-252, 2011.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Balanco Social da Embrapa 2017.** Disponível em: <<https://bs.sede.embrapa.br/2017/balancosocialeembrapa2017web.pdf>> acesso em 14/02/2019.

FERGUSON, M.E.; BUROW, M.D.; SCHULZE, S.R.; BRAMEL, P.J.; PATERSON, A.H.; KRESOVICH, S.; MITCHELL, S. Microsatellite identification and characterization in peanut (*A. hypogaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics.**, v. 108, n. 6, p. 1064-1070, 2004.

GARCIA, E.; RAMOS FILHO, F.S.V.; MALLMANN, G.M.; FONSECA, F. Costs, benefits and challenges of sustainable livestock intensification in a major deforestation frontier in the Brazilian Amazon. **Sustainability.**, v. 9, n. 1, p. 158-174, 2017.

GIMENES, M.A.; HOSHINO, A.A.; BARBOSA, A.V.G.; PALMIERI, D.A.; LOPES, C.R. Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). **BMC Plant Biology.**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2007.

GONZALES, M.S.; NEURKVAN, L.M.; ROMERO, F.; PEZO, D.A.; ARGEL, P.J. Produccion de leche en pasturas de estrella africana (*Cynodon nlemfluensis*) solo y asociado con *Arachis pintoi* o *Desmodium ovalifolium*. **Pasturas tropicales.**, v. 18, n. 1, p. 2-12, 1996.

GUO, B.Z.; CHEN, X.; DANG, P.; SCULLY, B.T.; LIANG, X.; HOLBROOK, C.C.; YU, J.; CULBREATH, A.K. Peanut gene expression profiling in developing seeds at different reproduction stages during *Aspergillus parasiticus* infection. **BMC Developmental Biology.**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2008.

HE, G.M.; NEWMAN, M.G.G.; PITTMAN, R.N.; PRAKASH, C.S. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*A. hypogaea* L.). **BMC Plant Biology.**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2003.

HUANG, L.; WU, B.; ZHAO, J.; LI, H.; CHEN, W.; ZHENG, Y.; REN, Y.; ZHOU, X.; LEI, Y.; LIAO, B.; JIANG, H. Characterization and transferable utility of microsatellite markers in the wild and cultivated *Arachis* species. **PLoS ONE.**, v. 11, n. 5, p. 1-15, 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA.** Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>>. Acesso em 14/02/2019.

KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica.**, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2011.

KNAUFT, D.A.; CHIYEMBEKEZA, A.J.; CORBET, D.W. Possible Reproductive Factors Contributing to Outcrossing in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Peanut Science.**, v.19, p. 29-31, 1992.

LASCANO, C.E. Nutritive value and animal production of forage Arachis. In: KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. **Biology and agronomy of forage Arachis.** CIAT, 1994.

LIANG X.; CHEN, X.; HONG, Y.; LIU, H.; ZHOU, G.; LI, S.; GUO, B. Utility of EST-derived SSR in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) and *Arachis* wild species. **BMC Plant Biology.**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2009.

LIMA, J.A.; PINTO, J.C.; EVANGELISTA, A.R.; SANTANA, R.A.V. **Amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov. & Greg).** Disponível em: <<http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdfextensao/bol01.pdf>>. Acessado em 24/08/2016.

LUO, H.; XU, Z.; LI, Z.; LI, X.; LV, J.; REN, X.; et al. Development of SSR markers and identification of major quantitative trait loci controlling shelling percentage in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics.**, v. 130, n. 8, p. 1635-1648, 2017.

MACHADO, M.L.C. **Desempenho de novilhos Nelore castrados e não-castrados sob pastejo em *Brachiaria humidicola* pura e em consórcio com amendoim forrageiro.** (Dissertação) Mestrado em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, 2017.

MAIA, G.F.N. **Desempenho produtivo de dois grupos genéticos de bovinos de corte em pastos puros e consorciados na Amazônia Ocidental.** (Dissertação) Mestrado em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, 2018.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **CultivarWeb.** Disponível em: <[http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares\\_registradas.php](http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php)>. Acesso em 24/01/2019.

MARTINS, W.S.D.; PROITE, K.P.; MORETZSOHN, M.; BERTIOLI, D.J. New softwares for automated microsatellite marker development. **Nucleic Acids Research.**, v. 34, n. 4, p. 1-4, 2006.

MORETZSOHN, M.C.; LEOI, L.; PROITE, K.; GUIMARÃES, P.M.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; GIMENES, M.A.; et al. A microsatellite based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). **Theoretical and Applied Genetics.**, v. 111, n. 6, p. 1060-1071, 2005.

NAITO, Y.; SUZUKI, S.; IWATA, Y.; KUBOYAMA, T. Genetic diversity and relationship analysis of peanut germplasm using SSR markers. **Breeding Science.**, v. 58, n. 3, p. 293-300, 2008.

OLIVEIRA, J.C. **Taxa de cruzamento e diversidade genética em *Arachis pintoi* com marcadores microssatélites.** (Dissertação) Mestrado em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, 2015.

PAGANELLA, M.B.; VALLS, J.F.M. Caracterização morfológica de cultivares e acessos selecionados de *Arachis pintoi* Krapov. & Gregory. **Pasturas Tropicales.**, v. 24, n. 2, p. 23-30, 2002.

PALMIERI, D.A.; BECHARA, M.D.; CURI, R.A.; GIMENES, M.A.; LOPES, C.R. Novel polymorphic microsatellite markers in section *Caulorrhizae* (*Arachis*, Fabaceae). **Molecular Ecology Notes.**, v. 5, n. 1, p. 77-79, 2005.

PALMIERI, D.A.; BECHARA, M.D.; CURI, R.A.; MONTEIRO, J.P.; VALENTE, S.E.S.; GIMENES, M.A.; LOPES, C.R. Genetic diversity analysis in the section *Caulorrhizae* (genus *Arachis*) using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology.**, v. 33, n. 1, p. 109-118, 2010.

PALMIERI, D.A.; HOSHINO, A.A.; BRAVO, J.P.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A. Isolation and characterization of microsatellite loci from the forage species *Arachis pintoi* (Genus *Arachis*). **Molecular Ecology Notes.**, v. 2, n. 4, p. 551-553, 2002.

PENG, Z.; GALLO, M.; TILLMAN, B.L.; ROWLAND, D.; WANG, J. Molecular marker development from transcript sequences and germplasm evaluation for cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Molecular Genetics and Genomics.**, v. 291, n. 1, p. 363-381, 2016.

PEREIRA, J.M.; RESENDE, C.P.; SANTANA, J.R. **Amendoim forrageiro cv. Belomonte (*Arachis pintoi* Krapov & Gregory): Uma nova opção de leguminosa forrageira.** Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/amendoim%20forrageiro.htm>> Acessado em 20/02/2019.

PROITE, K.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; BERTIOLI, D.J.; MORETZSOHN, M.C.; SILVA, F.R.; MARTINS N.F.; GUIMARÃES, P.M. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. **BMC Plant Biology.**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2007.

QIN, H.; FENG, S.; CHEN, C.; GUO, Y.; KNAPP, S.; CULBREATH, A.; HE, G.; WANG, M.L.; ZHANG, X.; HOLBROOK, C.C.; OZIAS-AKINS, P.; GUO, B. An integrated genetic linkage map of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) constructed from two RIL populations. **Theoretical and Applied Genetics.**, v. 124, n. 4, p. 653-664, 2012.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.; SOUZA, E.A.; GONÇALVES, F.M.A.; SOUZA, J.C. **Genética na Agropecuária.** 5ª ed. Editora UFLA, 2012.

SANTOS, M.A.S.; JÚNIOR, J.B.L.; SANTANA, A.C.; HOMMA, A.K.O.; ANDRADE, S.J.T.; SILVA, A.G.M. Caracterização do nível tecnológico da pecuária bovina na Amazônia Brasileira. **Revista de Ciências Agrárias.**, v. 60, n. 1, p. 103-111, 2017.

SHIRASAWA, K.; BERTIOLI, D.J.; VARSHNEY, R.K.; MORETZSOHN, M.C.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; THUDI, M.; et al. Integrated consensus map of cultivated peanut and wild relatives reveals structures of the A and B genomes of *Arachis* and divergence of the legume genomes. **DNA Research.**, v. 20, n. 2, p. 173-184, 2013.

SHIRASAWA, K.; KOILKONDA, P.; AOKI, K.; HIRAKAWA, H.; TABATA, S.; WATANABE, M.; et al. In silico polymorphism analysis for the development of simple sequence repeat and transposon markers and construction of linkage map in cultivated peanut. **BMC Plant Biology.**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2012.

SWAIN, M.; BLOMQUIST, L.; McNAMARA, J.; RIPPLE, W.J. Reducing the environmental impact of global diets. **Science of the Total Environment.**, v. 610, p. 1207-1209, 2018.

TAHERI, S.; LEE ABDULLAH, T.; YUSOP, M.R.; HANAFI, M.M.; SAHEBI, M.; AZIZI, P.; SHAMSHIRI, R.R. Mining and development of novel SSR markers using next generation sequencing (NGS) data in plants. **Molecules.**, v. 23, n. 2, p. 399-419, 2018.

TANG, M.; CHEN, Y.; REN, X.; HUANG, L.; ZHOU, X.; YAN, H.; JIANG, H. Genetic diversity of *Arachis* accessions by EST-SSR from cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Acta Agronomica Sinica.**, v. 38, p. 1221-1231, 2012.

URBANSKI, A. S. **Consórcio de pastagens como ferramenta para aumento de produtividade animal na Amazônia Ocidental.** (Dissertação) Mestrado em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, 2016.

VALENTIM, J.F.; ANDRADE, C.M.S. **Tropical kudzu (*Pueraria phaseoloides*): Successful adoption in sustainable cattle production systems in the western Brazilian Amazon.** Disponível em: <[https://www.tropicalgrasslands.asn.au/Tropical%20Grasslands%20Journal%20archive/PDFs/Vol\\_39\\_2005/Vol\\_39\\_04\\_2005\\_pp221\\_221.pdf](https://www.tropicalgrasslands.asn.au/Tropical%20Grasslands%20Journal%20archive/PDFs/Vol_39_2005/Vol_39_04_2005_pp221_221.pdf)>. Acessado em 25/01/2019.

VALENTIM, J.F.; CARNEIRO, J.C.; SALES, M.F.L. **Amendoim forrageiro cv. Belomonte para a diversificação das pastagens e conservação do solo no Acre.** Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/503361/1/cirtec43.pdf>>. Acessado em 24/01/2019.

VALLS, J.F.M. Origem do germoplasma de *Arachis pinto* disponível no Brasil. **Red International de Evaluación de Pastos Tropicales – RIEPT**, 1992.

WANG, H.; LEI, Y.; YAN, L.; WAN, L.; CAI, Y.; YANG, Z.; LV, J.; ZHANG, X.; XU, C.; LIAO, B. Development and validation of simple sequence repeat markers from *Arachis hypogaea* transcript sequences. **The Crop Journal.**, v. 6, n. 2, p. 172-180, 2018.

WANG, H.; PENMETS, R.V.; YUAN, M.; GONG, L.; ZHAO, Y.; GUO, B.; et al. Development and characterization of BAC-end sequence derived SSRs, and their incorporation into a new higher density genetic map for cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **BMC Plant Biology.**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2012.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics.**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WIT, P.; PESPENI, M.H.; LADNER, J.T.; BARSHIS, D.J.; SENECA, F.; JARIS, H.; et al. The simple fool's guide to population genomics via RNA-Seq: an introduction to high-throughput sequencing data analysis. **Molecular Ecology Resources.**, v. 12, n. 6, p. 1058-1067, 2012.

ZHANG, J.; LIANG, S.; DUAN, J.; WANG, J.; CHEN, S.; CHENG, Z.; et al. *De novo* assembly and characterization of the transcriptome during seed development, and generation of genic-SSR markers in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **BMC Genomics.**, v. 13, n. 1, p. 90-96, 2012.

ZHOU, X.; DONG, Y.; ZHAO, J.; HUANG, L.; REN, X.; CHEN, Y.; et al. Genomic survey sequencing for development and validation of single-locus SSR markers in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **BMC Genomics.**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2016.

ZU ERMGASSEN, E.K.H.J.; ALCÂNTARA, M.P.; BALMFORD, A.; BARIONI, L.; NETO, F.B.; BETTARELLO, M.M.F.; et al. Results from on-the-ground efforts to promote sustainable cattle ranching in the Brazilian Amazon. **Sustainability.**, v. 10, n. 4, p. 1301-1327, 2018.

## USO DA BIOLOGIA MOLECULAR PARA ESTUDOS GENÉTICOS EM AÇAÍZEIROS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Hellen Sandra Freires da Silva Azêvedo<sup>1</sup>, José Marlo Araújo de Azevedo<sup>2</sup>, Lucielio Manoel da Silva<sup>3</sup>, Karina Martins<sup>4</sup>, Tatiana de Campos<sup>1,5</sup>

1. Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Rede Bionorte), Porto Velho, Rondônia, Brasil;
2. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Acre;
3. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Rio Branco, AC, Brasil;
4. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Sorocaba, São Paulo, Brasil;
5. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (PPG CITA), Rio Branco, AC, Brasil.

### RESUMO

Populações de açaizeiros na Amazônia são abundantes, possuem importância econômica e têm sido foco de diferentes estudos. Os açaizeiros destacam-se por produzir um importante alimento: a “polpa de açaí” extraída dos frutos. Nos últimos anos, a demanda pela polpa aumentou de forma expressiva por possuir características energéticas, nutritivas e altos teores de fibras e antioxidantes. A extração dos frutos é baseada no extrativismo e por isso, práticas de manejo têm sido recomendadas para uma coleta sustentável. Para se recomendar taxas sustentáveis de coleta dos frutos, é fundamental o levantamento de informações sobre a variabilidade genética das populações naturais, além do monitoramento sobre o recrutamento e a dinâmica populacional. A transferibilidade dos microsatélites tem trazido bons resultados entre locos desenvolvidos para *Euterpe edulis* e aplicados para estudos em *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatoria*. Foi caracterizada ampla diversidade genética entre os acessos do banco ativo de germoplasma de *E. oleracea* situado na Embrapa Amazônia Oriental. Já nos Estados do Amazonas e do Acre, os valores encontrados foram de diversidade genética intermediários a baixos em populações de *E. precatoria*, com significativa estrutura genética espacial. Dados moleculares foram usados para identificação de uma coleção nuclear e para direcionar estratégias de conservação e coleta de sementes para conservação *in* e *ex situ* em *E. precatoria*. A genética molecular é uma ferramenta valiosa e está disponível para diversas aplicações em açaizeiro. A estimativa de parâmetros genéticos tem contribuído a cada dia para o conhecimento da genética da cultura.

**Palavras-chave:** açaí, diversidade molecular, *Euterpe*

### ABSTRACT

Populations of açai palm in the Amazon are abundant, have economic importance and have been the focus of different studies. The açai palm stands out for producing an important food: the "açai pulp" extracted from the fruits. In recent years, demand for pulp has increased significantly because it has energy, nutritional characteristics and high levels of fiber and

antioxidants. The extraction of the fruits is based on the extractivism and therefore, management practices have been recommended for a sustainable collect. In order to recommend sustainable rates of fruit collect, it is essential to collect information on the genetic variability of natural populations, as well as monitoring on recruitment and population dynamics. The transferability of the microsatellites has brought good results among loci developed for *Euterpe edulis* and applied for studies in *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. It was characterized a wide genetic diversity between the accesses of the active germplasm bank of *E. oleracea* located in Embrapa. In the states of Amazonas and Acre, the values found were of intermediate to low genetic diversity in populations of *E. precatoria*, with a significant spatial genetic structure. Molecular data were used to identify a core collection and to direct conservation and seed collect strategies for in situ and ex situ conservation in *E. precatoria*. Molecular genetics is a valuable tool and is available for several applications in açai palm. The estimation of genetic parameters has contributed every day to the knowledge of the genetics of the culture.

**Keywords:** açai, molecular diversity, *Euterpe*

## 1. INTRODUÇÃO

As palmeiras estão entre as plantas de maior distribuição, dominância e valor econômico na floresta amazônica, e constituem uma das principais fontes de produtos florestais não madeireiros (PFNM's) (STEEGE et al., 2013; MARTINOT; PEREIRA; SILVA, 2017). Entre as diversas palmeiras, os açazeiros *Euterpe oleracea* Mart. e *E. precatoria* var. *precatoria* Mart. destacam-se devido ao valor agrônomo, econômico, nutricional, social e cultural por produzir um importante alimento: a “polpa de açai” extraída dos frutos (ARANGUREN; GALEANO; BERNAL, 2014; YUYAMA et al., 2011; YAMAGUCHI et al., 2015; CEDRIM; BARROS; NASCIMENTO, 2018). Embora *E. edulis* também produza frutos de açai, o seu principal produto comercial é o palmito (LORENZI, 2010; MONTEIRO, 2017). Devido a isso, a espécie *E. edulis* não será foco nas discussões deste capítulo.

Há muito tempo, indígenas, seringueiros, extrativistas e ribeirinhos realizam a colheita dos frutos de açazeiros. Atualmente, essa atividade é responsável pela sobrevivência de muitas famílias no estuário amazônico. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de frutos de açazeiro, em 2017 foi de 219.885 mil toneladas, e a maior parte desta produção concentrou-se nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão e Acre.

Nos últimos anos, a demanda pela polpa extraída dos frutos de açazeiro aumentou de forma expressiva nos mercados nacional e internacional, principalmente, por possuir características energéticas, nutritivas e alto teores de fibras e antioxidantes (YAMAGUCHI et al., 2015; CEDRIM; BARROS; NASCIMENTO, 2018), o que tem contribuído para o

aumento da exploração intensiva dos frutos, acelerando o processo extrativo em seus ambientes naturais.

Apesar da grande importância econômica do açazeiro *E. precatoria* e *E. oleracea* para o Brasil e dos níveis elevados de exploração, o conhecimento sobre a diversidade e estrutura genética em populações naturais ainda é restrito em várias áreas (KAGEYAMA et al., 2004; LIMA, 2014; AZÊVEDO et al., 2017), o que favorece a erosão genética face a exploração desse recurso sem um adequado plano de manejo (LIMA, 2014).

Estudos sobre a diversidade genética de *E. oleracea* e *E. precatoria* resultaram na caracterização da variabilidade existente nas populações nativas, e podem ser usados para a seleção de matrizes de açazeiro com caracteres agrônomicos desejáveis em programas de melhoramento genético (OLIVEIRA et al., 2010; LIMA, 2014). Com as técnicas da biologia molecular, a caracterização pode ser feita com base em regiões do DNA polimórficas (VIEIRA et al., 2016).

Dentro de uma população natural, palmeiras geneticamente divergentes podem ser selecionadas com base no seu genótipo molecular, e podem ser preservadas em coleções de germoplasma, que, por sua vez, são utilizadas como referência para coleta de sementes e em estudos associados a programas de melhoramento genético (DÍEZ et al., 2012; AZÊVEDO, 2019).

Informações sobre a divergência genética entre palmeiras podem ser obtidas com o uso de marcadores moleculares. Os microssatélites são marcadores muito utilizados, pois são multialélicos, codominantes, apresentam elevado conteúdo informativo e alta probabilidade de amplificação heteróloga entre espécies próximas (KALIA et al., 2011; VIEIRA et al., 2016). Os microssatélites têm sido utilizados com sucesso na caracterização da diversidade de diversas espécies de palmeiras, entre elas o palmitero juçara (*E. edulis*) (Gaiotto; Grattapaglia; Vencovsky, 2003; Conte et al., 2008; Carvalho et al., 2015), o dendezeiro (*Elaeis guineensis*) (Hayati et al., 2004) e o tucumanzeiro (*Astrocaryum aculeatum*) (RAMOS et al., 2016).

Dentro do gênero *Euterpe*, estudos com microssatélites têm obtido êxito na amplificação heteróloga, o que amplia a sua utilização para estudos genéticos em espécies que não apresentam marcadores específicos desenvolvidos. Atualmente, existem disponíveis 18 locos microssatélites desenvolvidos para a espécie *E. edulis* (GAIOTTO; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001). Estes locos apresentaram polimorfismo e transferibilidade para *E. oleracea* (OLIVEIRA et al., 2010) e *E. precatoria* (KAGEYAMA et

al., 2004; LIMA, 2014; AZÊVEDO et al., 2017) o que permite sua utilização em estudos genéticos inter e intraespecíficos.

Para a espécie *E. precatoria* os microssatélites foram usados para avaliar a diversidade e estrutura genética espacial e o sistema reprodutivo em populações naturais (KAGEYAMA et al., 2004; LIMA, 2014; AZÊVEDO et al., 2017). Porém estes estudos foram realizados em poucas populações e somente em dois estados da região norte (Amazonas e Acre). Já para a espécie *E. oleracea* foram realizados estudos maiores, com germoplasma do Pará, Maranhão e Amapá, e observaram ampla diversidade (OLIVEIRA et al., 2010).

O açaizeiro gera um PFM's de grande valor econômico para a região amazônica. A manutenção de suas populações dependerá de estratégias de manejo adequadas para a sua conservação. A intensa extração poderá resultar no estreitamento da variabilidade genética, devido às restrições na disseminação de sementes e, conseqüentemente, com reflexos no sucesso reprodutivo e na regeneração natural do açaizeiro.

Para a elaboração de estratégias de manejo eficazes é essencial também que parâmetros genéticos sejam considerados. Assim, a quantificação da diversidade, estrutura genética espacial e da endogamia nas populações, poderão ajudar a determinar as medidas necessárias para a conservação genética *in situ* e *ex situ*, direcionando estratégias de coleta de frutos e sementes visando maximizar a diversidade genética para conservação e melhoramento do açaizeiro na Amazônia.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA E ÁREA DE OCORRÊNCIA

O gênero *Euterpe* pertence à ordem Arecales, família Arecaceae (Palmae) e a subfamília Arecoideae (HENDERSON; GALEANO, 1996). O gênero possui 27 espécies, dentre elas estão as espécies *E. edulis*, *E. precatoria* e *E. oleracea* (HENDERSON; GALEANO 1996; HENDERSON, 2000). De acordo com estudos taxonômicos a espécie *E. precatoria* está dividida em duas variedades sendo *E. precatoria* var. *longevaginata* e *E. precatoria* var. *precatoria* (HENDERSON, 1995; LORENZI, 2010).

*Euterpe precatoria* apresenta monocaule ereto atingindo de 3 a 23 m de altura e 4 a 23 cm de diâmetro do estipe, sustentando um capitel de 5 a 10 folhas (HENDERSON, 1995;

YAMAGUCHI et al., 2015). Possui raízes adventícias continuamente na base do estipe, nas quais formam um anel espesso, de raízes aéreas (1,5 cm) de cor purpúreas que podem alcançar 80 cm do nível do solo. Produz de 3 a 4 cachos por ano, com uma variação de peso de 3 a 7 kg (ROCHA; VIANA, 2004; FERREIRA; SILVA; SOUZA, 2009). Os frutos são globosos, medindo 1,0-1,3 cm de diâmetro com apenas uma semente por fruto, com endosperma sólido e homogêneo (HENDERSON, 1995; LORENZI, 2010).

A espécie *E. precatoria* é amplamente distribuída pela América Central (Belize, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Costa Rica e Panamá) e norte da América do Sul (Colômbia, Venezuela, Trinidad, Guianas, Equador, Peru, Brasil e Bolívia) (HENDERSON, 1995). No Brasil, ocorre nos estados do Acre, Rondônia, Amazonas e Pará (HENDERSON, 1995; LORENZI, 2010).

De acordo com o ambiente onde cresce, a palmeira pode apresentar variações significativas em alguns de seus caracteres, especialmente o porte e o hábito. A var. *longevaginata* pode ser encontrada na América Central e Andes, e a var. *precatoria* é mais restrita à bacia Amazônica (HENDERSON, 1995; LORENZI, 2010).

A espécie *E. oleracea* é uma palmeira cespitosa, multicaule com até 25 perfilhos por touceira (NASCIMENTO, 2008). As plantas adultas têm estipes de 3 a 20 m de altura e 7 a 18 cm de diâmetro. As folhas são compostas, pinadas com arranjo espiralado de 40 a 80 pares de folíolos. A inflorescência do tipo cacho possui flores estaminadas e pistiladas. A disposição das flores é ordenada em tríades, de tal forma que cada flor feminina fica ladeada por duas flores masculinas. O fruto é uma drupa globosa, de 1 a 2 cm de diâmetro. O sistema radicular é do tipo fasciculado, com raízes emergindo do estipe da planta adulta até 40 cm acima da superfície do solo (HENDERSON, 1995; HENDERSON; GALEANO 1996; NASCIMENTO, 2008).

A espécie *E. oleracea* ocorre no norte da América do Sul (Panamá, Equador, Trinidad, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela e Colômbia (HENDERSON; GALEANO, 1996) e no Brasil ocorre nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão e no Amapá.

As espécies *E. oleracea* e *E. precatoria* são perenes, monóicas, apresentando dicogamia, do tipo protândria, possuindo na inflorescência flores unissexuais sésseis. A polinização é entomófila, com participação do vento e da gravidade na fecundação das flores (OLIVEIRA; MOCHIUTTI; FARIAS NETO, 2009).

## 2.2 USO E APLICAÇÕES

Os açazeiros *E. precatoria* e *E. oleracea*, conhecidos popularmente como açáí-solteiro e açáí-de-touceira, respectivamente, podem ser aproveitados de forma integral.

A palmeira apresenta potencial de uso em paisagismo e em técnicas de recuperação de áreas degradadas (TEIXEIRA; SILVA, 2010; WADT et al., 2004). A gema apical é usada como palmito para alimentação humana, e pode ser consumida fresca, em saladas e em ração animal (WADT et al., 2004). As folhas são utilizadas em coberturas de casas e as fibras das folhas são utilizadas no artesanato na confecção de cestos, tapetes e chapéus (GALOTTA; BOAVENTURA; LIMA, 2008). O caule é empregado em construção civil rurais, cercas e lenha (TEIXEIRA; SILVA, 2010). As sementes são utilizadas como adubo orgânico e confecção de biojóias (brincos, pulseiras, colares, cortinas) e os cachos são utilizados na confecção de vassouras (WADT et al., 2004).

No entanto, as palmeiras *E. precatoria* e *E. oleracea* destacam-se pela extração da polpa dos frutos, produto alimentar economicamente rentável (YAMAGUCHI et al., 2015). As partes mais utilizadas dos frutos são o epicarpo e mesocarpo, de onde é produzido a polpa do açáí, que pode ser comercializado *in natura* para a fabricação de sorvete, geleia, cremes, iogurtes, molhos e licores (TEIXEIRA; SILVA, 2010).

A polpa de açáí recebeu muita atenção nos últimos anos como uma das novas "superfrutas" (YAMAGUCHI et al., 2015). O consumo desse produto vem aumentando, principalmente devido ao valor nutricional (CEDRIM; BARROS; NASCIMENTO, 2018).

Estudos verificaram que a polpa reúne características essenciais à nutrição humana como fonte de energia, fibra alimentar, minerais (cálcio, potássio, zinco, magnésio), ácidos graxos oleicos e linoleicos e antocianinas (YUYAMA et al., 2011; CEDRIM; BARROS; NASCIMENTO, 2018). Foram identificados também bioatividades anti-inflamatórias e propriedades antioxidantes com diferentes níveis de ações entre as duas espécies (KANG et al., 2012). Kang et al. (2012) constaram que na polpa de *E. precatoria* existem atividades antioxidantes superiores à polpa da espécie *E. oleracea*.

A suplementação de polpa de açáí, *E. oleracea* e *E. precatoria* liofilizada na dieta de ratos ocasionou aumento da memória de trabalho dos animais e reduziu o fator de necrose tumoral (CAREY et al., 2017). Segundo os pesquisadores estes resultados podem estar relacionados com as propriedades antioxidante e anti-inflamatória da polpa.

Pesquisas com a raiz da espécie *E. precatoria* identificaram atividade citotóxica, antioxidante e antiofídica (GALOTTA; BOAVENTURA; LIMA, 2008). Conforme relatado pelos pesquisadores, foi justificado o uso da planta na medicina tradicional por brasileiros

e peruanos como anti-inflamatória, para curar doenças renais e hepáticas e contra picadas de cobras.

## 2.3 ESTUDOS EM POPULAÇÕES DE AÇAIZEIROS

A crescente procura pelos frutos de açazeiros torna a exploração extrativista inviável para suprir a demanda, sendo necessário desenvolver estudos visando à domesticação, ao melhoramento genético e à produção comercial. Graças ao interesse na polpa nos mercados nacional e internacional, alguns estudos têm sido realizados visando a produção comercial de pomares de açazeiro (MARTINOT; PEREIRA; SILVA, 2017; VIEIRA et al., 2018).

No estado do Pará a espécie *E. oleracea* tem sido manejada em áreas de baixio, e o plantio está expandindo-se em áreas de terra firme. Áreas de terra firme de cultivos agrícolas abandonados ou áreas degradadas estão sendo convertidas em áreas de açazeiro cultivado (FARIAS NETO; RESENDE; OLIVEIRA, 2011). Nas áreas inundáveis está ocorrendo o processo de transformação da floresta em quase monocultivo da espécie (HOMMA, 1993). Nestas áreas, os extratores mantêm elevada densidade de indivíduos de açai (200 estipes.ha<sup>-1</sup>) (FREITAS et al., 2015).

A expansão de áreas plantadas de terra firme de açazeiro (*E. oleracea*) em algumas regiões do país deve-se ao lançamento da cultivar BRS-Pará. Esta cultivar foi selecionada no programa de melhoramento genético da Embrapa Amazônia Oriental. A cv. BRS-Pará apresentou produtividade de frutos de 10 t/ha/ano e rendimento de polpa de 15% a 25% (OLIVEIRA; FARIA NETO, 2004). O peso médio de 100 frutos foi de 158 g e a produção média por planta foi de 3 kg e 1.952 frutos (COSTA et al., 2014). O retorno econômico gerado desde a adoção da tecnologia foi estimado em R\$ 36 milhões a cadeia produtiva (EMBRAPA, 2015). Já existem áreas plantadas com esta cultivar nos estados de Rondônia, Acre, São Paulo e Maranhão.

Para a espécie *E. precatoria* a colheita dos frutos é baseada ainda no extrativismo nas florestas nativas do Acre, Amazonas e Rondônia (MARTINOT; PEREIRA; SILVA, 2017; VIEIRA et al., 2018). Segundo Martinot, Pereira e Silva (2017) para esta espécie já está ocorrendo mudança da dominância do extrativismo para a combinação do extrativismo com o plantio.

Segundo o IBGE (2017), as palmeiras *E. oleracea* e *E. precatoria* produziram 219.885 mil toneladas de frutos, considerando ambos os cultivos plantados e extrativista. O Pará é o principal estado produtor, seguido pelo Amazonas, Maranhão, Acre e Rondônia. O

açazeiro apresentou o maior valor entre os PFM's, participando com 69,4% do valor total obtido, o fruto de açazeiro destacou-se também com relação ao valor da produção, sendo gerado um valor de R\$ 480,6 milhões (IBGE, 2016).

Na floresta nativa, o açazeiro produz fruto o ano todo (JARDIM; KAGEYAMA, 1994). Na Ilha do Combu no Pará o pico de floração do açazeiro *E. oleracea* ocorre nos meses de fevereiro a maio correspondendo ao período da estação mais chuvosa. Já a frutificação apresenta o pico de produção de junho a outubro e de fevereiro a abril (JARDIM; KAGEYAMA, 1994).

Para a espécie *E. precatoria* é possível observar variação no período de frutificação dependendo do local de ocorrência da palmeira (terra firme ou baixio). No município de Xapuri, o período de frutificação ocorre de abril a setembro e em junho a frutificação está no final na área de baixio e iniciando-se na terra firme (ROCHA, 2002). No município de Feijó, o período de frutificação em áreas de baixio ocorre nos meses de janeiro a maio, e em terra firme o pico de produção ocorre mais tarde, de maio até agosto (SILVA, 2011).

Embora tenha ocorrido a expansão comercial dos frutos de açazeiro *E. oleracea* e *E. precatoria* nas últimas décadas, estudos moleculares com populações naturais e bancos de germoplasma ainda são raros (SOUZA, 2002; KAGEYAMA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2010; LIMA, 2014; AZÊVEDO et al., 2017; AZÊVEDO, 2019), quando comparados com os estudos moleculares já realizados com a espécie *E. edulis* (GAIOTTO; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001; GAIOTTO; GRATTAPAGLIA; VENCOSKY, 2003; CONTE; REIS; VENCOSKY, 2006; CONTE et al., 2008; MARTINS-CORDER et al., 2009; VIEIRA et al., 2010; CARVALHO et al., 2015).

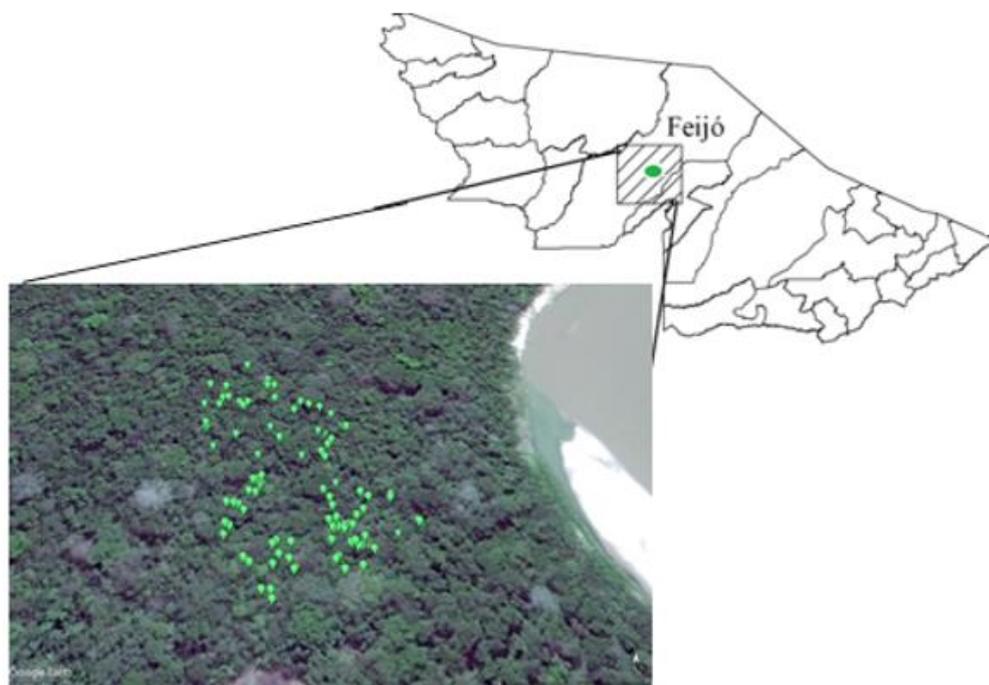
Pesquisadores interessados na conservação da espécie *E. edulis* desenvolveram 18 marcadores microssatélites (GAIOTTO; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001). Com estes marcadores foi possível observar em duas populações de *E. edulis* no Parque Nacional de Brasília, uma alta probabilidade de parentesco dentro de famílias de polinização aberta, variação genética interpopulacional e a ocorrência de fluxo gênico a longas distâncias (GAIOTTO; GRATTAPAGLIA; VENCOSKY, 2003). Conte, Reis e Vencovsky (2006) comparando duas populações não perturbadas com duas populações exploradas de *E. edulis* no sul do Brasil utilizando 10 microssatélites, observaram altos valores de diversidade genética e similares entre as diferentes populações, no entanto, valores mais expressivos de endogamia foram observados nas duas populações exploradas.

A conservação de sítios de microssatélites entre espécies relacionadas torna possível a transferência destes para outras espécies. Oliveira et al. (2010) transferiu sete dos

microsatélites desenvolvidos por Gaiotto, Brondani e Grattapaglia (2001) em 116 acessos de açaizeiro (*E. oleracea*) conservados *in vivo* no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental no Pará, e confirmaram a transferibilidade e diversidade genética. Os autores acreditam que a ampla diversidade genética observada pode estar relacionada aos ambientes de coleta que estavam localizados no centro de diversidade da espécie (OLIVEIRA et al., 2010). Eles observaram a formação de seis grupos geneticamente distintos dentro do banco de germoplasma e puderam indicar acessos para compor programas de melhoramento, com características desejáveis para frutos.

O sucesso da transferibilidade dos microsatélites de *E. edulis* também foi observado para *E. precatoria*. Os trabalhos realizados por Kageyama et al. (2004), Lima (2014) e Azêvedo et al. (2017) verificaram diversidade nas populações estudadas. Porém estes estudos foram realizados em poucas populações da região norte.

Recentemente, Azêvedo (2019) realizou estudo com 96 indivíduos, provenientes de floresta ombrófila aberta de baixio (8° 20' 31" S, 45° 37' 41" W, altitude média de 231 m), localizada na Terra Indígena Kaxinawá de Nova Olinda, no município de Feijó, Acre (FIGURA 1). A densidade populacional era de 42 palmeiras/hectare. As coletas tiveram autorização da FUNAI 451/2014, SISBIO 50570/2015 e SISGEN A6A46CC.

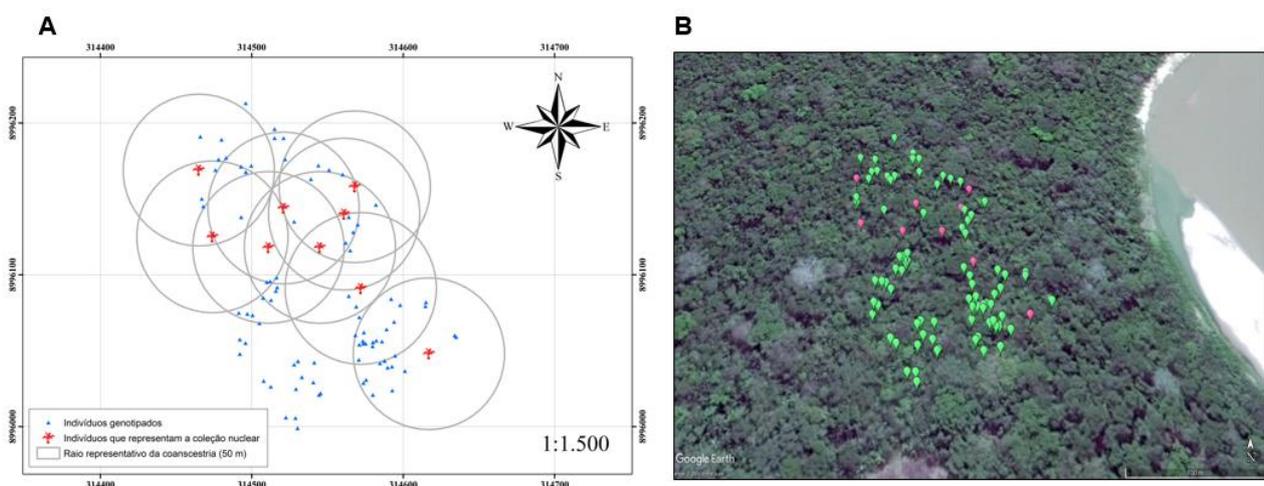


**Figura 1.** Localização geográfica da população de *Euterpe precatoria*, na Terra Indígena Kaxinawá de Nova Olinda, município Feijó, Estado do Acre.

O uso de microssatélites heterólogos revelou baixo valor de diversidade genética na população estudada, com média de 4,3 alelos por loco (AZÊVEDO, 2019). Resultado similar (4,75 alelos/loco) foi observado por Kageyama et al. (2004) ao testar quatro locos desenvolvidos para *E. edulis* em 170 indivíduos de duas populações nativas de *E. precatória*. Lima (2014) observou valor médio de 6,4 alelos/loco avaliando 63 palmeiras de três populações de *E. precatória*.

Foram observados também baixos valores médios de heterozigosidade esperada (0,292) e observada (0,291). Observa-se que diferentes espécies de palmeiras avaliadas com locos específicos apresentaram estimativas de heterozigosidades em torno de 0,5 (CONTE et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014; RAMOS et al., 2016). Quando foram utilizados locos transferidos de outras espécies, apresentaram valores inferiores a 0,3 (OLIVEIRA et al., 2017). Portanto, é possível sugerir que o baixo polimorfismo observado por Azêvedo (2019) esteja associado ao uso de locos heterólogos.

Ao analisar a estrutura genética espacial, Azêvedo (2019) verificou que foi significativa até a distância aproximada de 50 metros, o que significa que indivíduos que ocorrem próximos entre si até esta distância são mais relacionados geneticamente (FIGURA 2A). O baixo valor de estruturação encontrado (coancestria = 0,0118) parece ser característico da espécie *E. precatória*, provavelmente devido à alta densidade de indivíduos adultos (ROCHA; VIANA, 2004; STEEGE et al., 2013; LIMA, 2014) e a eficiência de dispersão do pólen e da semente por longa e curta distância (LIMA, 2014; CARVALHO et al., 2015).



**Figura 2.** Distribuição espacial 96 indivíduos de *Euterpe precatória* genotipados. **A)** Identificação dos indivíduos que compõem a coleção nuclear e o raio representativo da análise de coancestria. **B)** Localização espacial 96 indivíduos de *Euterpe precatória* na floresta de baixo e indivíduos (cor rosa) que compõem a coleção nuclear.

Lima (2014) no estudo com populações naturais de *E. precatoria* nos municípios de Codajás, Manacapuru e Manaquiri, no baixo rio Solimões no estado do Amazonas verificou que a análise de estrutura espacial com o coeficiente de coancestria por classes de distância identificou maior grau de parentesco até 53 km.

Com o objetivo de identificar os indivíduos que representassem toda a diversidade da população total estudada, Azêvedo (2019) realizou a análise de coleção nuclear. A coleção nuclear identificada foi composta por nove palmeiras, dentre as 96 analisadas e dispersas numa área de 4,5 ha, com a conservação de 100% dos alelos da população (FIGURA 2B). As coleções nucleares são ferramentas valiosas para conservar e avaliar os recursos genéticos de forma mais eficaz (DÍEZ et al., 2012). Sendo assim, as nove palmeiras identificadas podem ser referências de manutenção da variabilidade da população. Dentro de um programa de conservação, como forma de prevenção de erosão genética, seus frutos não devem ser coletados para consumo, mas podem ser usados para a conservação *ex situ*.

A conservação *in situ* dos indivíduos da coleção nuclear de *E. precatoria* é uma estratégia relevante que objetiva conservar a diversidade genética de toda a população, e também preserva os habitats onde a espécie ocorre, visando a manutenção das interações entre os organismos e os processos evolutivos associados (SIMON, 2010).

A exploração intensiva de *E. edulis* sem plano de manejo adequado desde a década de 40, resultou na eliminação de várias populações e em grave alteração de populações remanescentes (REIS et al., 2000). Por esses motivos, a espécie encontra-se na Lista Brasileira das Espécies Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2008).

Assim, as populações sob intenso processo extrativista precisam de monitoramento e estratégias de uso consciente do recurso genético. Outro parâmetro genético que pode contribuir para o plano de conservação é a incorporação da análise de coancestria. Azêvedo (2019) aponta que a coletas de sementes para conservação da espécie *E. precatoria* não deve ocorrer entre palmeiras distantes a menos de 50 metros entre elas, a fim de evitar a coleta de sementes entre indivíduos aparentados. Portanto, verifica-se que a definição da coleção nuclear, juntamente com a coancestria são análises robustas e que podem ser utilizadas em conjunto para a elaboração de estratégias de conservação *in* e *ex situ* de *E. precatoria*.

Conhecer geneticamente populações de açazeiros pode contribuir para o aumento da produtividade e para a conservação efetiva, sem comprometer o uso do recurso. A partir de dados moleculares, os parâmetros genéticos podem servir como ferramentas práticas

de identificação de matrizes em uma população natural e para identificar a distância mínima entre elas recomendada para coleta. Assim é possível selecionar indivíduos com variabilidade genética minimizando a endogamia e evitando a erosão genética.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O açaizeiro contribui diretamente com a segurança alimentar dos povos da floresta, devido ao seu valor econômico, além de contribuir com a geração de renda e, conseqüentemente com a melhoria da vida dos extrativistas. Neste sentido é essencial avançar em estudos que possam ser aplicados para a manutenção da produção extrativista e a conservação genética dos açaizeiros. Estudos já identificaram como uma população natural pode ser conservada, sem comprometer o extrativismo. Hoje, o uso consciente dos recursos genéticos pode ser feito graças aos avanços a nível molecular associados a parâmetros estatísticos.

### 4. REFERÊNCIAS

ARANGUREN, C.I.; GALEANO, G.; BERNAL, R. Manejo actual del asaí (*Euterpe precatoria* Mart.) para la producción de frutos en el sur de la amazonia colombiana. **Colombia Forestal.**, v. 17, n. 1, p. 77-99, 2014.

AZÊVEDO, H.S.F.S. **Estudo da diversidade genética de populações naturais de açaizeiro (*Euterpe precatoria* Mart.)**. 2019. (Tese) Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade – Fundação Oswaldo Cruz, Brasil, 2019.

AZÊVEDO, H.S.F.S.; BENVINDO, F.D.; CAVALCANTE, L.N.; HAVERROTH, M.; WADT, L.H.O.; CAMPOS, T. Transferability of heterologous microsatellite loci between species of *Euterpe* genus. **Genetics and Molecular Research.**, v. 16, n. 4, p. 1-7, 2017.

BRASIL. **Instrução Normativa Nº 6, de 23 de setembro de 2008**. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. Diário Oficial da União, Brasília, n. 185, (Seção 1), p. 75-83. 2008.

CAREY, A.N.; MILLER, M.G.; FISHER, D.R.; BIELINSKI, D.F.; GILMAN, C.K.; POULOSE, et al. Dietary supplementation with the polyphenol-rich açai pulps (*Euterpe oleracea* Mart. and *Euterpe precatoria* Mart.) improves cognition in aged rats and attenuates inflammatory signaling in BV-2 microglial cells. **Nutritional Neuroscience.**, v. 20, n. 4, p. 238-245. 2017.

CARVALHO, C.S.; RIBEIRO, M.C.; CÔRTEZ, M.C.; GALETTI, M.; COLLEVATTI, R.G. Contemporary and historic factors influence differently genetic differentiation and diversity in a tropical palm. **Heredity.**, v. 115, n. 3, p. 1-9, 2015.

CEDRIM, P.C.A.S.; BARROS, E.M.A.; NASCIMENTO, T.G. Propriedades antioxidantes do açaí (*Euterpe oleracea*) na síndrome metabólica. **Brazilian Journal of Food Technology.**, v. 21, p. e2017092, 2018.

CONTE, R.; REIS, M.S.; MANTOVANI, A.; VENCOVSKY, R. Genetic Structure and Mating System of *Euterpe edulis* Mart. Populations: A Comparative Analysis Using Microsatellite and Allozyme Markers. **Journal of Heredity.**, v. 99, n. 5, p. 476-482, 2008.

CONTE, R.; REIS, M.S.; VENCOVSKY, R. Effects of management on the genetic structure of *Euterpe edulis* Mart. populations based on microsatellites. **Scientia Forestalis.**, n. 72, p. 81-88, 2006.

COSTA, P.S.; MORAES, K.K.S.; BELO, F.C.; CIPRIANI, H.N.; BATISTA, E.R.N.; CAMELO, J.C. Produção inicial de frutos num plantio de açaí em porto velho, Rondônia. **Revista Farociência.**, v. 1, p. 1-5, 2014.

DÍEZ, C.M.; IMPERATO, A.; RALLO, L.; BARRANCO, D.; TRUJILLO, I. Worldwide Core collection of Olive cultivars based on simple sequence repeat and Morphological Markers. **Crop Science.**, v. 52, n. 1, 2012.

EMBRAPA. **Cultivar de açaizeiro BRS para já gerou R\$ 36 milhões de benefícios.** 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/amazonia-oriental/busca-de-noticias/-/noticia/8248817/cultivar-de-acaizeiro-brs-para-ja-gerou-r-36-mi-de-beneficios>> acesso em 20/02/2019.

FARIAS NETO, J.T.; RESENDE, M.D.V.; OLIVEIRA, M.S.P. Seleção simultânea em progênies de açaizeiro Irrigado para produção e peso do fruto. **Revista Brasileira de Fruticultura.**, v. 33, n. 2, p. 532-539, 2011.

FERREIRA, E.J.L.; SILVA, R.F.; SOUZA, R.A.P.H.E. Aspectos extrativistas e mercadológicos da cadeia produtiva do açaí-solteiro (*Euterpe precatoria* Mart.) em Rio Branco, Acre. **VII Congresso Brasileiro de Sistemas Agroflorestais**, 2009.

FREITAS, M.A.B.; VIEIRA, I.C.G.; ALBERNAZ, A.L.K.M.; MAGALHÃES, J.L.L.; LEES, A.C. Floristic impoverishment of Amazonian floodplain forest managed for açaí fruit production. **Forest Ecology and Management.**, v. 351, n. 1, p. 20-27, 2015.

GAIOTTO, F.A.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for heart of palm *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Palmae). **Molecular Ecology Notes.**, v. 1, p. 86-88, 2001.

GAIOTTO, F.A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOVSKY, R. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Martius). **Journal of Heredity.**, v. 94, n. 5, p. 399-406, 2003.

GALOTTA, A.L.Q.A.; BOAVENTURA, M.A.D.; LIMA, L.A.R.S. Antioxidant and cytotoxic activities of 'açaí' (*Euterpe precatoria* Mart.). **Química Nova.**, v. 31, n. 6, p. 1427-1430, 2008.

HAYATI, A.; WICKNESWARI, R.; MAIZURA, I.; RAJANAIDU, N. Genetic diversity of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) germoplasm collections from Africa: implications for 54

improvement and conservation of genetic resources. **Theoretical Applied Genetic.**, v. 108, n. 7, p. 1274-1284, 2004.

HENDERSON, A. The genus *Euterpe* in Brazil. In: REIS, M.S.; REIS, A. (Eds.) *Euterpe edulis Martius – (Palmitheiro) biologia, conservação e manejo*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2000.

HENDERSON, A. **The palms of the Amazon**. University Press, 1995.

HENDERSON, A.; GALEANO, G. *Euterpe, Prestoea, and Neonicholsonia (Palmae: Euterpeinae)*. New York Botanical Garden, 1996.

HOMMA, A.K.O. **Extrativismo vegetal na Amazônia: limites e oportunidades**. EMBRAPA, 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2016. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. Disponível em: <[http/ www.ibge.gov.br/](http://www.ibge.gov.br/)> acesso em: 11/01/2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2017. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. Disponível em: <[http/ www.ibge.gov.br/](http://www.ibge.gov.br/)> acesso em: 07/11/2018.

JARDIM, M.A.G.; KAGEYAMA, P.Y. Fenologia de floração e frutificação em população natural de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) no estuário amazônico. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais.**, n. 47, p. 62-65, 1994.

KAGEYAMA, P.Y.; CARON, D.; GANDARA, F.B.; MARTINS, K.; WADT, L.H.O.; LACERDA, C.M.B.; et al. Genetic and ecological aspects of nonwood forest product exploitation in two western Amazonian settlements. In: VINCETI, B.; AMARAL, W.; MEILLEUR, B. (Org.). **Challenges in managing forest genetic resource for livelihoods: examples from Argentina and Brazil**. International Plant Genetic Resources Institute, 2004.

KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica.**, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2011.

KANG, J.; THAKALI, K.M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; et al. Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and antiinflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry.**, v. 133, p. 671-677, 2012.

LIMA, P.P. **Caracterização da variabilidade genética, sistema de cruzamento e parâmetros de germinação e emergência de *Euterpe precatoria* Martius em populações do baixo rio Solimões**. 2014. (Dissertação) Mestrado em Ciências Agrárias, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 2014.

LORENZI, H. **Flora brasileira: Arecaceae (palmeiras)**. Plantarum, 2010.

MARTINOT, J.F.; PEREIRA, H.S.; SILVA, S.C.P. Coletar ou Cultivar: as escolhas dos produtores de açai-da-mata (*Euterpe precatoria*) do Amazonas. **Revista de Economia e Sociologia Rural.**, v. 55, n. 4, p. 751-766, 2017.

MARTINS-CORDER, M.P.; FIALHO, L.E.B.; ZAMBIAZI, D.C.; KONZEN, E.R. Diversidade genética em populações de *Euterpe edulis* Martius do Rio Grande do Sul, através de marcadores isoenzimáticos. **Revista Ceres.**, v. 56, n. 1, p. 204-213, 2009.

MONTEIRO, R.B. **Estrutura e distribuição espacial de *Euterpe edulis* em um fragmento florestal no município de Alegre-ES.** (Monografia) Graduado em Engenheiro Florestal - Universidade Federal do Espírito Santo, 2017.

NASCIMENTO, W.M.O. **Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Informativo técnico Rede de sementes da Amazônia.** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2008.

OLIVEIRA, L.D.S.; RAMOS, S.L.F.; LOPES, M.T.G.; DEQUIGIOVANNI, G.; VEASEY, E.A.; MACÊDO, J.L.V.; et al. Genetic diversity and structure of *Astrocaryum jauari* (Mart.) palm in two Amazon river basins. **Crop Breeding and Applied Biotechnology.**, v. 14, n. 3, p. 166-173, 2014.

OLIVEIRA, M.S.P.; FARIAS NETO, J.T. **Cultivar BRS-Pará: Açaizeiro para Produção de Frutos em Terra Firme.** Embrapa Amazônia Oriental, 2004. (Comunicado Técnico, 114).

OLIVEIRA, M.S.P.; MOCHIUTTI, S.; FARIAS NETO, J.T. Domesticação e melhoramento do Açaizeiro. In: BORÉM A, LOPES, M.T, CLEMENT, C.R. **Domesticação e Melhoramento – Espécies Amazônicas.** Universidade Federal de Viçosa, 2009.

OLIVEIRA, M.S.P.; SANTOS, J.B.; AMORIM, E.P.; FERREIRA, D.F. Variabilidade genética entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microssatélites. **Ciência e Agrotecnologia.**, v. 34, n. 5, p. 1253-1260, 2010.

OLIVEIRA, N.P.; OLIVEIRA, M.S.P.; DAVIDE, L.C.; KALISZ, S. Population genetic structure of three species in the genus *Astrocaryum* G. Mey. (Arecaceae). **Genetics and Molecular Research.**, v. 16, n. 3, p. 1-13, 2017.

RAMOS, S.L.F.; DEQUIGIOVANNI, G.; SEBBENN, A.M.; LOPES, M.T.G.; KAGEYAMA, P.Y.; MACÊDO, J.L.V.; et al. Spatial genetic structure, genetic diversity and pollen dispersal in a harvested population of *Astrocaryum aculeatum* in the Brazilian Amazon. **BMC Genetics.**, v. 17, p. 63-73, 2016.

REIS, M.S.; FANTINI, A.C.; NODARI, R.O.; REIS, A.; GUERRA, P.M.; MANTOVANI, A. Management and Conservation of Natural Populations in Atlantic Rain Forest: The Case Study of Palm Heart (*Euterpe edulis* Martius). **Biotropica.**, v. 32, n. 4, p. 894-902, 2000.

ROCHA, E. **Aspectos ecológicos e sócio-econômicos do manejo de *Euterpe precatoria* Mart. (Açaí) em áreas extrativistas no Acre, Brasil.** (Dissertação) Mestrado em Engenharia Ambiental - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

ROCHA, E.; VIANA, V.M. Manejo de *Euterpe precatoria* Mart. (açaí) no seringal Caquetá, Acre, Brasil. **Scientia Florestalis.**, n. 65, p. 59-69, 2004.

SILVA, M.G. **Relatório Técnico: Mapeamento da cadeia produtiva da polpa do açaí (WWF).** 2011.

SIMON, M.F. **Manual de curadores de germoplasma – vegetal: conservação *in situ*.** Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia, 2010. (Documentos 322).

SOUZA, P.C.A. **Aspectos ecológicos e genéticos de uma população natural de *Euterpe oleracea* Mart. no estuário amazônico.** (Dissertação) Mestrado em Recursos Florestais, Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 2002.

STEEGE, T.H.; PITMAN, N.C.; SABATIER, D.; BARALOTO, C.; SALOMÃO, R.P.; GUEVARA, J. E.; et al. Hyperdominance in the Amazonian tree flora. **Sciencev.**, 342, p. 1243092-1243097, 2013.

TEIXEIRA, G.A.; SILVA, J.N. A morfologia e o uso da espécie *Euterpe precatoria* Mart. na Amazônia. **61º Congresso Nacional de Botânica**, 2010.

VIEIRA, A.H.; RAMALHO, A.R.; ROSA NETO, C.; CARARO, D.C.; COSTA, J.N.M.; VIEIRA JÚNIOR, J.R.; et al. **Cultivo do Açaizeiro (*Euterpe oleracea* Martius) no Noroeste do Brasil.** Embrapa Rondônia, 2018. (Sistemas de produção/ Embrapa Rondônia, 36).

VIEIRA, F.A.; CARVALHO, D.; HIGUCHI, P.; MACHADO, E.L.M.; SANTOS, R.M. Spatial pattern and fine-scale structure indicating recent colonization of the palm *Euterpe edulis* in a Brazilian Atlantic Forest fragment. **Biochemical Genetics.**, v. 48, n. 1, p. 96-103, 2010.

VIEIRA, M.L.C.; SANTINI, L.; DINIZ, A.L.; MUNHOZ, C.F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology.**, v. 39, n. 3, p. 312-328, 2016.

WADT, L.H.O.; RIGAMONTE-AZEVEDO, O.C.; FERREIRA, E.J.L.; CARTAXO, C.B. C. **Manejo de açaí solteiro (*Euterpe precatoria* Mart.) para produção de frutos.** Embrapa Amazônia Oriental-Folhetos /Folhetos/Cartilhas (INFOTECA-E), 2004.

YAMAGUCHI, K.K.L.; PEREIRA, L.F.R.; LAMARÃO, C.V.; LIMA, E.S. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry.**, v. 179, p. 137-151, 2015.

YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; SILVA FILHO, D.F.; YUYAMA, K. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazonica.**, v. 41, n. 4, p. 545-552, 2011.

## ANÁLISE CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DE FRAÇÕES DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK (CELASTRACEAE) CHICHUÁ (XIXUÁ) AMAZÔNICO

**Tamires Mota da Silva<sup>1</sup>; Valdir Alves Facundo<sup>2</sup>, Renato Abreu Lima<sup>3</sup>, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti<sup>1</sup>, Renildo Moura da Cunha<sup>1</sup>**

1. Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para Amazônia, Rio Branco, Acre, Brasil;

2. Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brasil;

3. Universidade Federal do Amazonas, Humaitá, Amazonas, Brasil.

### RESUMO

*Maytenus guianensis* é uma espécie vegetal representante da família Celastraceae, endêmica da Amazônia brasileira, onde é conhecida por chichuá. Suas folhas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças do trato gastrointestinal, antiparasitária e anticancerígeno. Acredita-se que essa ação farmacológica pode estar relacionada à presença de terpenóides ocorrentes nesse gênero, o que justifica a realização do presente estudo que objetivou realizar uma análise citotóxica e mutagênica de frações dos extratos de *Maytenus guianensis*. As análises genotóxica e mutagênica da fração hexânica foram realizadas pelos métodos de germinação dos meristemas, índice mitótico e micronúcleo em *Allium cepa*. Considerando os resultados dos testes, as frações FH e FC de *M. guianensis* não apresentaram efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos e a FH ainda apresentou efeito antitóxico, anticitotóxico e antimutagênico. Estes resultados mostraram que a entrecasca *M. guianensis* não possuem efeito tóxico, citotóxico e mutagênico e ainda apresentaram efeitos antitóxicos, anticitotóxicos e antimutagênico. Sendo indicados estudos futuros para investigar o mecanismo de ação para cada atividade avaliada, visando à obtenção de um novo protótipo de fármaco ou fitoterápico com potencial antitumoral que possam servir de subsídio, para novas alternativas terapêuticas.

**Palavras-Chave:** *Maytenus guianensis*, Genotoxicidade e Amazônia.

### ABSTRACT

*Maytenus guianensis* is a plant species representative of the Celastraceae family, endemic to the Brazilian Amazon, where it is known as chichua. Its leaves are used in folk medicine for the treatment of diseases of the gastrointestinal tract, antiparasitic and anticancer. It is believed that this pharmacological action may be related to the presence of terpenoids occurring in this genus, which justifies the accomplishment of the present study that aimed to perform a cytotoxic and mutagenic analysis of fractions of the extracts of *Maytenus guianensis*. The genotoxic and mutagenic analyzes of the hexane fraction were performed by the methods of meristem germination, mitotic index and micronucleus in *Allium cepa*. Considering the results of the tests, the FH and FC fractions of *M. guianensis* did not present toxic, cytotoxic and mutagenic effects and the FH still showed antitoxic, anticitotoxic and

antimutagenic effect. These results showed that *M. guianensis* has no toxic, cytotoxic and mutagenic effects and also showed antitoxic, anticitotoxic and antimutagenic effects. Future studies are indicated to investigate the mechanism of action for each evaluated activity, aiming at obtaining a new prototype of drug or phytotherapeutic with antitumor potential that may serve as a subsidy for new therapeutic alternatives.

**Keywords:** *Maytenus guianensis*, Genotoxicity and Amazon

## 1. INTRODUÇÃO

Os tumores podem ser desencadeados devidos causas internas ou externas, sendo que ambas estão inter-relacionadas, dentre as causas internas estão hereditariedade e envelhecimento, os fatores ambientais são responsáveis de 80 a 90% dos casos de câncer, sendo que os mais frequentes estão relacionados ao tabagismo, alcoolismo, hábitos alimentares, hábitos sexuais, infecção viral, medicamentos, radiação solar e fatores ocupacionais, dessa forma, o surgimento de câncer irão depender da intensidade e duração da exposição das células a esses fatores de riscos (INCA, 2012; SOUZA, 2013).

Muitos agentes mutagênicos atuam sobre as células, por meio de metabólitos ativos ou através de geração de radicais livres, que conseqüentemente, é sugerido que a sua suplementação poderia melhorar os efeitos prejudiciais de processos oxidativos no organismo vivo, ambos os dados clínicos e experimentais foram fornecidos para provar esse processo (FERGUNSON et al., 2005; BRUNI et al., 2006).

As implicações dos efeitos genotóxicos de complexas misturas e produtos químicos incluem a iniciação de carcinogenicidade, a geração de distorções hereditárias através de mutações em células germinativas, e teratogenicidade (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; RAYMUNDO et al., 2012). Um aumento na genotoxicidade é acompanhado a um aumento do risco de câncer (HAGMAR et al., 1998; RAYMUNDO et al., 2012).

Para realização do tratamento de alguns tipos de câncer, tem-se empregado o uso de compostos de origem vegetal, entre estes estão os alcaloides vimblastina e a vincristina, extraídas da espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, cuja utilização clínica se aplica no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos (SOUZA, 2012).

Na busca de novos fármacos anticancerígenos de origem vegetal, é comum associar técnicas fitoquímicas de isolamento a *screenings* biológicos automatizados e uma das

primeiras etapas para esse tipo de investigação é a avaliação *in vitro* da atividade citotóxica dos extratos de vegetais (SOUZA, 2012).

A citotoxicidade de espécies da família Celastraceae já foi relatada por alguns estudos, entre os gêneros, o que se destaca frente essas atividades é o gênero *Maytenus* sp., sendo que algumas espécies apresentaram atividade citotóxica em ensaios com linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon humano (HT29) e carcinoma de células pulmonares humanas (NCIH460) (MONKS et al., 2002; SOUZA, 2012). A espécie *Maytenus ovatus*, forneceu, através de estudo fitoquímico, a substância maitansina, com elevado potencial citotóxico, todavia sem valor clínico devido a sua capacidade *in vivo* de agredir células normais, além das cancerígenas (CASSADY et al., 2004; SOUZA, 2012).

Em investigações com novas substâncias com potencial anticancerígeno, foram realizados testes de citotoxicidade *in vitro* frente às linhagens MDA-MB-435 MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon-humano) e SF-295 (sistema nervoso central) com as frações hexânica e acetato de etila da casca da espécie *Salacia crassifolia* (Celastraceae), e foi possível observar citotoxicidade significativa (DE OLIVEIRA et al., 2012; SOUZA, 2012).

Em uma pesquisa realizada com *M. ilicifolia* e seus efeitos sobre sementes de alface e meristemas de cebola foram observado que o extrato teve efeitos alelopático sobre sementes de alface e efeitos citotóxicos sobre sementes de alface e cebola (SOUZA, 2006).

Em outro estudo realizado com a espécie *Maytenus krukovii*, foi possível observar que o extrato da casca é capaz de induzir uma diminuição evidente na mutagenicidade (BRUNI et al., 2006). Outro estudo realizado com a espécie *Maytenus senegalensis*, os isolados foram testados contra células de linfoma do rato L 5178Y e mostrou citotoxicidade e inibiu completamente o crescimento celular (OKAYE et al., 2014).

Essas atividades antitumoral do gênero *Maytenus* sp. foi relacionado devido a presença de taninos e derivados da catequina (PEREIRA et al., 1999; SOUZA, 2012), encontraram-se, também, outros metabólitos como fenilalquilaminas e flavonóides (SPIVEY et al., 2002; SOUZA, 2012) e alguns compostos triterpenicos comumente isolados desse gênero, ursólico e ácido oleanólico, que já foi comprovado que inibem à iniciação do tumor (LIU, 1995).

Essas investigações fitoquímicas de espécies representantes da família Celastraceae muito contribuem para o isolamento de substâncias com potencial terapêutico no tratamento do câncer. (SOUZA, 2013). Dessa forma, esse trabalho objetivou realizar uma análise citotóxica e mutagênica de frações dos extratos de *Maytenus guianensis*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO E PREPARO DAS FRAÇÕES

As amostras de *M. guianensis* foram coletadas em fevereiro de 2008 na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada no Km 26 da Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010) (Latitude 02°53'S, Longitude 59°58'W). Sendo encaminhada para o laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Rondônia (UNIR).

A identificação da espécie foi realizada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), exsicata nº 188.485.

As entrecasas do caule foram secas em estufa (TE-394/2, Tecnal) com ventilação forçada a 50 °C por 48 h, sendo em seguida realizada raspagem para retirada da entrecasca visando aumentar a superfície de contato, obtendo-se 1,9 kg, estas que foram extraídas três vezes com acetona (3L x 3) em temperatura ambiente, durante 72 h, em cada ciclo. Os extratos foram filtrados em papel filtro e o solvente rotaevaporado (rotaevaporador TE-211, Tecnal) a 80 °C onde se obteve o Extrato Acetônico Bruto da Entrecasca (EBC) em quantidade de 200 g.

As frações foram preparados a partir de 50 g do EBC, sendo fracionado em cromatografia de coluna com sílica gel, por meio de eluição com hexano, acetato de etila, etanol e clorofórmio até a exaustão, dando origem a Fração Hexânica da Entrecasca (FH), Fração Acetato de Etila da Entrecasca (FAC), Fração Etanólica da Entrecasca (FE) e Fração Clorofórmica da Entrecasca (FC).

### 2.2 ANÁLISE GENOTÓXICA EM *Allium Cepa*

Para a realização do experimento utilizou a espécie *A. cepa* (conhecida popularmente como cebola de cabeça), devido estudos enfatizarem a importância e a utilização de testes com vegetais na avaliação de risco de genotoxicidade, apesar das diferenças entre os metabólitos de plantas e animais há também similaridades, e que ativação de pró-mutágenos possui alta relevância (BAY – HURTADO, 2015). As cebolas foram selecionadas de tamanho uniforme, de mesma origem, não germinadas e saudáveis.

Em cada concentração e controles foram utilizados 10 bulbos de *A. cepa*, sendo estes submersos para germinação em 50 mL dos extratos em estudo a 24 °C, durante 72 horas.

Para os testes foram utilizados todas as frações na Concentração de 100 µg/mL = 5 mg da Droga dissolvido em 500 µL do solvente etanol e os seguintes controles: Controle

negativo (CN): contendo apenas H<sub>2</sub>O mineral, Controle negativo do Solvente (CNS): contendo H<sub>2</sub>O mineral adicionado de 1% 500 µL de Etanol e Controle positivo (CP): contendo 800 mg/L de paracetamol comercial + 500 µL de Etanol, descrita como citotóxica e mutagênica (BESSEMS et al., 1995; STURBELLE et al., 2008; DUSMAN et al., 2012).

Já para os testes anticitotóxicos e antimutagênicos foram utilizadas as mesmas concentrações das frações descritas acima, adicionado do CP.

A análise citotóxica em *A. cepa* foi realizada com base na germinação dos meristemas (FISKESJO, 1986). As raízes foram medidas com 72 horas, após o início da germinação. De cada bulbo de *A. cepa* foram medidas as três maiores raízes, totalizando 30 raízes por tratamento. A medição foi realizada com régua escolar simples graduada em cm.

As análises mutagênicas e de índice mitótico ocorreram em torno de 72 horas após o início do teste, os meristemas foram coletados com 0,1 a 2,5 cm de comprimento, lavados em água destilada, seguida de hidrólise com HCL 1N por 10 minutos em banho-maria a 60 °C, sendo os tubos resfriados em água corrente. Após nova lavagem dos meristemas hidrolisados em água destilada foram realizados esfregaços em duas lâminas por bulbo (totalizando 20 lâminas por tratamento), postas em seguida sob gelo seco por um minuto para retirada da lamínula e aguardado por 30 minutos em temperatura ambiente para secagem. Em seguida, as mesmas foram coradas conforme Meneguetti et al. (2012), utilizando o kit Panótico Rápido composto de três recipientes: primeiro triarilmetano a 0,1%, segundo xantenos a 0,1% e terceiro 51 iazinhas a 0,1%, sendo as lâminas submersas 10 vezes em cada recipiente com submersões de 1 segundo de duração na sequência descrita acima (POLETTTO et al., 2011; FÃO et al., 2012; SILVA et al., 2012; OLIVEIRA; YAMASHITA; MENEGUETTI, 2013).

Posteriormente as lâminas foram lavadas em água deionizada com o pH 7,0 e secas em temperatura ambiente. Em cada lâmina foram contadas mil células e quantificado a quantidade de micronúcleos e o percentual de células em interfase e mitose.

### 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se o software Graphad Prism 5.0 sendo aplicada a Análise de Variância (ANOVA) e o teste Tukey, para os testes de toxicidade e mutagenicidade sendo considerado significativo a partir de  $P < 0,05$ .

Para o cálculo de Índice Mitótico aplicou-se a seguinte equação: (Número Total de Células em Mitose ÷ Número Total de Células × 100), sendo em seguida aplicado o teste quiquadrado, sendo considerado significativo a partir de  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos por meio das análises toxicológicas, antitoxicológicas, mutagênicas e antimutagênicas das frações de *M. guianensis* são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Tabulação dos dados dos testes de toxicidade, antitoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade. (Concentrações em mg/mL)

**Tabela 1.** Análise de toxicidade, antitoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade. (Concentrações em 100 µg/mL)

(A. cepa)	Toxicidade						Antitoxicidade						
	CN	CNS	FH	FE	FAC	FC	CN	CNS	CP	FH	FE	FAC	FC
1	1,8	1,1	0,5	0,4	0,2	0,9	1,8	1,1	0,2	0,6	0,2	0,1	0,4
	1,6	1,1	0,5	0,5	0,2	0,6	1,6	1,1	0,2	0,5	0,2	0	0,4
	1,5	1	0,4	0,5	0,2	0,5	1,5	1	0,1	0,5	0	0	0,1
2	1,4	1,4	0,9	0,6	0,4	0,8	1,4	1,4	0,3	0,8	0,1	0,2	0,6
	1,5	1,1	0,8	0,2	0,3	0,5	1,5	1,1	0,1	0,5	0,1	0,2	0,5
	1,2	0,9	0,5	0,2	0,3	0,5	1,2	0,9	0,1	0,5	0,1	0	0,4
3	1,5	0,8	1,2	0,3	0,6	0,9	1,5	0,8	0,4	1	0,3	0,3	0,5
	1,5	0,9	0,9	0,3	0,6	0,8	1,5	0,9	0,1	1	0,1	0,1	0,3
	1,2	1,1	0,5	0,3	0,3	0,8	1,2	1,1	0	0,9	0,1	0,1	0,3
4	1,4	0,8	1,4	0,3	0,5	0,5	1,4	0,8	0,1	0,6	0,2	0,1	0,5
	1,8	0,7	1,1	0,2	0,2	0,4	1,8	0,7	0,1	0,5	0,1	0,1	0,2
	2	0,7	1	0,2	0,1	0,4	2	0,7	0	0,3	0,1	0	0,2
5	1,8	0,5	1	0,5	0,4	1,1	1,8	0,5	0,1	0,9	0,3	0,4	0,3
	2,2	0,6	1	0,4	0,1	0,8	2,2	0,6	0	0,4	0,2	0,2	0,1
	1,4	0,8	0,9	0,4	0,1	0,7	1,4	0,8	0	0,4	0,2	0,2	0,1
6	1,2	0,5	1,4	0,8	0,6	0,8	1,2	0,5	0,3	0,6	0,3	0,1	0,4
	1,4	0,6	0,8	0,5	0,3	0,8	1,4	0,6	0,3	0,6	0,2	0,1	0,4
	1,5	0,6	0,8	0,4	0,2	0,7	1,5	0,6	0,1	0,5	0,2	0	0,3
7	1	0,6	1,2	0,9	0,4	0,5	1	0,6	0,1	0,9	0,2	0,1	0,7
	0,9	0,8	0,9	0,8	0,1	0,5	0,9	0,8	0,1	0,9	0,2	0	0,5
	0,8	0,9	0,6	0,5	0,1	0,4	0,8	0,9	0	0,7	0,1	0	0,4
8	0,9	0,8	1,1	0,6	0,4	1	0,9	0,8	0,2	1,1	0,1	0,2	0,6
	1,1	1,1	1	0,5	0,2	0,8	1,1	1,1	0,1	1	0	0,1	0,5
	0,9	1	1	0,5	0,1	0,5	0,9	1	0,1	1	0	0,1	0,5
9	0,9	0,5	0,9	0,6	0,3	1,1	0,9	0,5	0,1	1,2	0,1	0,1	0,3
	0,8	0,4	0,9	0,6	0,3	0,5	0,8	0,4	0,1	1	0,1	0,1	0,2
	0,5	0,4	0,7	0,5	0,2	0,4	0,5	0,4	0	0,6	0,1	0,1	0,2
10	1	0,6	1,4	0,7	0,3	1,3	1	0,6	0,2	1,1	0,2	0,2	0,5
	1,2	0,8	1,2	0,4	0,1	1,3	1,2	0,8	0	0,8	0,2	0	0,4
	1	0,8	1,1	0,3	0,1	1	1	0,8	0	0,8	0,1	0	0,2
<b>Média</b>	<b>1,3</b>	<b>0,8</b>	<b>0,92</b>	<b>0,46</b>	<b>0,27</b>	<b>0,73</b>	<b>1,3</b>	<b>0,8</b>	<b>0,12</b>	<b>0,74</b>	<b>0,15</b>	<b>0,11</b>	<b>0,37</b>

	Mutagenicidade						Antimutagenicidade						
	CN	CNS	FH	FE	FAC	FC	CN	CNS	CP	FH	FE	FAC	FC
1	1	3	4	6	11	7	1	3	8	8	9	13	14
	2	2	5	5	9	5	2	2	12	7	11	15	11
2	1	2	2	5	9	3	1	2	5	4	13	11	10
	1	5	2	3	11	4	1	5	9	6	13	10	12
3	0	4	5	8	10	3	0	4	14	2	13	16	13
	2	3	3	8	7	3	2	3	10	3	14	18	16
4	1	2	4	5	13	5	1	2	16	6	10	15	8
	2	4	6	6	6	8	2	4	12	6	16	14	10
5	1	3	5	3	6	4	1	3	9	5	9	15	7
	0	3	4	7	8	4	0	3	9	6	8	11	9
6	0	3	4	9	7	5	0	3	9	8	8	9	7
	0	4	2	10	7	6	0	4	14	4	9	10	7
7	0	6	2	11	7	4	0	6	13	7	7	14	13
	1	2	5	11	5	3	1	2	14	3	11	19	14
8	2	3	8	8	6	2	2	3	9	4	14	12	15
	2	4	1	5	8	3	2	4	7	4	14	13	15
9	1	4	6	4	6	5	1	4	16	6	15	11	16
	1	5	7	4	9	8	1	5	14	3	11	15	10
10	2	6	3	5	11	3	2	6	13	5	9	14	10
	0	3	1	3	10	4	0	3	15	5	10	17	9
<b>Média</b>	<b>1</b>	<b>3,5</b>	<b>3,9</b>	<b>6,3</b>	<b>8,3</b>	<b>4,4</b>	<b>1</b>	<b>3,5</b>	<b>11,4</b>	<b>5,1</b>	<b>11,2</b>	<b>13,6</b>	<b>11,3</b>

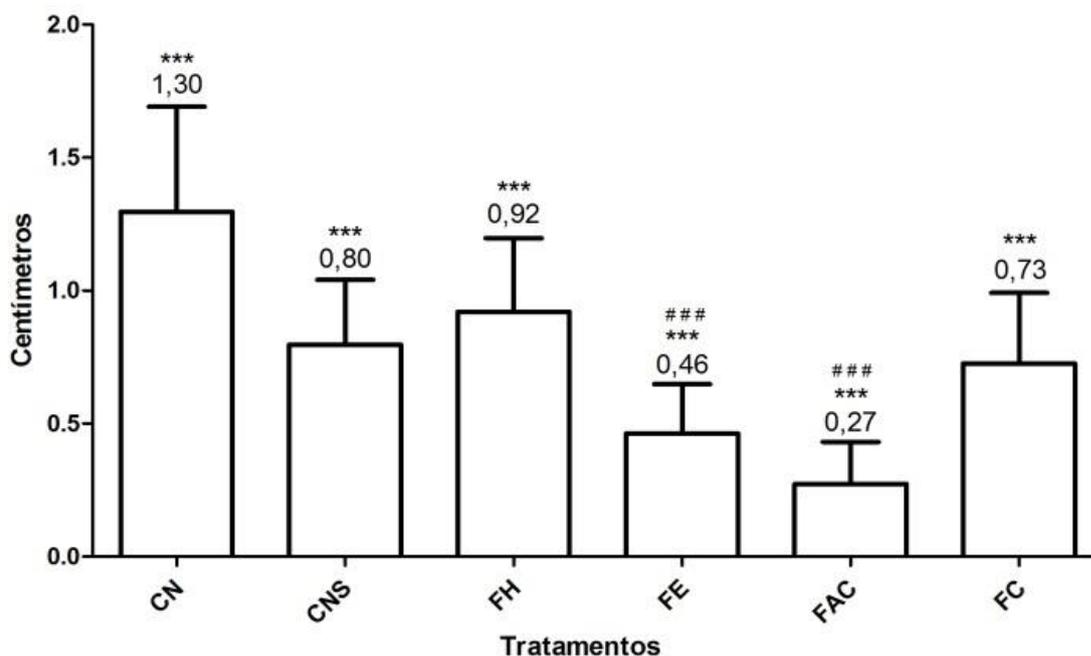
**CN:** Controle negativo; **CNS:** Controle negativo do solvente; **FH:** Fração hexânica; **FE:** Fração etanólica; **FAC:** Fração acetato de etila da entrecasca; **FC:** Fração clorofórmica

Os dados mostram que as frações FE e FAC de *M. guianensis* apresentaram toxicidade quando comparado ao CNS.

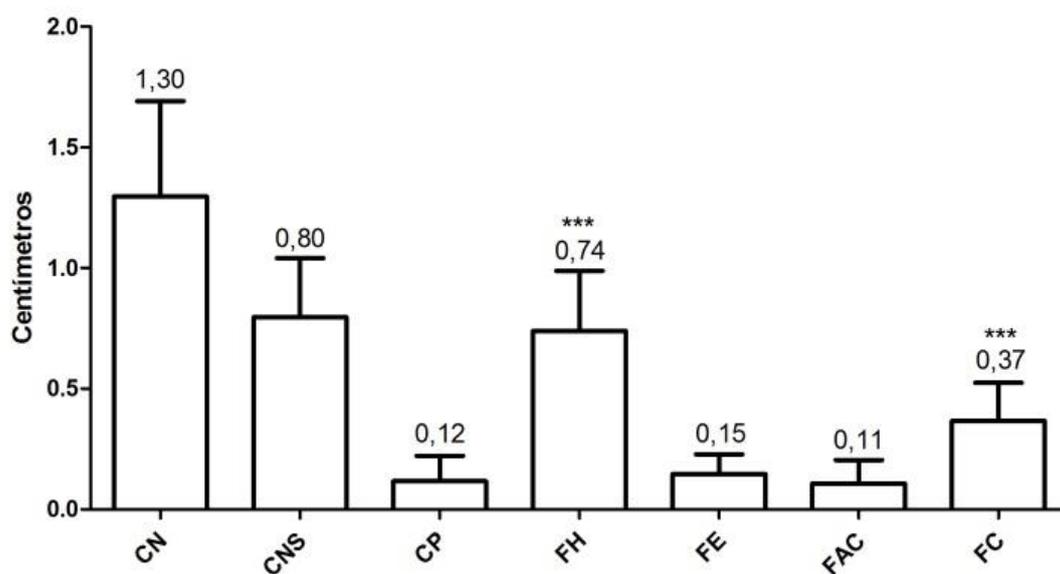
As frações FH e FC não apresentaram efeitos tóxicos (Figura 1) e ainda apresentaram ação antitoxicidade ( $p < 0,001$ ), contra os efeitos ocasionado pelo paracetamol na concentração de 800 mg/L conforme o observado no CP (Figura 2).

Resultados semelhantes foram encontrados por Meneguetti et al. (2014b), onde nas concentrações de 3,85 mg/mL e 38,5 mg/mL do extrato aquoso de *M. guianensis*, apresentaram ação antitoxicológica, contra os efeitos ocasionados pelo paracetamol na concentração de 800 mg/L mesma concentração utilizada no CP do presente estudo.

Os efeitos não tóxicos de espécies do gênero *Maytenus*, também foi observado em outro estudo realizado com *M. peduncularis*, *M. procumbens*, *M. senegalensis* e *M. undata*, contra linhagens de células Vero (AHMED et al., 2013).

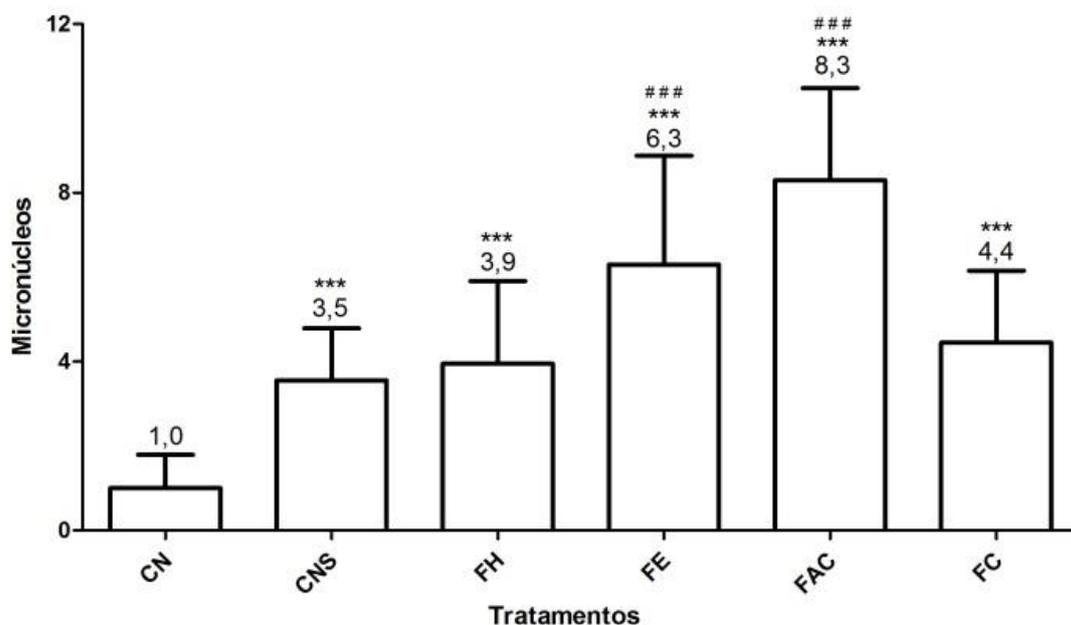


**Figura 1.** Toxicidade das frações de *M. guianensis*. Significativo em relação ao CN \*\*\* (P<0,001). Teste Anova e Tukey. Significativo em relação ao CNS ### (P<0,001). Teste Anova e Tukey.

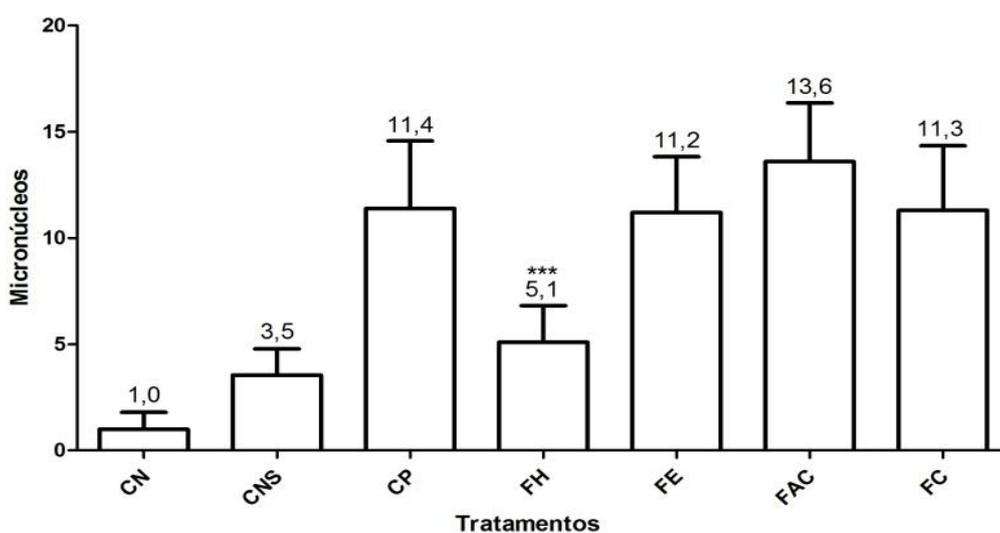


**Figura 2.** Antitoxicidade das frações de *M. guianensis*. Significativo em relação ao CP \*\*\* (P<0,001). Teste Anova e Tukey

Na análise de mutagenicidade as frações FE e FAC apresentaram efeitos mutagênicos ( $p < 0,001$ ) (Figura 3), enquanto a FH apresentou efeito antimutagenicidade ( $P < 0,001$ ) (Figura 4).



**Figura 3.** Efeitos mutagênicos das frações de *M. guianensis*. Significativo em relação ao CN \*\*\* ( $P < 0,001$ ). Teste Anova e Tukey Significativo em relação ao CNS ### ( $P < 0,001$ ). Teste Anova e Tukey



**Figura 4.** Efeitos antimutagênicos das frações de *M. guianensis*. Significativo em relação ao CP \*\*\* ( $P < 0,001$ ). Teste Anova e Tukey

Efeitos antimutagênicos já foram observados em extratos aquosos dessa espécie, nas concentrações de 3,85 mg/mL e 38,5 mg/mL (MENEGUETTI et al., 2014b), esses mesmos extrato, nessas mesmas concentrações não apresentou efeitos genotóxicos e ainda possui ação antigenotóxica em camundongos tratados de forma aguda (MENEGUETTI et al., 2015a).

Outro estudo realizado com extrato etanólico bruto de *M. rígida in vivo*, por meio do teste de micronúcleos, não foi observado mutagenicidade (TAVARES, 2013), efeito semelhante, também foram observados com extratos hidroalcoólicos de *M. robusta* que não apresentou nenhum efeito clastogênico nas células da medula óssea de ratos (RAYMUNDO et al., 2012) e em *M. ilicifolia*, onde foi evidenciada uma redução da mutagênese induzida pela epigallocatequina-3-galato no teste de AMES (KRUL et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2009).

Acredita-se que os efeitos antimutagenicos e antigenotóxicos, ocorrentes no gênero *Maytenus*, estão relacionados diretamente com a ocorrência de triterpenos, visto que grupos isolados de triterpenos que foram testados *in vitro*, apresentou uma atividade citotóxica significativa contra células 4T1 (SOUSA et al., 2014), esse mesmo grupo exibem citotoxicidade frente algumas linhagens celulares de vários tipos de câncer (CHATURVEDI et al., 2008; SIDDIQUE; SALEEM, 2011; TAVARES, 2013), vindo de encontro com o presente estudo, visto que diversos triterpenos já foram isolados de FH de *M. guianensis* (FACUNDO et al., 2015).

Os resultados de citotoxicidade e anticitotoxicidade dos diferentes tratamentos sobre o ciclo de *A. cepa* podem ser observados na Tabela 2.

A fração FH não apresentou atividade citotóxica, quando comparado ao CNS, e ainda teve uma ação anticitotóxica quando comparado com o CP ( $P < 0,001$ ). Já a FC apresentou ação citotóxica e anticitotóxica, semelhante aos dados encontrados por Meneguetti (2014b), onde na concentração de 77 mg/mL demonstrou ter ação citotóxica e anticitotóxica na presença do paracetamol.

Os efeitos anticitotóxicos podem estar relacionado à presença de triterpenos como friedelina e o friedelol que apresentam atividade citotóxica sobre células de linhagens tumorais *in vitro* (OKABE et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2009), esses grupos também já foram encontrados em FC de *M. guianensis* (FACUNDO et al., 2015). Em outros estudos já foi comprovado que as principais atividades biológicas atribuídas aos derivados desses sesquiterpenos estão: atividade antitumoral e inseticida (TAKAISHI et al., 1993; SOUZA, 2013)

**Tabela 2.** Tratamento e número total de células de *A. cepa* analisadas no ciclo celular em interfase e mitose

Tratamento	Número de Células			Índice Mitótico (%)
	Total	Interfase	Mitose	
CN	20.000	15.982	4.018	20,09
CNS	20.000	17.142	2.858	14,29***
FH	20.000	16.805	3.195	15,97***
FE	20.000	17.614	2.386	11,93*** ##
FAC	20.000	18.453	1.547	7,73*** ###
FC	20.000	17.610	2.390	11,95*** ##
CP	20.000	19.008	992	4,96
CP+ FH	20.000	17.213	2.787	13,93 ***
CP+ FE	20.000	18.908	1.092	5,46
CP+ FAC	20.000	19.076	924	4,62
CP+ FC	20.000	17.643	2.357	11,78 ***

Significativo em relação ao CN \*(P<0,05), \*\* (P<0,01) e \*\*\* (P<0,001). Teste Teste Qui-Quadrado Significativo em relação ao CNS # (P<0,05), ## (P<0,01) e ### (P<0,001). Teste Teste Qui-Quadrado

**CN:** Controle negativo; **CNS:** Controle negativo do solvente; **FH:** Fração hexânica; **FE:** Fração etanólica; **FAC:** Fração acetato de etila da entrecasca; **FC:** Fração clorofórmica; **CP:** Controle positivo;

As frações FE, FAC apresentaram ação citotóxica e não tiveram efeito anticitotóxico, quando comparado aos CNS e CP respectivamente. Esses efeitos foram observados em outro estudo com meristemas de *A. cepa*, onde utilizou frações de *M. guianensis*, sendo possível observar que a exposição por 48 horas, nas concentrações de 50 mg/mL; 100 mg/mL; 200 mg/mL das frações de *M. guianensis* foi evidenciada a capacidade antiproliferativa da célula, porém nesse estudo não foi observado ações clastogênica e aneugênica (BAY – HURTADO, 2015), diferentemente de outro estudo onde na concentração de 192 mg/mL do extrato aquoso da mesma espécie, demonstrou o aumento significativo de micronúcleos e algumas pontes anafásicas (MENEGUETTI et al., 2014b), os mesmos que também foram observados na FE e FAC, porém não foi quantificado a quantidade de pontes anafásicas.

Em estudos realizados por Meneguetti (2015a), com extrato aquosa de *M. guianensis* em um ensaio cometa com camundongos foi possível observar que as concentrações de 77 mg/mL e 192 mg/mL apresentaram ação mutagênica em relação ao CN. Esse fato pode ser explicado devido muitos compostos naturais encontrados em várias plantas consumidas pelas populações tradicionais são potenciais agentes cancerígenos ou promotores de tumores e devem ser evitado seu uso por longos períodos e em concentrações elevadas (BODE; DONG, 2014; MENEGUETTI et al., 2015a), visto que as concentrações de

77mg/mL e 192mg/mL do extrato aquoso de *M. guianensis* são 20 e 50 vezes mais concentradas que o uso popular da mesma (CAMPAROTO et al., 2002; MENEGUETTI et al., 2014b; MENEGUETTI et al., 2015a)

## 4. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que as frações FH e FC de *M. guianensis* não apresentaram efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos e a FH apresenta ainda efeitos antitóxicos, anticitotóxicos e antimutagênico. Porém ainda são indicados estudos futuros *in vitro* e *in vivo*, a fim de melhorar a compreensão dos efeitos fisiológicos das frações e de seus isolados, sendo averiguados os possíveis efeitos sinérgicos, ou até potencialização dos resultados com os isolados.

## 5. REFERÊNCIAS

AHMED, A.S.; McGAW, L.J.; ELOFF, J.N. Evolution of pharmacological activities, cytotoxicity and phenolic composition of four Maytenus species used in Southern African traditional medicine to treat intestinal infections and diarrhoeal diseases. **BMC.**, v.13, p.100, 2013.

BAY-HURTADO, F.; LIMA, R.A.; AZEVEDO, M.S.; FACUNDO, V.A. Avaliação das atividades genotóxica e antioxidante da periderme do caule de chichuá (*Maytenus guianensis* Klotzsch). **Sci Plena.**, v.11. n.7, p.074501, 2015;

BRUNI, R.; ROSSI, D.; MUZZOLI, M.; ROMAGNOLI, C.; PAGANETTO, G.; BESCO, E.; CHOQUECILLO, F.; PERALTA, K.; LORA, W.S.; SACCHETTI, G. Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of *Maytenus krukovii* bark. **Fitoterapia.**, v.77, p.538-545, 2006.

CAMPAROTO, M.L.; TEXEIRA, R.O.; MANTOVANI, M.S., VICENTINI, V.P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. And *Bayhonia condicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genet Mol Biol.**, v.25, p.85-89, 2002.

FACUNDO, V.A.; MENEGUETTI, D.U.O.; MILITÃO, J.L.S.T.; LIMA, R.A.; BAY-HURTADO, F.; CASSEB, A.A.; et al. Chemical constituents from *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Amazon rainforest. **Biochem Syst Ecol.**, v. 58, p.270-273, 2015.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J Ethnopharmacol.**, v.49, p.57-68, 1995.

MENEGUETTI, D.U.O; CUNHA, R.M.; LIMA, R. A.; OLIVEIRA, F.A.S.; MEDEIROS, D.S.S.; PASSARINI, G.M.; et al. Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Rev Ciênc Farm Básica e Apl.**, v.35, n.4, p.577-587, 2014a.

MENEGUETTI, D.U.O; LIMA, R.A.; SILVA, J.B; SILVA, R.P.; PAGOTTO, R.C; FACUNDO, V.A.; Análise Citotóxica e Mutagênica do Extrato Aquoso de *Maytenus guyanensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico. **Ciência e Natura.**, v.36, n.3, p.301-309, 2014b.

MENEGUETTI, D.U.O; **Análise genotóxica e parasitológica de extratos e substâncias isoladas de *Maytenus guianensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae), Chichuá (Xixuá) Amazônico** [Tese]. Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015b.

MENEGUETTI, D.U.O; LIMA, R.A.; SILVA, F.C; SILVA; PASSARINI, G.M.; FACUNDO, J.B.; et al. Acute genotoxicity analysis in vivo of the aqueous extract of *Maytenus guyanensis* Amazonian chichuá. **Rev Bras Farmacogn.**, v.25, n.2, p.164-169. 2015a;

MENEGUETTI, D.U.O; FACUNDO, V.A. Análise genotóxica e antiparasitária de extratos de substância isoladas de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae), Chichuá (Xixuá) Amazônico. **Rev Pan-Amaz Saúde.**, v.6, n.4, p.69-70, 2015.

OKAYE, F.B.C.; DEBBAB, A.; WRAY, V.; ESIMONE, C.O.; OSADEBE, P.O.; PROKSCH, P. A phenyldilactone, bisnorsesquiterpene, and cytotoxic phenolics from *Maytenus senegalensis* leaves. **Tetrahedron Lett.**, v.55, p.3756-3760, 2014.

OLIVEIRA, R.S.; CUNHA, S.C.; COLAÇO, W. Revisão de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Ressek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Rev Bras Farmacogn.**, v.19, p.650-659, 2009.

RAYMUNDO, T.M.; FAVILLA, M.; NIERO, R.; ANDRADE, S.F.; MAISTRO, E.L.; Genotoxicity of the Medicinal plant *Maytenus Robusta* in mammalian cells *in vivo*. **Genet Mol Res.**, v.11, n.3, p.2847-2854, 2012.

SOUZA, J.R.; PINHEIRO, J.A.; RIBEIRO, E.F.; SOUZA, E.; MAIA, G.S. A sesquiterpene evoninoate alkaloid from *Maytenus guianensis*. **Phytochemistry.**, v.25, n.7, p. 1776-1778, 1986.

SOUZA, G.F.; SOARES, D.C.F.; MEXILHÃO, W.N.; POMPEU, N.F.E.; SILVA, G.D.F.; FILHO, S.A.V.; et al. Pentacyclic Triterpenes from Branches of *Maytenus robusta* and *in vitro* Cytotoxic Property Against 4T1Cancer Cells. **J Braz Chem Soc.**, v.25, p.1338-1345, 2014.

SOUZA, S.M. **Estudo fitoquímico e atividade citotóxica de extratos e frações de *Austroplenckia populnea* Reissek (Celastraceae)**. [Dissertação], UFOP, Ouro Preto, 2013.

SOUZA, G. F.; **Estudo fitoquímico do extrato hexânico e da atividade biológica de constituintes das folhas de *Maytenus robusta* (Celastraceae)**. [Dissertação] UFMG;. Belo Horizonte, 2012.

TAVARES, A.V.; **Avaliação *in vivo* do potencial mutagênico e antimutagênico do extrato etanólico da entrecasca do caule de *Maytenus rígida* Mart através do teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongos**. [monografia] WEP, Campina Grande 2013.

## ANÁLISE GENOTÓXICA: MÉTODOS E APLICAÇÕES

Sérgio Luiz Prolo Júnior<sup>1,2</sup>, Hémilly Caroline da Silva Paixão<sup>1</sup>, Laura Nadyne da Silva Silvestre<sup>1</sup>, Romeu Paulo Martins Silva<sup>1</sup>, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti<sup>1,3</sup>

1. Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

### RESUMO

Genotoxicidade é a capacidade de um agente causar danos ao material genético das células. Substâncias químicas e agentes físicos derivados de poluição ambiental, drogas e afins podem ser difíceis de serem detectados por testes físico-químicos, então modelos biológicos são adequados para uma melhor compreensão dos potenciais danos que oferecem aos seres vivos. O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura demonstrando as principais técnicas aplicadas para realização de testes de avaliação de genotoxicidade. Dentre as principais técnicas aplicadas para ensaios genotóxicos destacam-se o teste de *Allium cepa*, Ensaio Cometa e SOS Chromotest, sendo estas as mais frequentes utilizadas em experimentos. Estas técnicas apresentam boa correlação quando comparadas a outros testes, permitindo que o pesquisador adote o melhor método para a realização de seu experimento de acordo com sua realidade.

**Palavras-chave:** Genotoxicidade, Toxicologia e Métodos de análise.

### ABSTRACT

Genotoxicity is the ability of an agent to cause damage to the genetic material of cells. Chemicals and physical agents derived from environmental pollution, drugs and others, may be difficult to detect by physical-chemical tests, so biological models are adequate for a better understanding of the potential damage they offer to living beings. The objective of the present study was to perform a literature review demonstrating the main techniques used to execute genotoxicity evaluation tests. Among the main techniques applied for genotoxic assays, *Allium cepa*, Comet Assay and SOS Chromotest tests are the most frequent tests used in experiments. These techniques present a good correlation when compared to other tests, allowing the researcher to adopt the best method to carry out their experiment according to their reality.

**Keywords:** Genotoxicity, Toxicology and Analysis methods.

## 1. INTRODUÇÃO

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é a molécula que armazena as informações genéticas nas células, sendo que sua integridade e estabilidade é fundamental para a sobrevivência dos seres vivos (GAJSKI, 2019). Esta molécula está localizada em

compartimentos celulares, sendo armazenada no citoplasma de procaríotos e núcleo em eucariotos, mesmo assim ela pode sofrer alterações mediadas por agentes físicos ou químicos do ambiente, podendo gerar danos que eventualmente levam a mutações, desencadeando patologias, incluindo câncer (LEME; MORALES, 2009; HELLEDAY; ESHTAD; NIK-ZAINAL, 2014; ZHANG et al., 2018; FATEH et al., 2019; GERIĆ et al., 2019).

Substâncias químicas provenientes da poluição ambiental, tais como compostos orgânicos e metais pesados, podem alterar a atividade celular, inibindo atividades enzimáticas e alterando seu material genético (MACEDA et al., 2015; KASPER et al., 2018).

A genotoxicidade é um termo geral que refere-se a capacidade de um agente provocar alterações genéticas, sejam de ordem estrutural, informacional ou de segregação do DNA, que podem levar a danos no material genético, provocando aberrações cromossômicas, tais como C-Metáfases, metáfase com aderência, metáfase com perdas cromossômicas, pontes anafásicas, anáfases e telófases com atrasos, perdas cromossômicas e anormalidades nucleares, são algumas evidências de alterações desencadeadas por agentes genotóxicos (PALSIKOWSKI et al., 2017; DUSINSKA et al., 2019).

O termo mutagenicidade está associado à genotoxicidade, uma vez que se caracteriza pela indução de mutações no material genético de forma permanente, ou seja, um agente genotóxico leva a mutagenidade (ARAÚJO, 2013; HARA; MARIN-MORALES, 2017).

Ensaio que envolve análises genotóxicas possibilitam a visualização destes efeitos macro e microscopicamente, sendo possível observar, a ação direta no desenvolvimento celular e tecidual (CHANDRA et al., 2005). Essas alterações causadas por agentes genotóxicos podem formar fragmentos cromossômicos que não são incorporados ao núcleo após a mitose, resultando em corpúsculos denominados micronúcleos (OLIVEIRA; YAMASHITA; MENEGUETTI, 2013), que medem cerca de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo principal (PEREIRA JÚNIOR, 2015). Os micronúcleos são componentes citoplasmáticos de material genético nuclear incorporados durante a divisão celular, demonstrando assim que houve erro durante a replicação do DNA cromossômico e ou da divisão celular (FLORES-BRACHO et al., 2019).

As análises genotóxicas são realizadas afim de detectar se agentes químicos, físicos e biológicos, são capazes de alterar o material genético das células, e conseqüente, produzir mutações que podem comprometer a viabilidade celular (ROBERTO et al., 2016).

A aplicabilidade de testes genotóxicos é bastante ampla, destacam-se testes investigativos para análise de ecossistemas aquáticos (MAZZEO; MARIN-MORALES, 2015; HARA; MARIN-MORALES, 2017; COSTA; MONTEIRO; BATISTA, 2018; GUERREIRA, 2019), análise de componentes fitoquímicos (MENEGUETTI et al., 2015; ROBERTO et al., 2016; LIMAN; CIĞERCI GÖKÇE, 2018; WOLFF et al., 2018; MEDEIROS et al., 2019; FATEH et al., 2019), resíduos laboratoriais e industriais (MAZZEO et al., 2015; ANACLETO; ROBERTO; MARIN-MORALES, 2017; ITOH; HATTORI, 2019; KHAN; ANAS; MALIK, 2019; LIMAN; ACIKBAS; CIĞERCI, 2019), nanopartículas (BHAGAT; S; SHYAMA, 2019; DELMOND et al., 2019; DU et al., 2019; DUSINSKA et al., 2019; GHOSH et al., 2019), metais pesados (DELMOND et al., 2019) e metabólitos microbiológicos (GERIĆ et al., 2019; LACERDA et al., 2019).

Muitas análises físico-químicas por vezes podem apresentar certa dificuldade em elucidar se determinado efluente, droga, moléculas, metabólitos e afins, apresentam toxicidade para os seres vivos, pois podem se apresentar em pequenas concentrações, portanto testes genotóxicos vem a complementar tais análises, uma vez que organismos biológicos são susceptíveis a certos agentes, mesmo em baixas concentrações (KHAN; ANAS; MALIK, 2019).

Existe uma ampla gama de ensaios genotóxicos, cada qual com um organismo biológico adequado, dentre os testes, destacam-se o teste de *Allium cepa* (plantas), Ensaio Cometa (animais) e SOS Chromotest (bactérias). Dessa forma, este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre as principais técnicas de análise genotóxica.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 TESTE DE *Allium cepa*

A espécie *A. cepa* foi inicialmente utilizada como organismo biológico a partir do ano 1920, e desde então, diversos estudos relacionados a toxicidade e genotoxicidade utilizam essa espécie em experimentos, pois trata-se de um teste de baixo custo e alta eficiência (FISKESJÖ, 1985; PERON; CANESIN; CARDOSO, 2009; MALINI et al., 2010; LESSA; CARIELLO, 2017; FERNANDES et al., 2018). A utilização de plantas para ensaios de genotoxicidade é de grande importância, pois dispensa a preparação de meios de cultura elaborados, estabelecimento de ambientes extremamente controlados, autorização de Comitês de Ética em Pesquisa, além de apresentarem uma boa correlação quando a outras

metodologias que utilizam animais ou microrganismos para o mesmo tipo análise (FISKESJÖ, 1988; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; MENEGUETTI et al., 2011; MENEGUETTI et al., 2012; HARA; MARIN-MORALES, 2017; IQBAL et al., 2019; QUADRA et al., 2019).

O teste de *A. cepa* possui diversas adaptações, sendo que será apresentado dois protocolos de execução, um utilizando sementes e outro bulbos.

### **2.1.1 Sementes de *Allium cepa***

O protocolo apresentado segue a metodologia e adaptações propostas por Palsikowski et al. (2017):

- a) Colocar sementes de *A. cepa* da variedade Baia Periforme em uma placa de Petri revestida com papel filtro (100 sementes por placa, duas placas para cada tratamento);
- b) Submeter as sementes à germinação, sob temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , utilizando como meio as amostras a serem analisadas (extratos, efluentes, etc).
- c) Utilizar como Controle Negativo, água ultrapura e Controle Positivo, Metanossulfonato de metila em concentração de  $4\times 10^{-4}\text{M}$  e Trifluralina em 0,84 ppm (Dois controles positivos, cada qual consiste em um tratamento independente);
- d) Após os meristemas crescerem cerca de 1,5 cm em comprimento, devem ser coletados e fixados em solução Carnoy (3:1 Álcool-Ácido Acético) durante 6h a temperatura ambiente;
- e) Substituir a solução de Carnoy e depois armazenar a  $4^{\circ}\text{C}$  até a preparação;
- f) Submeter os meristemas fixados à Reação de Feulgen (MELO; VIDAL, 1978);
- g) Colocar os meristemas em lâminas, pingar uma gota de solução de Carmim acético 2%.
- h) Cobrir a lâmina com lamínula e pressionar suavemente para realizar o esmagamento do meristema;
- i) Remover a lamínula, colocando e retirando a lâmina rapidamente sobre nitrogênio líquido;
- j) Realizar a preparação permanente da lâmina utilizando resina sintética;
- k) Analisar a lâmina em microscópio de luz, utilizando a objetiva de 100x;
- l) Contar 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina e 5 lâminas por cada placa de Petri.

Seguindo o protocolo acima descrito, é possível avaliar os seguintes índices propostos por Palsikowski et al. (2017):

Fitotoxicidade por meio do Índice de Germinação (GI):

$$GI = \frac{\text{Número total de sementes germinadas}}{\text{Número total de sementes expostas}} \times 100$$

Citotoxicidade, avaliando o Índice Mitótico (MI):

$$MI = \frac{\text{Número total de células em divisão (Mitose)}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

Genotoxicidade, avaliada por meio do Índice de Alterações Cromossômicas. Consideram-se as células que contêm aberrações cromossômicas (aderência, poliploidia, perda, C-metáfase, multipolaridade e pontes) e anormalidades nucleares (células binucleadas, trinucleadas e núcleos lobulados):

$$CAI = \frac{\text{Número total de células alteradas}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

Mutagenicidade, avaliando o Índice de Mutagenicidade (MutI) por meio da presença de micronúcleos:

$$MutI = \frac{\text{Número total de células alteradas}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

### 2.1.2 Bulbos de *Allium cepa*

O protocolo apresentado segue a metodologia e adaptações propostas por Meneguetti et al. (2012):

- a) Adquirir 10 bulbos de *A. cepa* (pequenas, uniformes, da mesma origem, não germinadas e sadias) para cada amostra e controle;
- b) Colocar cada bulbo para germinar em frascos de 50 ml, com o fundo imerso na amostra e no controle (água mineral);

- c) Coletar os meristemas após cerca de 72 horas com aproximadamente 0,5 a 3,0 cm de comprimento;
- d) Lavar os meristemas em água destilada;
- e) Hidrolisar com 1N HCL por 10 minutos em banho-maria a 60 °C, resfriar os tubos em água corrente;
- f) Lavar os meristemas com água destilada;
- g) Realizar a preparar em duas lâminas por bulbo, utilizando a técnica de esmagamento;
- h) Corar com o kit Panótico rápido LB mergulhando as lâminas 10 vezes em cada recipiente com a duração da imersão de 1 segundo na seguinte ordem: triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e tiazina a 0,1%;
- i) Lavar as lâminas com água deionizada pH 7,0. Secar em temperatura ambiente;
- j) Visualizar ao microscópio de Luz na objetiva de 40x;
- k) Contar 1.000 células por lâmina;

Para uma melhor conservação da lâmina, Lopes (2016) sugere a colocação de uma gota verniz vitral incolor Acrilex® (PAIVA et al., 2006), posteriormente a colocação de uma lamínula e secagem *overnight*, desta forma a lâmina se torna permanente, facilitando sua visualização por um longo período de tempo.

O teste de *A. cepa* modificado de Meneguetti et al. (2012), permite a realização desta metodologia de uma forma rápida, mais econômica e já foi comprovada sua eficiência por meio dos trabalhos realizados por Ancia e Romão (2016), Meneguetti et al. (2014) Vanuchi et al. (2015) Lopes (2016).

Para ambos os protocolos descritos podem ser utilizados os índices de Palsikowski et al. (2017) previamente apresentados, com exceção do Índice de Germinação.

## 2.2 ENSAIO COMETA

Esta metodologia foi introduzida pelos cientistas suecos Ostling and Johanson em 1984, ela consiste na análise do dano causado por um agente a molécula de DNA, que foi nomeada a partir da semelhança da imagem que o DNA analisado deixa após uma eletroforese (RAJAPAKSHA; WIJAYARATHNA, 2017).

Esta técnica é relativamente simples, sensível, confiável e de baixo custo, sendo que diferentes organismos biológicos podem ser utilizados para sua realização, tais como

células humanas e de outros animais, leveduras, plantas e protozoários (GAJSKI, 2019; LIMAN; ACIKBAS; CIĞERCI, 2019).

### 2.2.1 Ensaio Cometa com sangue periférico de peixes

O protocolo apresentado a seguir é descrito por Caritá (2010), baseado na metodologia de Singh et al. (1988):

- a) Submergir as lâminas em agarose normal 1,5% a 60°C, secar e armazenar em geladeira;
- b) Coletar amostras de 3µL de sangue de peixes e diluir em 1000µL de solução fisiológica de vertebrados;
- c) Colocar 10µL da suspensão celular nas lâminas e adicionar 120µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C;
- d) Incubar em uma solução de lise (1mL triton X-100, 10mL de DMSO e 89mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução de estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, ~8,0g de NaOH sólido, 10g de Lauryl sarcosinato sódico para 1L), em geladeira por, no mínimo, uma hora.
- e) Após a lise, transferir as lâminas para cuba de eletroforese, contendo solução tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH 12,1) à 4°C, em corrente 49V e 300mA, por 20 minutos;
- f) Neutralizar as lâminas em solução tampão (Tris 0,4M-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, secar a temperatura ambiente e fixar com etanol 100% durante dez minutos.
- g) Realizar a coloração foi com Brometo de Etídio (0,02 mg/mL);
- h) Visualizar em microscópio de fluorescência, aleatoriamente, 100 nucleoides de cada peixe;
- i) Os nucleoides são classificados visualmente, segundo a classificação de Kobayashi et al. (1995) e de acordo com a migração dos fragmentos, em: classe 0 (ausência de dano visível); classe 1 (pequeno dano - cauda menor que uma vez o tamanho do nucleoide); classe 2 (médio dano – cauda com tamanho de uma a duas vezes o tamanho do nucleoide); e classe 3 (grande dano - cauda com tamanho maior que duas vezes o tamanho do nucleoide).

### 2.2.2 Ensaio Cometa com *A. cepa*

O protocolo apresentado a seguir é descrito por Liman, Acikbas e Ciğerci, (2019), baseado no protocolo de Tice et al. (2000):

- a) Submeter a germinação bulbos de *A. cepa* contendo as amostras a serem analisadas (seguir as orientações do experimento com *A. cepa* do referido trabalho);
- b) Selecionar 10 meristemas de cada tratamento;
- c) Realizar a extração nuclear, colocando 500 µL por meio de solução gelada de tampão Tris-MgCl<sub>2</sub> (4 mM MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O; 0,2 M Tris, 0,5% v/v Triton X-100, pH 7,5);
- d) Suspende 50 µL da solução e misturar com 50 µL de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C;
- e) Colocar a suspensão sobre lâminas previamente cobertas por agarose normal (1%), sendo 3 lâminas para cada tratamento;
- f) Submergir as lâminas em tampão alcalino (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH > 13) a 4 °C por 20 minutos;
- g) Realizar a eletroforese a 25 V e 300 mA at 4 °C por 20 minutos;
- h) Neutralizar as lâminas com solução Tris (0,4 M pH 7,5) três vezes e realizar a coloração com 70 µL de Brometo de Etídio (20 µg/mL) por 5 min;
- i) Visualizar o material com microscópio de fluorescência com objetiva de 40x.
- j) Contar aleatoriamente 50 cometas por lâmina e classificar em cinco classe, 0-sem danos até 4-dano completo.

### 2.2.3 Ensaio Cometa sangue periférico humano

O protocolo apresentado a seguir foi baseado na metodologia utilizada por Gerić et al. (2019):

- a) Coletar sangue periférico e submeter as diferentes amostras (para orientações sobre a coleta e condições de incubação vide o referido trabalho);
- b) Utilizar como controle positivo Peróxido de Hidrogênio (1mM durante 10 minutos);
- c) Após a exposição (4 a 24h), deixar as amostras *overnight* em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, 1% sarcosinato de sódio, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10);
- d) Realizar a desnaturação por meio de solução desnaturante (300 mM NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 13) durante 20 minutos;
- e) Realizar a eletroforese (1v/cm) durante 20 minutos;

- f) Neutralizar em solução tampão (0,4 M Tris; pH 7,5) por 15 minutos a 4°C;
- g) Efetuar a coloração com Brometo de Etídio (10 µg/mL);
- h) Visualizar o material com microscópio de fluorescência, com aumento de 250x;
- i) Contar aleatoriamente 100 cometas por lâmina, sendo duas lâminas para cada tratamento;
- j) Sugere-se repetir o experimento duas vezes.

### 2.3 SOS CHROMOTEST

O método SOS Chromotest foi desenvolvido e validado por Quillardet e Hofnung em 1985 e baseia-se nas respostas metabólicas de *Escherichia coli* frente à agentes genotóxicos (OTHMEN et al., 2019)

Trata-se de um ensaio quantitativo, colorimétrico, de dose-resposta que verifica se uma determinada substância causa dano ao genoma bacteriano, influenciando assim a produção da enzima β-galactosidase, utilizando como parâmetro de comparação, a produção natural de alcalino fosfatase (QUILLARDET; HOFNUNG, 1985).

O protocolo apresentado a seguir foi baseado na metodologia utilizada por Othmen et al. (2019):

- a) Cultivar *overnight* cultura de *E. coli* de linhagem PQ37 em caldo Luria com ampicilina (30 µg/mL) a 37°C sob agitação de 250 rpm;
- b) Diluir a cultura até uma densidade óptica de 0,6;
- c) Colocar 190 µl da cultura e 10 µl da amostra a ser testada em placa de 96 micropoços;
- d) Incubar sob agitação de 1200g a 37°C durante 3 horas;
- e) Descartar o sobrenadante e suspender o pellet 200 µl em tampão (Tris (hidroximetil) Aminometano 2,43%);
- f) Transferir 100 µl para a placa e adicionar 100 µl de tampão SOS Chromogênico (QUILLARDET; HOFNUNG, 1985);
- g) Incubar durante 2 horas a 37°C sob agitação de 100g;
- h) Realizar o ensaio de atividade de β-galactosidase e de alcalino fosfatase, seguindo o protocolo de Quillardet e Hofnung (1985);
- i) Calcular a razão entre a atividade de β-galactosidase/alcalino fosfatase, sendo maior que 1,5, considera-se atividade genotóxica.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem diversas técnicas para a avaliação da atividade genotóxica de um agente, sendo que uma mesma técnica pode ser aplicada com a mesma finalidade, seja avaliando uma um princípio ativo, efluente, metal pesado, nanopartículas, etc.

Dentre os métodos para avaliação genotóxica, destaca-se o teste de *A. cepa*, pois sua aplicabilidade é ampla na investigação de inúmeros agentes, baixo custo, fácil execução, dispensa autorização em Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e apresenta boa correlação quando comparado a testes realizados com animais.

A utilização de modelos biológicos para avaliação genotóxica apresenta-se complementar às avaliações químicas e físicas, uma vez que muitas substâncias podem estar presentes em baixas concentrações, dificultando a identificação de sua presença, todavia pode ser notada pelas células.

### 4. REFERÊNCIAS

ANCIA, J. P.; ROMÃO, N. F. Análise da atividade citotóxica e mutagênica do extrato aquoso das partes aéreas de *Uncaria tomentosa* em teste de *Allium cepa*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological.**, v. 3, n. 5, p.16-26, 2016.

ANACLETO, L. R.; ROBERTO. M. M., MARIN-MORALES, M. A. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. **Chemosphere.**, v. 173, p. 31-42, 2017.

BHAGAT, J.; S, G. S.; SHYAMA, S. K. Genotoxicity of Cerium Oxide Nanoparticle in Zebrafish and Green Mussel *Perna viridis* Using Alkaline Comet Assay. **LIFE: International Journal of Health and Life-Sciences.**, v. 4, n. 3, p. 118-127, 2019.

CARITÁ, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de Amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da Cidade de Santa Gertrudes – SP.** (Dissertação) Mestrado em Ciências Biológicas: Biologia Celular e Molecular - Universidade Estadual Paulista, 2010.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere.**, n. 72, p.722-725, 2008.

CHANDRA, S.; CHAUHAN, L. K.; MURTHY, R. C.; SAXENA, P. N.; PANDE, P. N.; GUPTA, S. K. et al. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Science of the Total Environment.**, v. 347, p. 46–52, 2005.

COSTA, V. M.; MONTEIRO, C. A. B.; BATISTA, N. J. C. Avaliação genotóxica e mutagênica de amostras de efluentes tratados por lagoas de estabilização em Teresina-Piauí. **Revista DAE.**, v. 66, n. 209, 2018.

DELMOND, K.A.; VICARI, T.; GUILOSKI, I.C.; DAGOSTIM, A. C.; VOIGT, C. L.; SILVA DE ASSIS, H. C. et al. Antioxidant imbalance and genotoxicity detected in fish induced by titanium dioxide nanoparticles (NpTiO<sub>2</sub>) and inorganic lead (PbII). **Environmental Toxicology and Pharmacology.**, v. 67, p. 42-52, 2019.

DUSINSKA, M.; MARIUSSEN, E.; RUNDÉN-PRAN, E.; HUDECOVA, A. M.; ELJE, E.; KAZIMIROVA, A. et al. In Vitro Approaches for Assessing the Genotoxicity of Nanomaterials. In: Zhang Q. (eds) Nanotoxicity. **Methods in Molecular Biology.**, v. 1894. Humana Press, New York, NY, 2019.

FATEH, A. H.; MOHAMED, Z.; CHIK, Z.; ALSALAH, A.; MD ZAIN, S. R.; ALSHAWSH, M. A. Mutagenicity and genotoxicity effects of *Verbena officinalis* leaves extract in Sprague-Dawley Rats. **Journal of Ethnopharmacology.**, v. 235, p. 88-99, 2019.

FERNANDES, J. F. N.; SILVA, B. S. S.; FONTES, R. M. S.; CÂNDIDO, W. P.; MALAVASI, N; V.; et al. Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico/genotóxico do látex de janaúba (*Synadenium grantii* Hook. f., Euphorbiaceae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde.**, v. 9, n. 1, p. 59-65, 2018.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas.**, v. 102, n.1, p. 99-112, 1985.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research.** Amsterdam, v. 197, p. 243-260, 1988.

FLORES-BACHO, M. G.; TAKAHASHI, C. S.; CASTILLO, W. O.; SARAIVA, M. C. P.; KÜCHLER, E. C.; MATSUMOTO, M. A. N. et al. Genotoxic effects in oral mucosal cells caused by the use of orthodontic fixed appliances in patients after short and long periods of treatment. **Clinical Oral Investigations**, *in press*, 2019.

GAJSKI, G.; ŽEGURA, B.; LADEIRA, C.; POURRUT, B.; DEL BO', C.; NOVAK, M. et al. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 1 Invertebrates). **Mutation Research-Reviews in Mutation Research.**, v. 779, p. 82–113, 2019.

GERIĆ, M.; GAJSKI, G. DOMIJAN, AM.; GARAJ-VRHOVAC, V.; FILIPIC, M.; ZEGURA, B. Genotoxic effects of neurotoxin β-N-methylamino-l-alanine in human peripheral blood cells. **Chemosphere.**, v. 214, p. 623-632, 2019.

GHOSH, M.; GHOSH, I.; GODDERIS, L.; HOET, P.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity of engineered nanoparticles in higher plants. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.**, *in press*, 2019.

GUERRERA, E.; DOMICINI, L.; LEVORATO, S.; VANNINI, S.; ACITO, M.; FATIGONI, C. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated particulate matter collected in underground workplaces. **Air Quality, Atmosphere & Health.**, p. 1-9, 2019.  
HARA, R.; MARIN-MORALES, M.A. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State - Brazil). **Chemosphere.**, v. 174, p. 321–330, 2017.

HELLEDAY, T.; ESHTAD, S.; NIK-ZAINAL, S. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. **Nature Reviews Genetics.**, v. 15, n. 9, p.585–598, 2014.

IQBAL, M.; ABBAS, M.; NISAR, J. NAZIR, A.; QAMAR, A. Z. Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: A review. **Chemistry International.**, v. 5, n. 1, p.1-80, 2019.

ITOH, S.; HATTORI, C. In vivo genotoxicity of 1,4-dioxane evaluated by liver and bone marrow micronucleus tests and Pig-a assay in rats. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.**, v. 837, p. 8-14, 2019.

KHAN, S.; ANAS, M. MALIK, A. Mutagenicity and genotoxicity evaluation of textile industry wastewater using bacterial and plant bioassays. **Toxicology Reports.**, v. 6, p. 193-201, 2019.

KASPER, N.; BARCELOS, R. P.; MATTOS, M.; BARONI, S.; et al. Impact of anthropic activities on eukaryotic cells in cytotoxic test. **Revista Ambiente & Água.**, Taubaté, v. 13, n. 3, 2018.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAMA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gel electrophoresis. **MMS Communication.**, v.3, p.103-115, 1995.

LACERDA, G. R. S.; CANTALICE, J. C. L.; LIMA, G. M. S.; ALBUQUERQUE, L. E. F. SILVA, I. DE. G.; MELO, M. E. B. et al. Genotoxic activity of l-asparaginase produced by *Streptomyces ansochromogenes* UFPEDA 3420. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.**, p. 35-41, 2019

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research.**, v. 692, p. 71-81, 2009.

LESSA, L. R.; CARIELLO, F. M. R. Adsorção do paracetamol em carvão ativado: regressão da citotóxicidade e mutagênicidade no sistema *Allium cepa*. **Revista Hórus.**, v. 12, n. 1, p. 44-54, 2017.

LIMAN, R., ACIKBAS, Y., & CIĞERCI, İ. H. (2019). Cytotoxicity and genotoxicity of cerium oxide micro and nanoparticles by *Allium* and Comet tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety.**, v. 168, p. 408–414, 2019.

LIMAN, R., CIĞERCI, İ. H., & GÖKÇE, S. Cytogenetic and genotoxic effects of Rosmaniric Acid on *Allium cepa* L. root meristem cells. **Food and Chemical Toxicology.**, v. 121, p. 444-449, 2018.

LOPES, R. M. **Avaliação de metodologias moleculares e citogenéticas para detectar níveis de deterioração em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e cevada (*Hordeum vulgare* L.).** (Tese) Doutorado em Botânica - Universidade de Brasília, 2016.

MACEDA, E. B.; GRISOLIA, A. B.; VAINI, J. O.; CANDIDO, L. S.; et al. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil. **Revista Ambiente & Água.**, v.10, n.1, 2015.

- MALINI, M.; MARIN-MORALES, M. A.; MANTOVANI, M. S.; JAMAL, C. M.; NATI, N.; PASSOS, T. S. et al. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. **Genetics and Molecular Biology.**, v.33, n.1, p.176-181, 2010.
- MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity evaluation of environmental pollutants using analysis of nucleolar alterations. **Environmental Science and Pollution Research.**, v. 22 n. 13, p. 9796-9806, 2015.
- MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; LEVY, C. E.; FONTANETTI, C. S.; MARIN-MORALES, M. A. Monitoring the natural attenuation of sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecological Indicators.**, v. 56, p. 60–69, 2015.
- MEDEIROS, I. U.; MEDEIROS, R. A.; BORTOLIN, R. H.; QUEIROZ, F. M.; SILBIGER, V. N.; PFLUGMACHER, S. et al. Genotoxicity and pharmacokinetic characterization of *Cereus jamacaru* ethanolic extract in rats. **Bioscience Reports.**, v. 39, n. 1, 2019.
- MELLO, M. L. S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura.**, v. 30: p. 665-676, 1978.
- MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; ZAN, R. A.; POLETTO, P. O.; RAMOS, L. J. et al. Adaptação da técnica de micronúcleo em *Allium cepa*, para futuras análises de mutagenicidade dos rios da região do vale do Jamari, Rondônia, Amazônia ocidental. **Revista Pesquisa & Criação.**, v.10, n.2, p.181-187, 2011.
- MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; ZAN, R. A.; RAMOS, L. J.; et al. Adaptation of the micronucleus technique in *Allium cepa*, for mutagenicity analysis of the Jamari river valley, western Amazon, Brazil. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology.**, v.2, n.2, 2012.
- MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A.; SILVA, J. B.; SILVA, R. P.; PAGOTTO, R. C.; FACUNDO, V. A. Análise Citotóxica e Mutagênica do Extrato Aquoso de *Maytenus guyanensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico. **Ciência e Natura.**, v. 36, n. 3, p. 301-309, 2014.
- MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A.; SILVA, F. C.; PASSARINI, G. M.; FACUNDO, J. B.; PAGOTTO, R. C. et al. Análise de genotoxicidade aguda *in vivo* do extrato aquoso de *Maytenus guyanensis* Chichuá amazônico. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v. 25, n. 2, p. 164-169, 2015.
- OLIVEIRA, J. M.; YAMASHITA, M.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do Potencial Mutagênico em Afluentes do Rio Boa Vista Influenciados Pela Emissão de Rejeitos de Uma Indústria de Laticínios no Município de Ouro Preto do Oeste RO, Brasil. In: **VIII Jornada Científica Centro de Estudos Interdisciplinar em Desenvolvimento Sustentável da Amazônia**. E-book VIII Jornada Científica do CEDSA, v. 8, p. 73-88, 2013.
- OUANES-BEN OTHMEN, Z.; BARKA, S.; ADELJELIL, Z.B.; MOUELHI, S.; KRIFA, M.; KILANI, S. et al. In situ genotoxicity assessment in freshwater zooplankton and sediments from different dams, ponds, and temporary rivers in Tunisia. **Environmental Science and Pollution Research.**, v. 26, p. 1435–1444, 2019.
- PAIVA, J. G. A; FANK-DE-CARVALHO, S. M.; MAGALHÃES, M. P.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botânica Brasileira.**, v. 20, n. 2, p. 257-264, 2006.

PALSIKOWSKI, P. A.; ROBERTO, M. M.; SOMMAGGIO, L. R. D.; SOUZA, P. M. S.; MORALES, A. R. ; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicity Evaluation of the Biodegradable Polymers PLA, PBAT and its Blends Using *Allium cepa* as Test Organism. **Journal of Polymers and the Environment.**, v. 26, p. 938–945, 2017.

PEREIRA JÚNIOR, J. L. **Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico da Lagoa do Armazém, da Custódia, do Gentil, TEDUT e da Laguna Tramandaí através do teste de micronúcleo em *Allium cepa*.** (Monografia) Bacharelado em Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista brasileira de Biociências.**, v.7, n.2, p.155-159, 2009.

QUADRA, G. R., ROLAND, F., BARROS, N., MALM, O., LINO, A. S., AZEVEDO, G. M., et al. Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. **Chemosphere**, v. 215, p. 753-757, 2018.

QUILLARDET, P.; HOFNUNG, M. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects.**, v. 147, n. 3, p. 65–78, 1985.

RAJAPAKSHA, R. P. N. H.; WIJAYARATHNA, C. D. Determination of genotoxicity of aqueous extracts of *Flueggea leucopyrus* willd. (Katupila) using the optimized “Alkaline Comet Assay”. **Pharmaceutical Journal of Sri Lanka.**, v. 7, p. 23–33, 2017.

ROBERTO, M. M.; JAMAL, C. M.; MALASPINA, O.; MARIN-MORALES, M. A. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source using *Allium cepa* test system. **Genetics and Molecular Biology.**, v. 39, n. 2, p. 257-269, 2016.

SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R., SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research.**, v. 175, 1988.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

VANUCHI, V. C. F.; SOUZA, A. S. H; SILVA, J. R.; BAPTISTA, J. A. A.; MENEGUETTI, D. U. O.; ZAN, R. A. Análise do potencial mutagênico em afluentes do rio Ji-Paraná influenciados pela emissão de rejeitos de uma indústria de laticínios e um curtume no município de Presidente Médici – RO, Brasil. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological.**, v. 2, n. 1, p. 68-73, 2015.

WOLFF, F. R.; BROERING, M. F.; JURCEVIC, J. D.; ZERMIANI, T.; BRAMORSKI, A.; VITORINO, J. C. et al. Safety assessment of *Piper cernuum* Vell. (Piperaceae) leaves extract: Acute, sub-acute toxicity and genotoxicity studies. **Journal of Ethnopharmacology.**, v. 230, p. 109-116, 2019.

ZHANG, A.; JIA, A.; PARK, M.; LI, Y.; SNYDER, S.A. Genotoxicity assay and potential byproduct identification during different UV-based water treatment processes. **Chemosphere.**, v. 217, p. 176-182, 2018.

## A UTILIZAÇÃO DO SISTEMA TESTE DE *Allium cepa* PARA ANÁLISE MUTAGÊNICA DE RIOS DA AMAZÔNIA

Hémilly Caroline da Silva Paixão<sup>1</sup>, Sérgio Luiz Prolo Júnior<sup>1</sup>, Renato André Zan<sup>2</sup>,  
Romeu Paulo Martins Silva<sup>1</sup>, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti<sup>1,2</sup>

1. Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Rio Branco, Acre, Brasil;
2. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Ji-paraná, Rondônia, Brasil.

### RESUMO

O sistema teste de micronúcleo em raízes da espécie *Allium cepa* (cebola), é definido como sendo um dos melhores para estudos de monitoramento ambiental e mutagenicidade de água, por sua sensibilidade e exatidão. O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura demonstrando os principais procedimentos para a análise mutagênica de águas superficiais de rios amazônicos através do sistema teste *Allium cepa*. A análise mutagênica de águas superficiais empregando *A. cepa* não necessita de equipamentos elaborados, reagente com elevado valor, a matéria prima é encontrada facilmente e durante todo o ano, e não exige aprovação em Comitês de Ética e Pesquisa em Seres Humanos ou em Animais.

**Palavras-chave:** Genotoxicidade, Toxicologia e Métodos de análise.

### ABSTRACT

The micronucleus test system in roots of the *Allium cepa* (onion) species is defined as being one of the best for environmental monitoring and water mutagenesis studies because of its sensitivity and accuracy. The present study aimed to perform a literature review demonstrating the main procedures for the mutagenic analysis of surface waters of Amazonian rivers through the *Allium cepa* test system. The mutagenic analysis of surface water using *A. cepa* does not require elaborate equipment, reagent with high value, the raw material is easily found and throughout the year, and does not require approval in Ethics and Research Committees in Humans or Animals.

**Key words:** Genotoxicity, Toxicology and Analysis methods.

## 1. INTRODUÇÃO

A hidrografia da região amazônica é a maior, e uma das mais importantes do mundo, concentrando cerca de 15% das águas doces superficiais não congeladas do planeta (SNIF, 2014; NETO; FURTADO, 2015). Formada por grandes rios e pequenos igarapés que correspondem a 81% das águas superficiais do território nacional, a rede hidrográfica

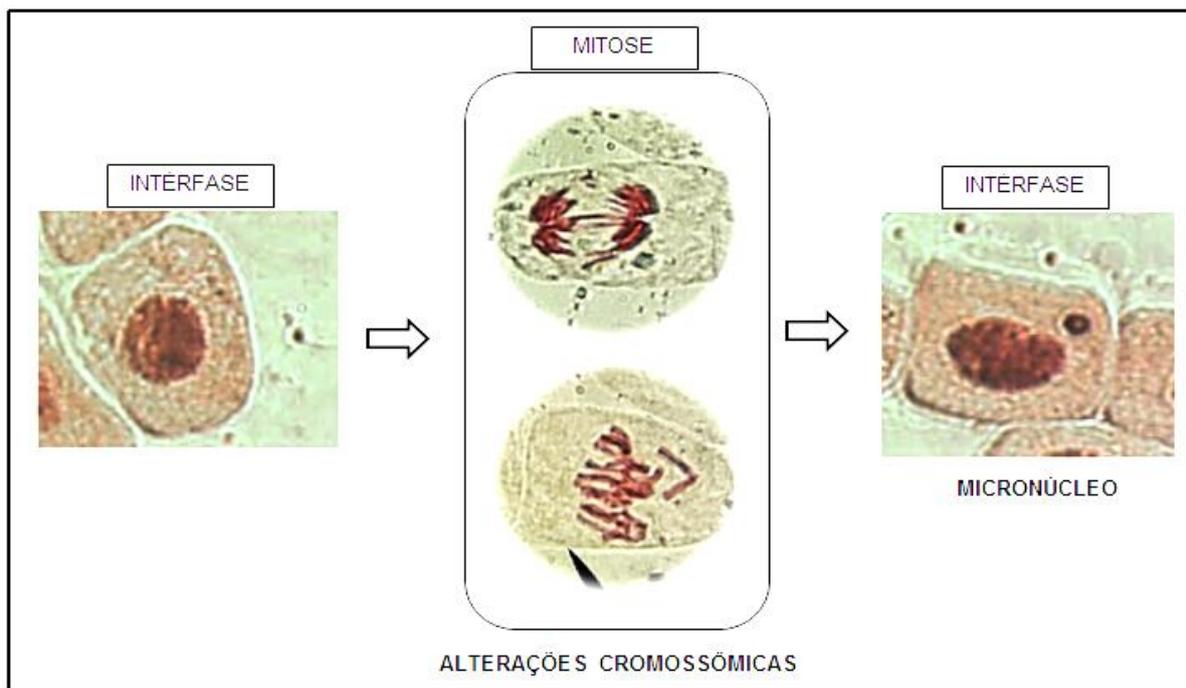
da Amazônia é responsável pelo abastecimento de centenas de cidades e milhares de pessoas (SNIF, 2014; SILVA; NODA, 2016).

O crescimento da urbanização e das fronteiras agrícolas, que têm ocorrido ao longo dos anos, causam prejuízos a rios e igarapés devido exposição a dejetos humanos, agrotóxicos, excretas de laticínios, frigoríficos e, várias outras empresas, que despejam efluentes nestes mananciais, muitas vezes, sem um tratamento prévio (SINGH et al., 2014). Conseqüentemente, o consumo e a utilização dessas águas contaminadas, podem levar a intoxicações e até mesmo mutações, apresentando o potencial de desencadear a curto e longo prazo sérios problemas de saúde (MAZZEO; MARIN-MORALES, 2015).

As substâncias mutagênicas podem causar danos celulares aos organismos vivos que estão frequentemente expostos a estas, danos que geralmente são induzidos por agentes físicos, químicos ou biológicos que acabam afetando processos como a transcrição e duplicação gênica e alterações cromossômicas, o que leva a processos cancerosos e morte celular (MENEGUETTI et al., 2012; HARA; MARIN-MORALES, 2017; QUADRA et al., 2018). Compostos que causam lesões nos materiais genéticos são conhecidos como genotóxicos (IQBAL et al., 2019)

Os efeitos mutagênicos podem ser observados por meio da formação de micronúcleos, que são pequenos corpos contendo ácidos desoxirribonucleicos (DNA), localizados no citoplasma (SILVA ET AL., 2011; FATEH et al., 2019). Micronúcleos podem ser resultantes de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou com sequências de cromossomos inteiros que não se prendem ao fuso mitótico e, dessa forma, não chegam aos polos das células durante a mitose ou a meiose (Figura 1) (POLLETO et al., 2011; MENEGUETTI et al., 2012; ZHANG et al., 2018).

O teste de micronúcleos detecta mutagênese em organismos eucariotos do tipo clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico (MILLER, 1973; HARA; MARIN-MORALES, 2017). Os micronúcleos são identificados em qualquer tipo de célula, sendo possível aplicar seu uso em análises para diagnóstico de doenças hematológicas, em células epiteliais da boca, do trato urinário e também monitorar ambientes através de testes com roedores e plantas (FENECH, 1993; FÃO et al., 2012; DUSINSKA et al., 2019). Para que o micronúcleo seja visualizado é necessário uma divisão celular após a ocorrência mutagênica, a realização do cultivo celular, ou uso de células que estão se multiplicando constantemente, como a medula óssea e as raízes vegetais (meristemas) (SILVA et al., 2012; PALSIKOWSKI et al., 2017).



**Figura 1.** Célula em divisão mitótica e formação de micronúcleos.  
 Fonte: Elaborado pelos autores

O sistema de teste de micronúcleo em raízes da espécie *Allium cepa* (cebola), é definido como sendo um dos melhores para estudos de monitoramento ambiental e mutagenicidade de água, por sua sensibilidade e exatidão (SILVA et al., 2003; COSTA; MONTEIRO; BATISTA, 2018). As raízes da *A. cepa* possuem processo de divisão celular similar aos do homem, e devido à universalidade do código genético, se um agente pode causar danos ao DNA, apresenta potencial genotóxico em qualquer tipo de célula animal, vegetal ou microrganismos (COSTA; MENK, 2000; GAVRONSKI, 2008; ROBERTO et al., 2016).

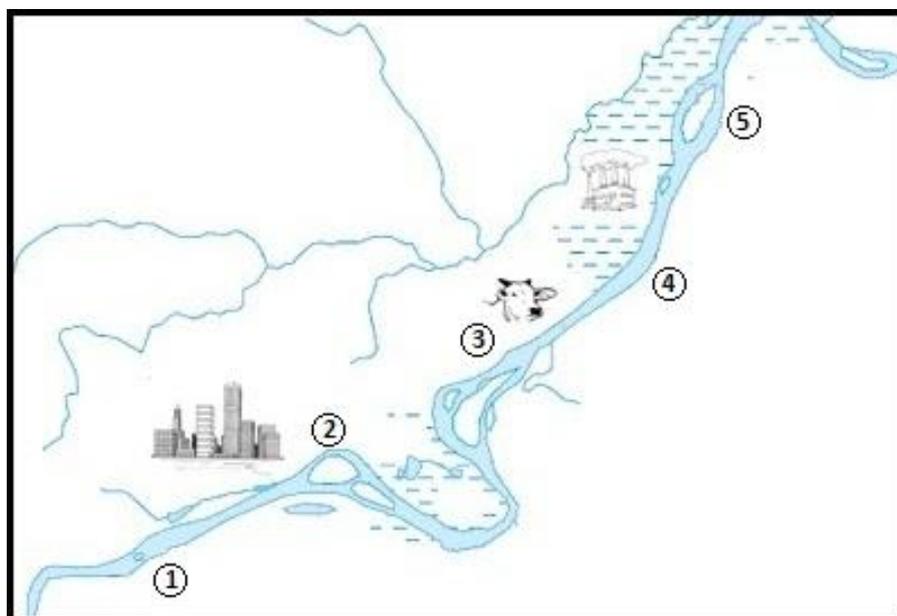
Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura, demonstrando os principais procedimentos para a análise mutagênica de águas superficiais de rios amazônicos através do sistema teste *Allium cepa*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 COLETAS DAS AMOSTRAS

As coletas devem ser realizadas em pontos estratégicos, antes e após algumas possíveis causas de interferência na qualidade dos rios, podem ser locais de despejo de

dejetos humanos ou animais, frigoríficos, laticínios, cidades, conjuntos habitacionais dentre outros. Um exemplo de pontos de coletas pode ser observado na (Figura 2).



**Figura 2.** Mapa demonstrando os pontos 1, 2, 3, 4 e 5 indicados para a coleta, em um determinado rio.

Fonte: Elaborado pelos autores

O ponto 1, da figura acima, ou a nascente do rio podem ser utilizados como controle negativo, porém é importante utilizar um segundo controle negativo contendo água mineral, para utilizar como parâmetro de comparação com o controle do ponto 1.

Em alguns casos, é indicada também a utilização de um controle positivo, contendo agentes mutagênicos, esse controle é importante para demonstrar a gravidade da poluição em casos de resultados com significância estatística alta.

As amostras poderão ser coletadas em dois períodos do ano, no de estiagem e de chuva, para observar se há variação nos resultados ao comparar o período da cheia com o período da seca em rios ou igarapés.

As coletas de água são, geralmente, feitas na calha central do rio na profundidade de 15 a 30 cm (CETESB, 1988). O balde normalmente utilizado para amostragem na superfície de corpos d'água (Figura 3), em geral, deve estar acoplado a uma corda e ser confeccionado em aço inox AISI 316L polido, para evitar incrustações nas costuras de solda, e apresentar volume adequado para a finalidade da amostragem (CETESB; ANA, 2011).

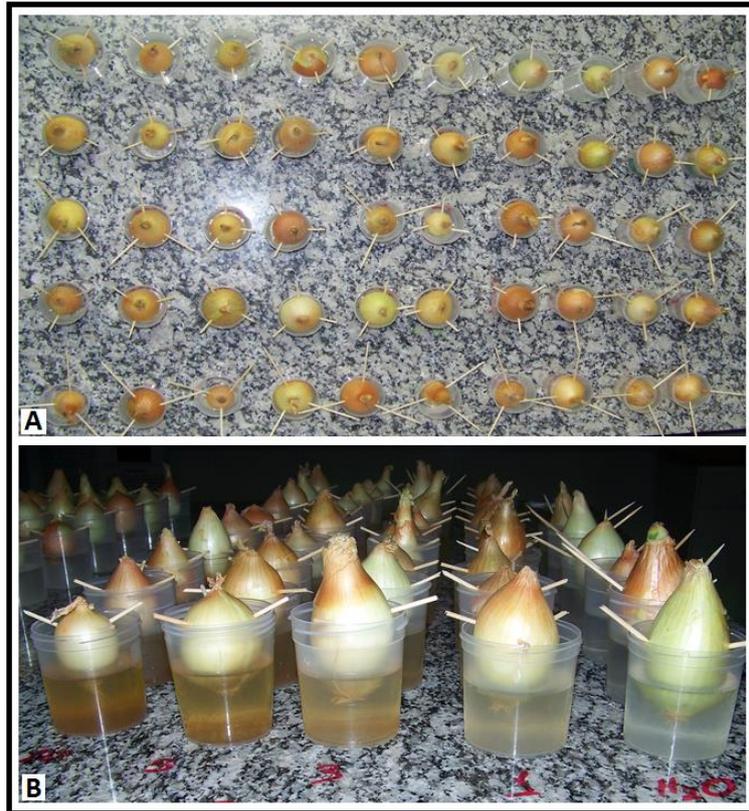


**Figura 3.** Coleta de águas superficiais com auxílio de balde inox acoplado a corda.  
Fonte: Arquivo pessoal

Os recipientes mais utilizados para coleta e preservação de amostras são os de plástico autoclavável de alta densidade (polietileno, polipropileno, policarbonato ou outro polímero inerte) e os de vidro, com boca larga (mais ou menos 4 cm de diâmetro) para facilitar a coleta da amostra e a limpeza. As amostras deverão ser transportadas e mantidas sob refrigeração em torno de  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (CETESB; ANA, 2011).

## 2.2 GERMINAÇÃO DOS MERISTEMAS UTILIZANDO BULBOS DE *Allium cepa*

O experimento utiliza a espécie *Allium cepa*, (conhecida popularmente como cebola de cabeça) de tamanho pequeno, uniforme, de mesma origem (de preferência orgânica), não germinadas e saudáveis, sendo realizadas repetições de 10 espécimes por ponto de coleta (Figura 4a), postos a germinar em frascos transparentes de 50 ml (copos descartáveis ou coletores de fezes) com a parte inferior mergulhada nas águas coletadas (Figura 4b).

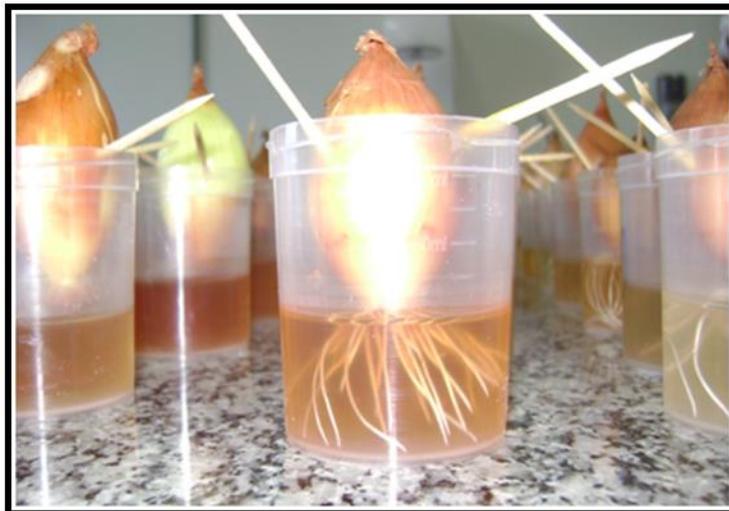


**Figura 4.** Germinação de *A. cepa*.  
Fonte: Meneguetti et al. (2012)

### 2.2.1 Preparo das lâminas

As seguintes etapas são adaptações propostas por Meneguetti et al. (2012):

Em torno de 72h após o início do teste, os meristemas são coletados com aproximadamente 0,5 a 3,0 cm de comprimento (Figura 5), sendo lavados em água destilada.



**Figura 5.** Meristemas germinados  
Fonte: Meneguetti et al. (2012)

- a) Para o preparo de 1 litro de solução 0,1 N de HCl, deve-se transferir 8,36 mL de HCl concentrado e diluir a 1000 mL;

Fórmula para preparo de solução HCL 1 N - Adicionar 3,65g de HCl em um litro de solução, 0,1 N = 0,1 Normal = 0,1 equivalente-grama/L = 0,1 eq-g/L , equivale a 3,65g de HCl em 1 L de solução.

A questão é como realizar este procedimento quando não é possível pesar o HCl?

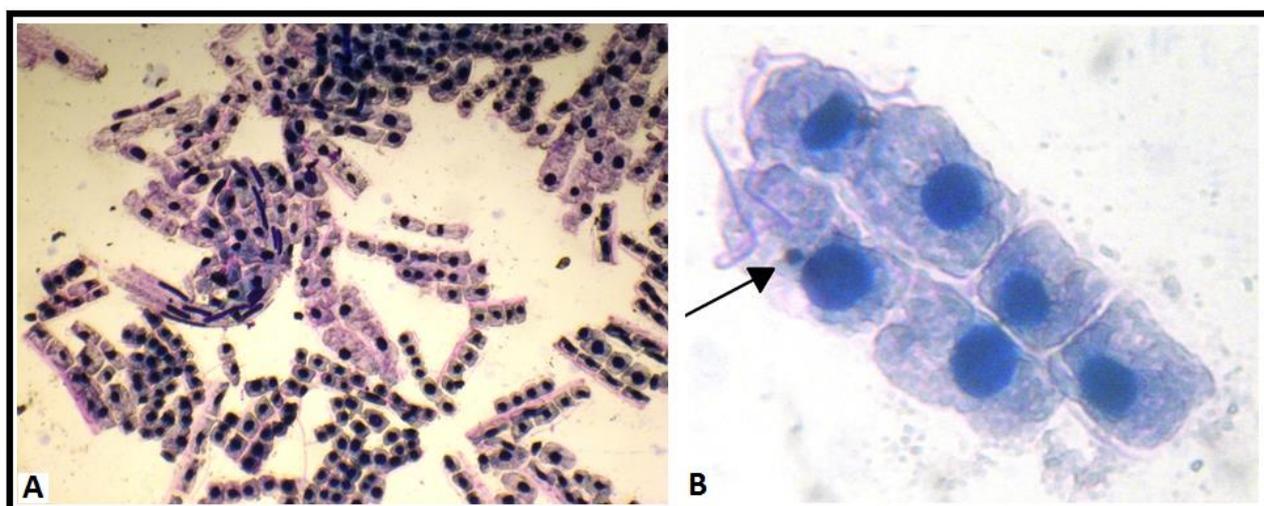
Para isso, são necessárias algumas informações, pois normalmente essa substância é feita a partir de uma solução concentrada de HCl. Informações:

- HCl Fumegante.
- Concentração de HCl = 37%
- Densidade = 1,18 g/mL
- Mol do HCl = 36,5.

Se a densidade é 1,18 g/mL, é possível concluir que 1000 mL = 1180 g. Como a concentração é 37%, deve-se calcular a massa de HCl na solução utilizando uma regra de três:

- $c(\%) = (m \text{ HCL} \times 100) / m \text{ sol}$
  - $c(\%) = \text{concentração porcentual} = 37\%$
  - $m \text{ HCl} = \text{massa de HCl} = \text{valor procurado}$
  - $m \text{ sol} = \text{massa total da solução} = 1,18$
  - $\text{kg mHCl} = c(\%) \times m \text{ sol} / 100 = 37 \times 1,18 / 100 = 0,4366 \text{ kg ou } 436,6 \text{ g de HCl por litro de solução.}$
  - $n \text{ equivalentes} = 436,6 / 36,5 = 11,96 \text{ equivalentes gramas de HCl}$
  - Então a solução é 11,96 N
  - $M_1 V_1 = M_2 V_2$
  - $V_1 = M_2 V_2 / M_1 = 0,1 \times 1000 / 11,96 = 8,36 \text{ mL ;}$
- b) Inserir os meristemas coletados em tubos de ensaio e adicionar 1N HCL até uma quantidade em que os meristemas estejam cobertos;

- c) Hidrolisar os meristemas com 1N HCL por 10 minutos em banho-maria a 60 °C e posteriormente resfriar os tubos em água corrente;
- d) Lavar os meristemas com água destilada;
- e) Realizar esfregaços em duas lâminas por bulbo, sendo postas em seguida em gelo seco por 1 minuto para retirada da lamínula e deixado por 30 minutos em temperatura ambiente para secagem;
- f) Corar com o kit Panótico rápido LB mergulhando as lâminas 10 vezes em cada recipiente com a duração da imersão de 1 segundo na seguinte ordem: triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e tiazina a 0,1%;
- g) Lavar as lâminas com água deionizada pH 7,0. Secar em temperatura ambiente;
- h) Visualizar ao microscópio de Luz na objetiva de 40x;
- i) Em cada lâmina serão contadas mil células em interfase e a quantidade de micronúcleos por mil células (Figura 6).



**Figura 6.** A – Células de *A. cepa* (ocular: 10x, objetiva 10x), B – Micronúcleo em célula de *A. cepa* (ocular: 10x, objetiva 40x).  
 Fonte: Meneguetti et al. (2012)

### 2.3 GERMINAÇÃO DOS MERISTEMAS UTILIZANDO SEMENTES DE *Allium cepa*

O uso das sementes de *A. cepa* fornece maior praticidade na realização de experimentos devido ocuparem menor espaço, não desprender odor intenso no local em que estão inseridas, de simples manuseio e facilidade de obtenção com boa qualidade e livre de agroquímicos (LESSA; CARIELLO, 2017; FERNANDES et al., 2018).

### 2.3.1 Preparo das lâminas

Será descrito, a seguir, uma adaptação desta técnica utilizando as sementes de *A. cepa*:

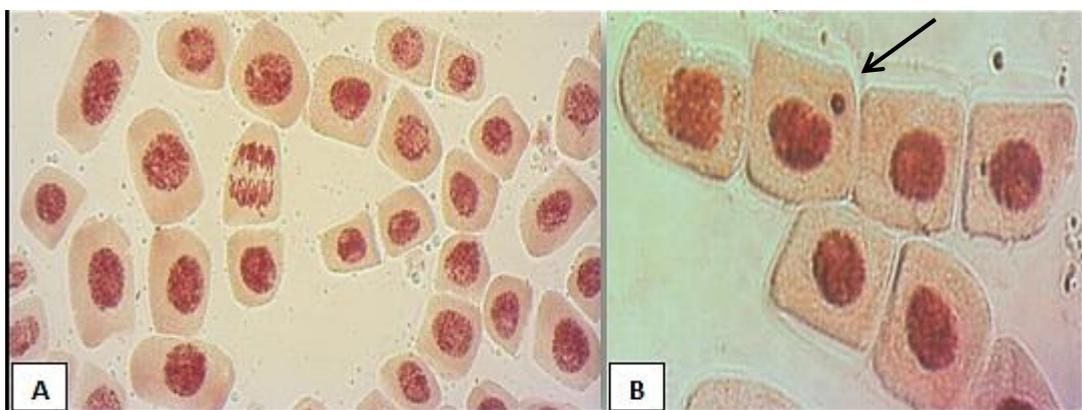
- a) Colocar sementes de *A. cepa* da variedade Baia Periforme em uma placa de Petri revestida com papel filtro (Figura 7). Cerca de 50 sementes por placa e duas placas para cada tratamento;



**Figura 7.** Sementes de *A. cepa*  
Fonte: Arquivo pessoal

- b) Submeter as sementes à germinação, sob temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , utilizando como meio as amostras (água coletada e controle);
- c) Utilizar como Controle Negativo, água mineral e/ou a nascente do rio/Igarapé;
- d) Aplicar 3 ml das amostras e controle correspondentes, diariamente, utilizando pipeta Pasteur e manter a placa Petri fechada;
- e) Preparo da orceína acética a 2% (100 ml) para fixar e corar os meristemas - usar um béquer de 250 ml e colocar 100 ml de ácido acético 45%. Colocar o béquer no agitador magnético e adicionar 2,0 g de orceína. Deixar agitando por 10 minutos, filtrar a solução utilizando papel filtro e guardar em frasco fechado em temperatura ambiente;

- f) Coletar os meristemas com 1 a 2 cm de comprimento e colocar em tubos de ensaio ou Eppendorf previamente identificados com a amostra correspondente;
- g) Com auxílio de uma pipeta Pasteur, inserir no tubo/Eppendorf a orceína acética até uma quantidade em que os meristemas estejam cobertos, armazenar na geladeira (2 a 8 ° C) no período de 12 a 24 horas para fixação;
- h) Colocar os meristemas em lâminas, seccionar a porção apical (mais escura) e eliminar o restante do material;
- i) Posicionar uma lâmina limpa sobre a bancada e pingar, sobre ela, 3 gotas de orceína acética a 2%;
- j) Cobrir com uma lamínula e segurar a lâmina sobre a chama (bico de Bunsen/vela), a cerca de 5 cm de distância, por cerca de 3 segundos. Repetir esse procedimento por 3 vezes com intervalos de 3 segundos. Se houver necessidade acrescentar mais uma gota de orceína na borda da lamínula.
- k) Esmagar a ponta do meristema pressionando levemente a lamínula com a ponta da pinça. Atenção: cuidado para não deslocar a lamínula do lugar. A pressão deve ser suficiente para esmagar as raízes sem quebrar a lamínula.
- l) Retirar o excesso de orceína lático/acética colocando a lâmina entre um pedaço de papel filtro dobrado e passando o dedo sobre ele;
- m) Analisar a lâmina em microscópio de luz, utilizando a objetiva de 100x;
- n) Tirar fotos das lâminas em objetivas de 20x ou 40x (Figura 8) utilizando software de processamento e análise de imagens digitais;
- o) Utilizar contador de células para quantificar 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina e 5 lâminas por cada placa de Petri.



**Figura 8.** A – Células de *A. cepa* coradas com orceína acética 2% (ocular: 10x, objetiva 20x), B – Micronúcleo em célula de *A. cepa* (ocular: 10x, objetiva 40x).

Fonte: Arquivo pessoal

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste caso é utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA), que é um procedimento paramétrico para analisar três ou mais tratamentos. Esse teste especifica se ocorreu diferença estatística significativa entre os postos, porém ele não especifica entre quais pontos ocorreu essa diferença, por esse motivo utiliza-se também o teste Tukey, que pode ser considerado como uma extensão do ANOVA.

Para essa análise são utilizados vários softwares, sendo indicado o Graphad Prism 5.0 para as pessoas que utilizam Windows XP, e a versão 6.0 para Windows 7, e outros sistemas operacionais.

## 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise mutagênica de águas superficiais empregando *A. cepa* não necessita de equipamentos elaborados, reagente com elevado valor, a matéria prima é encontrada facilmente e durante todo o ano, e não exige aprovação em Comitês de Ética e Pesquisa em Seres Humanos ou em Animais.

O sistema teste de *A. cepa* dispõe de aplicações e adaptações diversificadas que contribuem positivamente na elaboração de experimentos. As técnicas que fazem uso desse sistema são regularmente aprimoradas garantindo satisfatória reprodutibilidade e contribuição científica.

## 4. REFERÊNCIAS

CETESB. Companhia de Tecnologia Ambiental do estado de São Paulo. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. São Paulo, CETESB, 1988.

CETESB. Companhia de Tecnologia Ambiental do estado de São Paulo. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; São Paulo: CETESB; Brasília; ANA, 2011.

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, p. 24-26, 2000.

COSTA, V. M.; MONTEIRO, C. A. B.; BATISTA, N. J. C. Avaliação genotóxica e mutagênica de amostras de efluentes tratados por lagoas de estabilização em Teresina-Piauí. **Revista DAE**, v. 66, n. 209, 2018.

DUSINSKA, M.; MARIUSSEN, E.; RUNDÉN-PRAN, E.; HUDECOVA, A. M.; ELJE, E.; KAZIMIROVA, A. et al. In Vitro Approaches for Assessing the Genotoxicity of

Nanomaterials. In: Zhang Q. (eds) Nanotoxicity. **Methods in Molecular Biology**, v. 1894. Humana Press, New York, NY, 2019.

FÃO, F.; ZAN, R.A.; BRONDANI, F.M.M.; RAMOS, L.J.; MENEGUETTI, D.U.O. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia ocidental. **Revista de Saúde e Biologia - Sabios**, v.7, n.1, p.91-98, 2012.

FATEH, A. H.; MOHAMED, Z.; CHIK, Z.; ALSALAH, A.; MD ZAIN, S. R.; ALSHAWSH, M. A. Mutagenicity and genotoxicity effects of *Verbena officinalis* leaves extract in Sprague-Dawley Rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 235, p. 88-99, 2019.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutation Research**, v. 285, p.35-44, 1993.

FERNANDES, J. F. N.; SILVA, B. S. S.; FONTES, R. M. S.; CÂNDIDO, W. P.; MALAVASI, N.; V.; et al. Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico/genotóxico do látex de janaúba (*Synadenium grantii* Hook. f., Euphorbiaceae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 1, p. 59-65, 2018.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, v. 197, p. 243-260, 1988.

GAVRONSKI, L. **Avaliação da Mutagênicidade de Amostras de Água do Rio dos Sinos através do Teste *Allium cepa***. Dissertação (Mestrado em Toxicologia Aplicada) - Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2008.

HARA, R.; MARIN-MORALES, M.A. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State - Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p. 321–330, 2017.

IQBAL, M.; ABBAS, M.; NISAR, J. NAZIR, A.; QAMAR, A. Z. Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: A review. **Chemistry International**, v. 5, n. 1, p.1-80, 2019.

LESSA, L. R.; CARIELLO, F. M. R. Adsorção do paracetamol em carvão ativado: regressão da citotoxicidade e mutagênicidade no sistema *Allium cepa*. **Revista Hórus**, v. 12, n. 1, p. 44-54, 2017.

MALINI, M.; MARIN-MORALES, M. A.; MANTOVANI, M. S.; JAMAL, C. M.; NATI, N.; PASSOS, T. S. et al. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p.176-181, 2010.

MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity evaluation of environmental pollutants using analysis of nucleolar alterations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22 n. 13, p. 9796-9806, 2015.

MENEGUETTI, D.U.O.; DA SILVA, F.C.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J. Adaptation of the micronucleus technique in *Allium cepa*, for mutagenicity analysis of the Jamari river valley, western Amazon, Brazil. **Journal of Environmental and Analytical Toxicology**, v. 2, n.127, 2012.

MILLER, R.C. **The Micronucleus Test as an *in Vivo* Cytogenetic Method**. Environmental Health Perspectives. Institute for Medical Research Camden, New Jersey, 1973.

NETO, F. R.; FURTADO, L. G. A ribeirividade amazônica: algumas reflexões. **Cadernos de Campo**, n. 24, p.158-182, 2015.

PALSIKOWSKI, P. A.; ROBERTO, M. M.; SOMMAGGIO, L. R. D.; SOUZA, P. M. S.; MORALES, A. R. ; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicity Evaluation of the Biodegradable Polymers PLA, PBAT and its Blends Using *Allium cepa* as Test Organism. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, p. 938–945, 2017.

PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 2, p. 155-159, 2009.

POLETTI, P. O.; DINIZ, A. P.; BERNARDON, B.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J.; MENEGUETTI, D.U.O. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (Mart. Ex Benth. J. F. Macbr: Fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*. **Revista Pesquisa & Criação**, v.10, n.1, p.163-175, 2011.

QUADRA, G. R., ROLAND, F., BARROS, N., MALM, O., LINO, A. S., AZEVEDO, G. M., et al. Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. **Chemosphere**, v. 215, p. 753-757, 2018.

ROBERTO, M. M.; JAMAL, C. M.; MALASPINA, O.; MARIN-MORALES, M. A. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source using *Allium cepa* test system. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 257-269, 2016.

SILVA, J.; EDRTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p.158-159, 2003.

SILVA, F. C.; BARROS, M.A.B.; VIANA, R.R.; ROMÃO, N.F.; OLIVEIRA, M.S.; MENEGUETTI, D.U.O. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 1, p.13-22, 2011.

SILVA, A.M.; SOUZA, A.M.; MACIEL, F. P.; DINIZ, A.P.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J.; BARBOSA, N.V. et al. Analysis Physical-Chemical, Mutagenic and Antimutagenic of *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae: Rubioideae) Noni, Germinated in the Region of Brazilian West Amazon. **Open Access Scientific Reports**, v. 1, n. 569, 2012.

SILVA, S. H.; NODA, S. N. A dinâmica entre as águas e terras na Amazônia e seus efeitos sobre as várzeas. **Ambiente e Água**, v. 11, n. 2, p. 378-386, 2016.

SINGH, M.; DAS, A.; SINGH, D.; MAITI, P.; SHABBIR, M.; DAS, A. High genotoxicity of shipyard contaminants on *Allium cepa* and calf thymus DNA. **Environmental Chemistry Letters**, v. 12, p. 321-327, 2014.

SNIF. Sistema Nacional de Informações Florestais. **Os Biomas e suas florestas**. Brasília, 2014. Disponível em: florestal.gov.br

ZHANG, A.; JIA, A.; PARK, M.; LI, Y.; SNYDER, S.A. Genotoxicity assay and potential byproduct identification during different UV-based water treatment processes. **Chemosphere**, v. 217, p. 176-182, 2018.

## ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE RIOS, POÇOS E ÁGUAS EM GERAL

Stephanie Jedoz Stein<sup>1</sup>, Andrômeda Serpa Hermano de Souza Zan<sup>1</sup> e Renato André Zan<sup>1</sup>

1. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Ji-Paraná, Rondônia, Brasil.

### RESUMO

Este capítulo propõe algumas alternativas do uso da água como tema central de pesquisa, apresentando algumas alternativas de estudo que podem ser executadas tanto para pesquisas mais curtas ou que demandem um tempo maior de investigação.

**Palavras-chave:** Análise, qualidade da água e potabilidade.

### ABSTRACT

This chapter proposes some alternatives to water use as a central research topic, presenting some study alternatives that can be performed for shorter or longer research.

**Key words:** Analysis, water quality and potency

## 1. INTRODUÇÃO

A terra possui aproximadamente 1,4 milhões de quilômetros cúbicos de água, mas apenas 2,5% desse total, são de natureza doce, sendo que os rios, lagos e reservatórios de onde a humanidade retira o que consome só correspondem a 0,26% desse percentual, surgindo então, a necessidade de preservação dos recursos hídricos. Em todo mundo, cerca de 10% da água disponibilizada para consumo são destinados ao abastecimento público, 23% para a indústria e 67% para a agricultura. O Brasil é um país privilegiado no que diz respeito à quantidade de água. Tem a maior reserva de água doce do planeta, com mais ou menos 12% do total mundial (ZAN et al., 2013).

A bacia amazônica representa a maior extensão de florestas tropicais da Terra, exercendo significativa influência no clima local e global, devido aos fluxos de energia e água na atmosfera. Presume-se que alteração dos ciclos da água, energia solar, carbono e nutrientes, resultantes da mudança no uso da terra na Amazônia possam provocar,

consequências climáticas e ambientais em escalas local, regional e global (ZAN et al., 2012).

Entre as diferentes maneiras de se adquirir água para consumo, podemos destacar as águas subterrâneas provenientes de poços rasos (1 a 20 metros de profundidade) artesianos (acima de 20 metros de profundidade) e as águas superficiais oriundas de rios, lagos e lagoas. Todos esses tipos de abastecimento geram preocupação, principalmente por alguns ficarem muito próximo de locais onde são descartados dejetos humanos, sendo a coleta de amostras de água em campo importante para a realização de programa de monitoramento de qualidade de água (CETESB,1987).

Existem várias doenças que podem ser propagadas pela água como, por exemplo, hepatite A e Poliomielite, doenças diarréicas como verminoses, amebíase, giardíase, cólera, febre tifóide, salmonelose. A poluição dos corpos hídricos indica que as águas não estão sendo utilizadas corretamente, e que uma das fontes de contaminação que altera a qualidade da água são os esgotos domésticos, isso é preocupante, pois o consumo de água contaminada por microrganismos tem sido associado a vários problemas de saúde, principalmente em pessoas que tem baixa resistência como idosos e crianças menores de cinco anos (ZAN et al., 2012).

Com base de todos esses dados, este capítulo propõe algumas alternativas do uso da água como tema central de pesquisa, apresentando algumas alternativas de estudo que podem ser executadas tanto para pesquisas mais curtas ou que demandem um tempo maior de investigação.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Vários projetos de pesquisas podem ser trabalhados com o enfoque em água, dentre elas vamos abordar algumas propostas, onde sabemos que não são as únicas e muitas outras ideias podem ser levantadas levando-se em conta esse tema.

O capítulo tratara das seguintes sugestões metodológicas de pesquisa em água:

- Avaliação da qualidade de águas de poços rasos, comuns e artesianos em cidades, bairros, vilas ou localidades em geral.

- Avaliação da qualidade de águas minerais comercializadas nas cidades, localidades em geral ou utilizadas em escolas, hospitais ou repartições em geral.
- Avaliação da qualidade das águas superficiais de rios, lagos, córregos em geral ou de abastecimento de cidades e localidades.

Em todas as propostas sugeridas deve-se ressaltar que boa parte das análises de água, tanto físico-químicas quanto microbiológicas serão semelhantes para todas, o que diferencia é o enfoque (resultados e discussões) que será dado ao tema, por se tratarem de pesquisas e públicos diferentes.

Quando se escolhe como tema de pesquisa avaliar a qualidade da água de poços tanto rasos, comuns ou artesianos, ou mesmo a água fornecida pelas empresas de saneamento deve-se deter em alguns pontos para se iniciar a mesma, como:

- a) Avaliar a área, localidade ou cidade que vou pesquisar? Como dividi-la? Em bairros ou setores?
- b) Quais os tipos de análises físico-químicas e microbiológicas fazer?
- c) Quantas análises fazer de cada poço, rio ou cidade para obter um bom parâmetro de estudo, chegar a boas discussões e valores para análises estatísticas fidedignas e dados amostrais?

Tendo em mente esses questionamentos tem-se que achar a melhor alternativa de determinar soluções que serão chaves para o êxito no estudo.

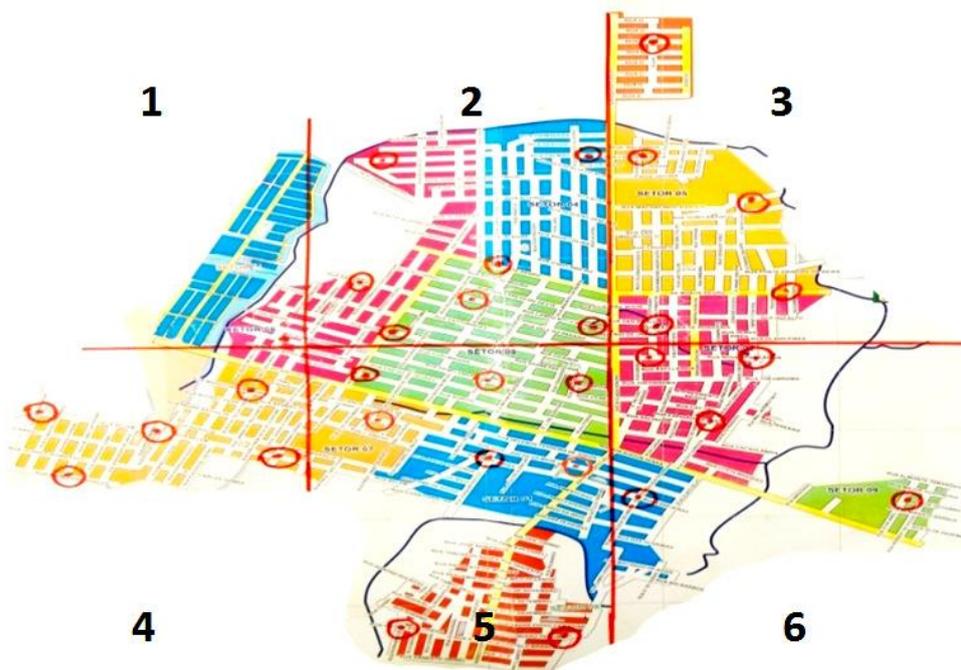
## 2.1 COMO AVALIAR A ÁREA, LOCALIDADE OU CIDADE QUE VOU PESQUISAR? COMO DIVIDI-LA? EM BAIRROS OU SETORES?

Dentro dos conceitos estatísticos, várias são as maneiras de se avaliar e coletas amostras, mas quando se trata avaliar amostras e áreas, localidades ou mesmo cidades, acredita-se que os melhores métodos de amostragem sejam:

Amostragem em camadas: Neste tipo de amostragem procede-se da seguinte maneira: Primeiro, divide-se a área em unidades de reagrupamento. Por exemplo, pode-se dividir uma cidade em bairros. Em seguida, dividem-se subunidades que neste caso serão as ruas de cada bairro. Para compor a amostra em camadas, primeiro, seleciona-se ao acaso só algumas unidades de reagrupamento, ou seja, alguns bairros. Somente estes

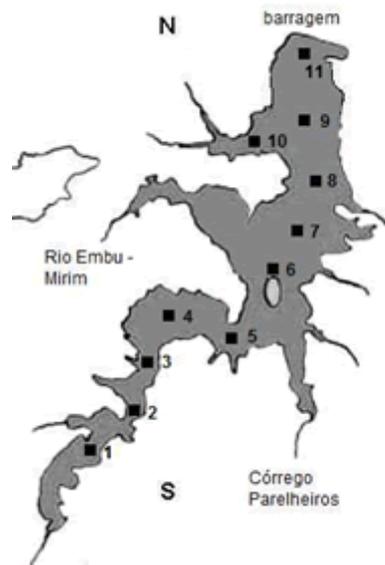
bairros selecionados farão parte de nossa amostra. Em seguida, procede-se à seleção de algumas ruas ou subunidades de bairros selecionados. Este tipo de amostragem é menos representativo, pois somente algumas unidades de reagrupamento são usadas.

Amostragem estratificada: Este tipo de amostragem é mais representativa e apresenta menos erro, porque seleciona-se ao acaso alguns elementos de cada um dos estratos do todo e não apenas de alguns estratos, como foi o caso da amostragem em camadas. Utilizando o exemplo acima, dividir-se-ia uma cidade em bairros e se retiraria ao acaso alguns elementos de cada bairro como visto na Figura 1. Assim, todos os bairros estariam representados na amostra. Neste tipo de amostra, tem-se uma maior probabilidade de obter uma média da amostra que seja igual à média do todo.



**Figura 1.** Exemplo e divisão em uma amostragem estratificada  
Fonte: (ZAN et al., 2013)

Quando se tratar de análise de rio, a melhor maneira seja descobrir toda a extensão do rio que será analisado e determinar o máximo de pontos em toda a extensão do mesmo, conforme demonstrado no exemplo da Figura 2.



**Figura 2.** Exemplo de pontos de coletas de amostras no curso do rio  
 Fonte: (RICHTER et al, 2007) adaptado pelos autores

## 2.2 QUAIS OS TIPOS DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS FAZER?

Quando se pensa que tipos de análises devem-se fazer para águas de consumo humano, sugere-se buscar alguns trabalhos que propõe algumas análises em comum bem como que se baseiem em metodologias oficiais. Baseando-se nesse princípio e após avaliação de alguns artigos e literaturas que tratam do tema proposto neste capítulo, é proposto algumas análises comuns em todos os trabalhos e que também são executadas na maioria das empresas de saneamento básico à nível de Brasil.

## 2.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS:

Em rios: Temperatura do ar e da água, alcalinidade, nitrogênio total, fosforo total, resíduos totais, cor, dureza, ferro, turbidez, oxigênio dissolvido, pH, demanda química de oxigênio - D.Q.O, demanda bioquímica de oxigênio – DBO, Condutividade elétrica, Sólidos dissolvidos, óleos e graxas e clorofila. Se dentro da possibilidade da Instituição de pesquisa for possível fazer a análise de alguns metais pesados e pesticidas também se sugere as mesmas.

Em poços: Temperatura da água, alcalinidade, nitrogênio total, fosforo total, resíduos totais, cor, dureza, ferro, turbidez, pH, Condutividade elétrica, Sólidos dissolvidos, óleos e graxas. Se dentro da possibilidade da Instituição da pesquisa for possível fazer a análise de alguns metais pesados e pesticidas também se sugere as mesmas.

Em água de abastecimento público: alcalinidade, cor, dureza, turbidez, pH, condutividade elétrica, sólidos dissolvidos, cloro livre, cloro total e flúor. Se dentro da possibilidade da Instituição da pesquisa for possível fazer a análise de alguns metais pesados e pesticidas também se sugere as mesmas.

Em água mineral: alcalinidade, cor, dureza, turbidez, pH, condutividade elétrica, sólidos dissolvidos.

#### 2.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS:

Em todos os casos propostos, em rios, poços, de abastecimento público e água mineral, sugere-se as análises microbiológicas de coliformes totais e fecais.

#### 2.5 ANÁLISES DE FITOPLANCTON E ZOOPLANCTON

Para análises de rios também sugere-se, muitas vezes, análises de fitoplancton e zooplancton, tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Estas análises tem por finalidade um monitoramento biológico baseado na análise da comunidade planctônica que tem importante participação na avaliação das mudanças no ambiente. Estudos demonstram importância das avaliações taxonômicas dos grupos de fito e zooplâncton como indicadores da qualidade das águas (ZAN, 2012).

#### 2.6 QUANTAS ANÁLISES FAZER DE CADA POÇO, RIO OU CIDADE PARA OBTER-SE UM BOM PARÂMETRO DE ESTUDO, CHEGAR A BOAS DISCUSSÕES E VALORES PARA ANÁLISES ESTATÍSTICAS FIDELÍGAS E DADOS AMOSTRAIS?

Quando for se analisar águas superficiais de rios e água de poços tem que se ter em mente noções sobre lençol freático, se o mesmo tem contato com rios, também noções sobre tempo das chuvas, como na Região Amazônica que existe o período de seca e o período das cheias, bem definidos, nestes locais sugere-se levar em conta os mesmos, pois irão afetar na diluição das águas ou também na concentração de poluentes. Levando-se em conta fatores como os citados deve-se fazer um número maior de coletas, tentando cobrir esses aspectos, pois os mesmos podem interferir ou até mesmo mascarar valores reais, como fazer análise em períodos muito secos onde será provável que as amostras estejam mais concentradas dando valores mais elevados.

Quando se trata de análise de água fornecida pelas empresas de saneamento urbano, deve-se fazer um número mínimo de coletas, que abranjam um espaçamento de tempo entre as análises e mostre variáveis confiáveis nas análises.

Quando se trata de água mineral vendida no comércio local deve-se procurar o maior número de marcas e destas um mínimo de 3 a 5 lotes diferentes de cada marca, para estar fazendo a pesquisa.

## 2.7 COMO COLETAR E CUIDADOS COM AS AMOSTRAS

A metodologia de coleta e cuidados com as amostras de água está descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005), publicado pela *American Public Health Association*, sendo estas metodologias as mesmas que todas as empresas de saneamentos e laboratórios de análise se baseiam no Brasil. Existem vários manuais e livros que também se baseiam nos métodos da *Standard Methods*, como a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB que tem vários manuais disponíveis para consulta e para serem seguidos na execução de análises e projetos de pesquisa em água. Não nos deteremos aqui em descrever estas técnicas por estarem à disposição facilmente de todos pelo intermédio da internet.

## 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após o planejamento das análises iniciais sobre a qualidade dos dados que serão levantados, sejam descritivos e / ou modeladores, os mesmos gerarão amostras com resultados qualitativos ou quantitativos, não se deve esquecer descrição detalhada da população amostrada e definição dos modelos de análise que responderam aos objetivos iniciais da pesquisa.

Para efetuarem-se análises exploratórias dos dados obtidos devem-se apresentar os modelos de análises e conclusões complementares obtidas, iniciar o processamento dos dados através da identificação de algum programa estatístico que trate seus dados e que crie planos de consistência e qualidade das informações obtidas na pesquisa e a partir disso descrever e discutir seus resultados.

A utilidade dos dados e resultados obtidos em uma pesquisa depende, muitas vezes, da forma como são organizados e apresentados. A apresentação dos resultados é feita, muitas vezes, através de quadros, gráficos e de distribuições de frequência. Para muitos, os quadros e os gráficos devem apresentar sempre três partes: o cabeçalho, o corpo e o rodapé.

No cabeçalho deve ser dada informação sobre os dados, no corpo representam-se os dados e no rodapé deve ser indicada a fonte dos dados e observações pertinentes. Dos vários tipos de gráficos destacamos: gráfico de linhas, gráfico de barras, gráfico de setores e pictogramas, os quais podem ser facilmente construídos a partir de diversos programas de informática ou estatísticos.

## 4. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Norma para construção de poços de monitoramento e amostragem - NBR 13895**. Rio de Janeiro, 1997<sup>a</sup>

APHA. American Public Health Association; AWWA. Water Environment Federation. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Eaton, A. d.; I. S. Clesceri; A. E. greenberg (Ed.), 20th ed. Washington, d.C.: [s.n.], 2005.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual prático de análise de água**. 3<sup>a</sup> ed. rev.: Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 2009.

CETESB. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo, 155p 1987.

CETESB. **Manual de cianobactérias planctônicas: Legislação, orientações para o monitoramento e aspetos ambientais**, 2013.

COGERH. **Recomendações e cuidados na coleta de amostras de água**. Informe técnico n.02, 1<sup>a</sup> ed. Fortaleza, 2001.

LACERDA, G. A. **Manual de aulas práticas em análises ambientais**. UNIFENAS, Faculdade de Biomedicina, Divinópolis, 2009.

RICHTER, E.M.; FORNARO, A.; LAGO, Cl.L.; ANGNES, L. Avaliação da composição química de águas do Sistema Guarapiranga: estudo de caso nos anos de 2002 e 2003. **Quím Nova.**, v.30, n.5, p.1147-1152, 2007.

ZAN, R.A.; ANDRÉ, A.P.A.; COUTINHO; A.P.M., BARBOSA, N.V.; BRONDANI, F.M.M.; MENEGUETI, D.U.O. Avaliação da qualidade das águas superficiais do Rio Jamari na região da construção de uma PCH no município de Monte Negro-Rondônia, Amazônia Ocidental, **Rev Elet em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET.**, v.8, n.8, p.1876-1888, 2012.

ZAN, R.A.; COSTA, A.L.; COSTA, J.B.; MENEGUETI, D.U.O. Análise microbiológica de amostras de água de poços rasos localizados no município de Buritis, Região do Vale do Jamari, Rondônia, Amazônia Ocidental. **Rev Elet em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET.**, v.8, n.8, p.1867-1875, 2012.

ZAN, R.A.; VIEIRA, F.G.; BAVARESCO, M.F.; MENEGUETI, D.U.O. Avaliação da qualidade de águas minerais comercializadas nas cidades do Vale do Jamari, Amazônia Ocidental, Rondônia - Brasil. **Rev Saúde Públ Santa Cat.**, v.6, n.4, p.19-26, 2013.

## ENSAIO DE MICRONÚCLEO EM CULTURA CELULAR HEPÁTICA COMO FERRAMENTA DE AVALIAÇÃO GENOTÓXICA

Alecsandra Oliveira de Souza<sup>1</sup>

1. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Ji-paraná, Rondônia, Brasil.

### RESUMO

O presente estudo tem por objetivo descrever a técnica de ensaio de micronúcleo em cultura celular hepática como ferramenta de avaliação genotóxica. foi possível constatar que ensaio de micronúcleo em células HepG2 pode ser utilizado para investigação genotóxica visando a investigação precoce de potencial carcinogênico ao fígado e, indiretamente, à saúde humana.

**Palavras-chave:** Genotoxicidade, micronúcleo e HepG2.

### ABSTRACT

The objective of the present study was to describe the micronucleus assay technique in hepatic cell culture as a genotoxic evaluation tool. it was possible to verify that micronucleus assay in HepG2 cells can be used for genotoxic investigation aiming the early investigation of carcinogenic potential to the liver and, indirectly, to human health..

**Keywords:** Genotoxicity, micronucleus and HepG2

## 1. INTRODUÇÃO

O ensaio de micronúcleos permite avaliar alterações cromossômicas somáticas e germinativas, sendo as germinativas passivas de transmissão para parte ou toda a prole (GRIFFITHS et al. 1998). Portanto esse ensaio é considerado vantajoso na investigação da genotoxicidade de ambientes suspeitos de contaminação, bem como na triagem precoce de carcinógenos (BONASSI et al., 2007; CEPPI et al., 2010; EL-ZEIN; VRAL; ETZEL, 2011).

Além disso, o ensaio pode ser realizado empregando em uma grande variedade de modelos experimentais baseando-se nos objetivos de cada investigação tal como no teste de micronúcleo com citocalasina (MNCTB) que é comumente usado para biomonitoramento genotóxico de populações e avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos (GONZALEZ; SANDERSON; KIRSCH-VOLDERS, 2011; GONZÁLEZ; LÓPEZ-ROLDÁN; CORTINA, 2012; SHIBAMOTO et al., 1994; ŽELAZNA; RUDNICKA; TEJS, 2011).

Dentre os modelos experimentais utilizados na metodologia de micronúcleo, o emprego de cultura de linhagens celulares derivadas de um organismo específico é amplamente difundido, pois permite a avaliação indireta do potencial mutagênico em um determinado órgão alvo ou organismo específico.

Dentre as linhagens utilizadas na avaliação possíveis danos mutagênicos à saúde humana destacam-se as células derivadas de um hepatoblastoma humano (HepG2) visto que o fígado é o principal órgão utilizado no metabolismo de xenobióticos. Esta linhagem é uma importante sugestão de modelo experimental para investigação dos efeitos de contaminantes sobre a saúde humana, pois as mesmas apresentam características semelhantes às células de um fígado normal, tal como: morfologia do parênquima hepático, síntese e excreção de diversas proteínas plasmáticas além da conservação de enzimas ativas das fases I e II do metabolismo, responsáveis pela desintoxicação de carcinógenos reativos de DNA (HELMA; UHL, 2000; KNASMÜLLER et al., 1998; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

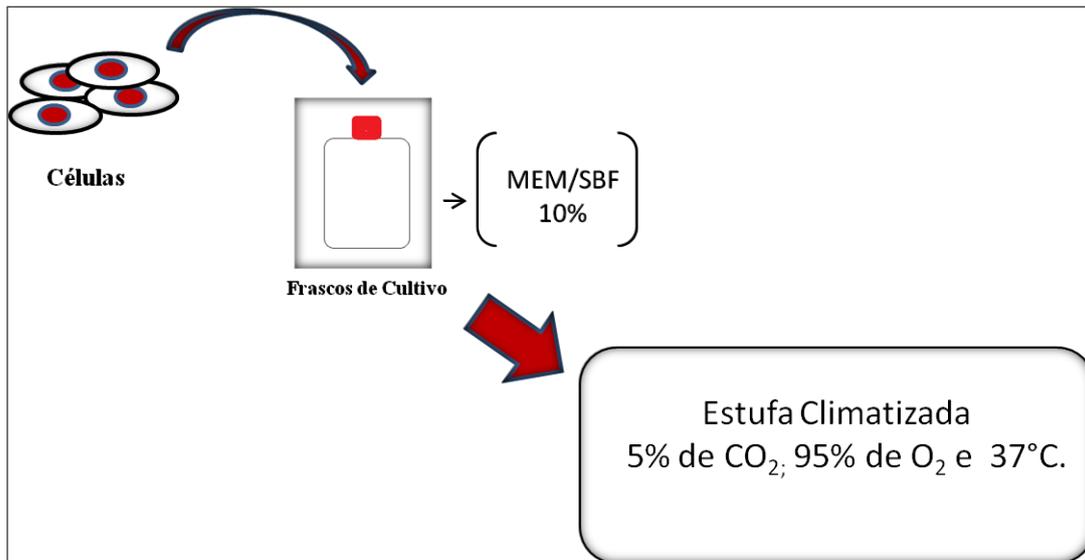
Desta forma, o ensaio de micronúcleo em células HepG2 pode ser utilizado para investigação genotóxica visando a investigação precoce de potencial carcinogênico ao fígado e, indiretamente, à saúde humana (BOLOGNESI et al., 2004; CHEQUER et al., 2009; LEME; MARIN-MORALES, 2008; MATSUMOTO, 2006; TSUBOY et al., 2007).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CULTIVO CELULAR

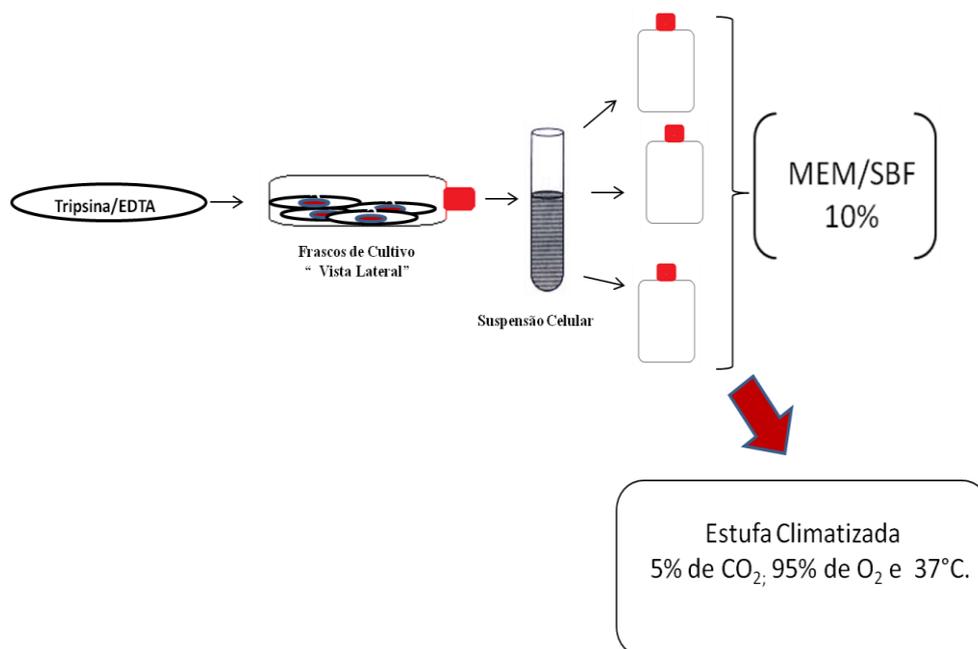
Em geral, as células HepG2 podem ser adquiridas em bancos de cultivo celular tais como o Banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BC/UFRJ), o qual contém uma grande variedade de células de origem humana ou animal, doações entre laboratórios de análise celular e Bancos de células no exterior.

A metodologia de cultivo celular é descrita na figura 1. Após aquisição celular, é aconselhável iniciar o cultivo das culturas visando adquirir quantidade adequada de células para cada ensaio. Esse procedimento deve ser iniciado com antecedência de no mínimo 15 dias.



**Figura1.** Metodologia para início de cultura celular.  
 Fonte: A própria autora

As culturas devem ser realizadas em frascos de cultivo celular (Figura 2) contendo meio de cultura “Minimim Essential Medium”. O meio de cultivo adequado para o crescimento celular deve ser suplementado com l-glutamina, bicarbonato de sódio, piruvato de sódio e soro bovino fetal 10% (ERRATICO; MOFFATT; BANDIERA, 2011; HU; HU; XU, 2009; HU et al., 2007; LEE et al., 2005; SOUZA et al., 2013).



**Figura 2.** Metodologia para repique em cultura celular  
 Fonte: A própria autora

Os frascos de cultivo celular, contendo o meio e as células HepG2 devem ser acondicionados em estufa climatizada com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% O<sub>2</sub> e temperatura de 37° C. Durante o período de crescimento celular, o meio de cultivo deve ser substituído visando garantir os nutrientes necessários para o crescimento das novas células até a monocamada de células atingir densidade com confluência de até 90 % do frasco.

## 2.2 FRACIONAMENTO CELULAR

Os frascos de cultivo com 90% de preenchimento devem ser submetidos a metodologia de fracionamento (repique). O repique é a técnica básica para manutenção de cultivo celular e visa transferir frações de células para outros frascos de modo a garantir que o crescimento celular ocorra continuamente promovendo assim, a quantidade de material adequado para o início dos ensaios.

Durante o repique, as células devem ser extraídas da parede dos frascos de cultura utilizando sistemas de raspagem celular ou através de soluções (e.g TRIPSINA/EDTA) que visem a quebra das interações entre as proteínas da membrana celular e as paredes do recipiente de cultivo promovendo assim, o deslocamento das células aderidas na parede do frasco para o meio de cultivo, sendo posteriormente transferidas para novos frascos de cultivo.

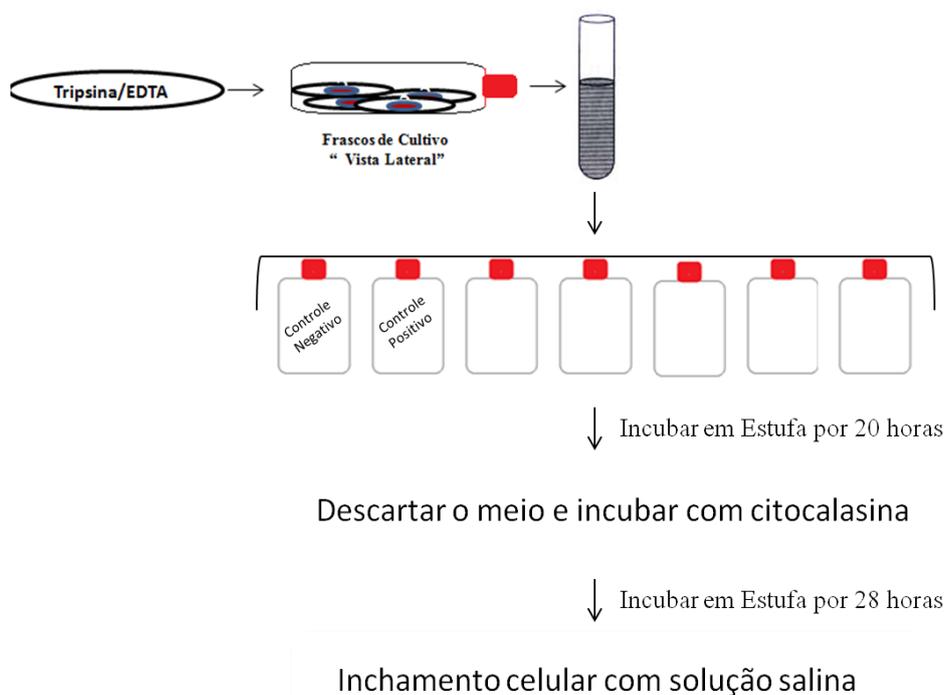
## 2.3 PREPARO DE AMOSTRAS

O preparo de amostras para o ensaio de micronúcleo pode ser realizado tanto em casos de contaminação ambiental quanto em compostos químicos isolados, no entanto, as amostras devem ser diluídas em solvente adequado respeitando os limites de toxicidade do solvente para a linhagem analisada. Nesses ensaios são preparadas soluções estoques dos compostos, as quais posteriormente serão diluídas nos frascos de cultura perfazendo as concentrações finais de análise.

Para a metodologia de micronúcleo em linhagem celular devem ser cultivadas frações de suspensão celular com as amostras de interesse utilizando o intervalo de dosagem contendo 5 (cinco) concentrações da substância teste, 1 (um) controle positivo e 1 (um) controle negativo. Os ensaios mutagênicos/genotóxico utilizando linhagens celulares devem ser realizados, somente em culturas com viabilidade superior a 80%. Portanto uma alíquota de suspensão celular deve ser recolhida e submetida ao ensaio de viabilidade tal como no teste exclusão por tripan blue.

Este ensaio é baseado na premissa de que células viáveis possuem membrana celular intacta enquanto que células com a viabilidade afetada apresentam danos na membrana que as torna permeável ao corante azul de tripan blue. A metodologia do ensaio consiste em incubar as células com solução 4% tripan blue seguindo a proporção de 1:1 com posterior análise em microscópio óptico da porcentagem de células coradas com a membrana azul (não viáveis).

Em relação ao ensaio de micronúcleo, após o período de cultivo de 20 horas com as amostras testes, a citocinese celular (clivagem celular em duas células filhas) deve ser bloqueada pela adição de citocalasina B ao cultivo celular. Uma alternativa de bloqueio é seguindo os protocolos de Fenech e Morley (1986). Esse procedimento é ilustrado na Figura 3.



**Figura 3.** Metodologia de cultivo e tratamento de concentrações teste.  
Fonte: A própria autora

Esse procedimento permitirá o acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão, independentemente do grau de sincronia e de proporção de células em divisão (FENECH, 2007).

A análise de micronúcleo em células binucleadas permite tanto a comparação da frequência de danos cromossômicos em populações celulares quanto uma frequência de células micronucleadas (FENECH; MORLEY, 1986; FENECH, 2000, 2007). Em geral, as células devem ser incubadas com citocalasina por um período de 28 horas e após esse período é realizado o procedimento de inchamento celular visando facilitar a visualização dos micronúcleos.

## 2.4 CONFECÇÃO DE LÂMINAS

Para confecção das lâminas, as células devem ser homogeneizadas com solução fixadora contendo Metanol/Ácido Acético 3:1 e transferidas para lâminas pré-lavadas, anteriormente, com Extran e água destilada até a formação de filme de água sob a mesma. Para cada ensaio, é indicado a confecção das lâminas em triplicata de concentração na qual é adicionado 50 µL (2 gotas) da suspensão de células com auxílio de uma pipeta Pasteur. As duas gotas devem ser pingadas nas lâminas em locais distintos (por exemplo: na parte superior e na parte inferior da lâmina) e aguardar total secagem para iniciar o processo de análise.

### 2.4.1 Análise das Lâminas

Para contagem dos micronúcleos é indicado o uso de corantes nucleares que auxiliam na visualização dos micronúcleos. Nos ensaios utilizando linhagem HepG2 é indicado o uso de solução Giemsa 5% e visualização em microscópio óptico.

No procedimento padrão para quantificação de micronúcleos, as lâminas coradas devem se analisadas em microscópio ótico com aumento de 400 ou 1000. Um total de micronúcleo presente em 1000 células viáveis binucleadas (BN).

Para cálculo do índice de divisão nuclear (IDN) é indicado a contagem de um total de 500 células destacando as quantidade mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e tetranucleadas (FENECH, 2007) e para calculo de porcentagem de células binucleadas (superior a 35%) (FENECH, 2000). Esse procedimento deve ser realizado com a contagem de 250 células em cada lâmina.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A média de triplicatas independentes relacionadas com a quantidade de micronúcleo em células binucleadas deve ser apresentada utilizando-se gráficos escolhidos ao critério do analista. No entanto, os modelos de barras permitem maior comparação com o controle

negativo do ensaio. Para validação do ensaio, os ensaios de IDN e viabilidade celular de cada concentração também devem ser apresentados em média de triplicata de ensaios independentes. Os testes estatísticos indicados consistem na análise de variância associada a comparação com o grupo controle.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Contatou-se que o ensaio de micronúcleo em células HepG2 pode ser utilizado para investigação genotóxica visando a profilaxia efeitos carcinogênicos ao fígado e, indiretamente, à saúde humana.

### 4. REFERÊNCIAS

BOLOGNESI, C. et al. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. **The Science of the total environment.**, v.333, n.1-3, p.127–36, 2004.

BONASSI, S. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis.**, v.28, n.3, p.625–31, 2007.

CEPPI, M. et al. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. **Mutation research.**, v.705, n.1, p.11–9, 2010.

CHEQUER, F. M. D. et al. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation research.**, v. 676, n. 1-2, p. 83–6, 2009.

EL-ZEIN, R.; VRAL, A.; ETZEL, C. J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. **Mutagenesis.**, v.26, n.1, p.101–6, 2011.

ERRATICO, C. A.; MOFFATT, S. C.; BANDIERA, S. M. Comparative oxidative metabolism of BDE-47 and BDE-99 by rat hepatic microsomes. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology.**, v.123, n.1, p.37–47, 2011.

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

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols.**, v.2, n.5, p.1084–104, 2007.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. **Mutation research.**, v.161, n.2, p.193–198, 1986.

GONZALEZ, L.; SANDERSON, B. J. S.; KIRSCH-VOLDERS, M. Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. **Mutagenesis.**, v.26, n.1, p.185–191, 2011.

GONZÁLEZ, S.; LÓPEZ-ROLDÁN, R.; CORTINA, J.-L. Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: a review. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987).**, v.161, p.83–92, 2012.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **Mutação Gênica.** in: In Introdução à Genética, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998

HELMA, C.; UHL, M. A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. **Mutation research.**, v.466, n.1, p.9–15, 2000.

HU, X.; HU, D.; XU, Y. Effects of tetrabrominated diphenyl ether and hexabromocyclododecanes in single and complex exposure to hepatoma HepG2 cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology.**, v.27, n.3, p.327–337, 2009.

HU, X.-Z. et al. Apoptosis induction on human hepatoma cells Hep G2 of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209). **Toxicology Letters.**, v.171, n.1-2, p.19–28, 2007.

KNASMÜLLER, S. et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation research.**, v.402, n.1-2, p.185–202, 1998.

LEE, H. et al. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax. **Bak and activation of JNK.**, v.203, p.124–131, 2005.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water--a case study. **Mutation research.**, v. 650, n. 1, p. 80–6, 2008.

MATSUMOTO, S. tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Molecular Biology.**, v.158, p.148–158, 2006.

SHIBAMOTO, Y. et al. Assessment of the proliferative activity and radiosensitivity of human tumours using the cytokinesis-block micronucleus assay. **British Journal of Cancer.**, v.70, n.1, p.67–71, 1994.

SOUZA, A O. et al. BDE-99 congener induces cell death by apoptosis of human hepatoblastoma cell line - HepG2. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA.**, v.27, n.2, p.580–587, 2013.

TSUBOY, M. S. et al. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA.**, v.21, n.8, p.1650–1655, 2007.

VALENTIN-SEVERIN, I. et al. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.**, v.536, n.1-2, p.79–90, 2003.

ŽELAZNA, K.; RUDNICKA, K.; TEJS, S. In vitro micronucleus test assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Biotechnology.**, v.7, p.70–80, 2011.

## QUALIDADE DOS ACHOCOLATADOS EM PÓ COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE RIO BRANCO-ACRE

**Mariana Ennis Figueiredo Barbosa<sup>1</sup>, Ianna Andrade Oliveira<sup>1</sup>, Marilene Santos de Lima<sup>2</sup>, Francimar Leão Jucá<sup>3</sup>, Cydia de Menezes Furtado<sup>4</sup>**

1. Universidade Federal do Acre (UFAC), Graduação em Nutrição Bacharelado, Rio Branco, Acre, Brasil;
2. Universidade Federal do Acre (UFAC), Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Rio Branco, Acre, Brasil;
3. Universidade Federal do Acre (UFAC), Centro de saúde e Desporto, Rio Branco, Acre, Brasil;
4. Universidade Federal do Acre (UFAC), Unidade de Tecnologia de Alimentos, Rio Branco, Acre, Brasil.

### RESUMO

Os achocolatados são alimentos consumidos por pessoas de todas as idades, podendo ser encontrados em todo o mundo. Métodos envolvidos na produção e estocagem podem favorecer a presença de matérias estranhas. Dada à grande procura, muitas indústrias têm produzido diferentes tipos de achocolatados. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a qualidade físico-química das principais marcas de achocolatados em pó comercializados em Rio Branco, Acre, verificando se a informação nutricional do produto está de acordo com a declarada na embalagem. Cinco marcas de achocolatado em pó de três lotes diferentes foram analisadas quanto ao teor de proteína, lipídeos e umidade e sujidades. Todas as amostras apresentaram teor adequado de umidade e não apresentaram presença de sujidade. Algumas marcas de achocolatado apresentaram divergência quanto as informações nutricionais obtidas a partir de análises laboratoriais, não estão de acordo com o rótulo, o que enfatiza a necessitando de maior fiscalização.

**Palavras chave:** Rotulagem, segurança alimentar e físico-química.

### ABSTRACT

Chocolates are foods eaten by people of all ages and can be found all over the world. Methods involved in production and storage may favor the presence of foreign matter. Due to the great demand, many industries have produced different types of chocolates. The present research had the objective of evaluating the physico-chemical quality of the main brands of powdered chocolate commercialized in Rio Branco, Acre, verifying if the nutritional information of the product is in agreement with the declared in the packaging. Soil, protein determination, lipid and moisture analyzes were performed. Five brands of powdered chocolate from three different batches were analyzed. All samples analyzed had adequate moisture content. No presence of dirt was detected and there are brands of chocolate, which nutritional information obtained from laboratory analyzes are not in accordance with the label, requiring greater supervision.

**Keywords:** Labeling, food safety and physico-chemical.

## 1. INTRODUÇÃO

A importância dos alimentos em pó deve-se à sua versatilidade no manuseio, armazenamento, processo de fabricação, estabilidade química e microbiológica, entre outras (VISSOTO, 2006). Os achocolatados são alimentos consumidos por pessoas de todas as idades e podem ser encontrados em todo o mundo. As suas características sensoriais e nutricionais, assim como sua conveniência e praticidade, fazem com que o produto seja bem aceito pelo consumidor (EDUARDO, 2004).

Como esses produtos vêm sendo amplamente consumidos, muitas indústrias têm produzido achocolatados, fazendo com que haja grande variedade e preços competitivos ao consumidor. Porém, no processamento, os ingredientes e as concentrações utilizadas não são os mesmos, fazendo com que haja grande variação nas suas propriedades nutricionais, tais como teor de lipídios, proteínas, carboidratos, teobromina e outros alcaloides (EDUARDO, 2004).

A Resolução - CNNPA nº 12, de 1978 diz que o chocolate em pó é o produto obtido pela mistura de cacau em pó com açúcar. O açúcar empregado no seu preparo deve ser normalmente sacarose, podendo ser substituído parcialmente por glicose pura ou lactose. Determina também umidade máxima de 3,0% e deve apresentar ausência de sujidades, parasitos e larvas.

Os métodos de processamento e a secagem natural envolvida no beneficiamento do cacau, podem favorecer a presença matéria estranha, contaminação esta que pode ocorrer também na estocagem, transporte e manipulação (TOMAZINI, 2017). A atual legislação, no Brasil, para o cumprimento dos parâmetros microscópicos, Resolução nº 175 de 8 julho de 2003, estabelece disposições gerais para a avaliação de matérias estranhas microscópicas de macroscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados, bebidas e águas envasadas.

No Brasil, os achocolatados em pó presentes no mercado possuem baixo valor nutricional, o que é algo preocupante, pois esse produto é destinado principalmente para crianças, fase em que ocorre o desenvolvimento (KUMAZAWA, 2013). Altamente energético, em 25 g de achocolatado, são encontrados em média 100 kcal, sendo seus principais consumidores as crianças de 4 a 10 anos, adolescentes e adultos até 25 anos, que o consomem preferencialmente no café da manhã (TOMAZINI, 2017).

Estudos revelam que o caráter epidêmico e a prevalência crescente da obesidade infantil são influenciados por hábitos alimentares e modificações no estilo de vida,

determinadas por fatores culturais, sociais e econômicos. Essas mudanças envolvem hábitos nutricionais inadequados, caracterizados pelo aumento exagerado do consumo de alimentos ricos em gordura e com alto valor energético, associado ao sedentarismo condicionado pela redução da prática de atividade física e incremento de hábitos que não geram gasto calórico, como assistir à televisão, usar videogames e computadores; alterações ocupacionais e de locomoção; e mudanças no tipo de atividades de lazer (RAMOS, 2013).

O hábito de ler as informações nutricionais nos rótulos dos produtos industrializados vem sendo cada vez mais frequente, justificando a necessidade de que estas informações sejam corretas e completas, assim como a verificação de sua qualidade (EDUARDO, 2004).

O objetivo foi avaliar a qualidade físico-química das principais marcas de achocolatados em pó comercializados em Rio Branco, Acre, visando verificar se a informação nutricional do produto está de acordo com as contidas em sua embalagem.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas três amostras de lotes diferentes de cinco marcas de achocolatado em pó, totalizando quinze amostras, comercializadas na cidade de Rio Branco, AC. As análises físico-químicas foram realizadas, no laboratório de físico-química de alimentos da Unidade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Acre, conforme a descrição metodológica do Instituto Adolfo Lutz, (ano).

### 2.1 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

Utilizou-se 1 g da amostra em papel de seda e transferido para balão de Kjeldahl e adicionado 25 mL de ácido sulfúrico e 6 g da mistura catalítica. Levado ao aquecimento em chapa elétrica, na capela de exaustão de gases até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não digerido. Foi aquecido por mais 1h e esfriado. Adicionado 10 gotas do indicador fenolftaleína e 1 g de zinco em pó. A extremidade afilada do refrigerante foi mergulhada em 25 mL de ácido sulfúrico 0,05 M, contido no frasco Erlenmeyer de 500 mL com 3 gotas do indicador metila. Foi adicionado ao frasco que contém a amostra digerida, solução de hidróxido de sódio a 30% até garantir um ligeiro excesso de base. O cálculo utilizado foi:  $V \times 0,14 \times f / P = \text{protédeos por cento m/m}$ , onde: V = diferença entre o n° de mL

de ácido sulfúrico 0,05 M e o n° de mL de hidróxido de sódio 0,1 M gastos na titulação.  $P = n^\circ$  de g da amostra.  $f =$  fator de conversão.

## 2.2 DETERMINAÇÃO DE LIPÍDIOS

Foram pesados 5 g da amostra em cartucho de Soxhlet. O cartucho foi transferido para o aparelho extrator tipo Soxhlet. O extrator é acoplado ao balão de fundo chato previamente tratado a 105°C. Foi adicionado éter na quantidade de um Soxhlet e meio. Cálculo utilizado:  $100 \times N/P =$  lipídeos ou extrato etéreo por cento m/m. Onde:  $N = n^\circ$  de gramas de lipídeos e  $P = n^\circ$  de gramas da amostra.

## 2.3 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

Foi feita por secagem direta em estufa a 105°C. Foram pesadas 5 g de amostra em becker, previamente tarado. Aqueceu-se durante 24h na estufa, resfriado em dessecador por 1 hora e pesado. Cálculo utilizado:

$100 \times N/P =$  umidade ou substâncias voláteis a 105 °C por cento m/m. Onde:  $N = n^\circ$  de gramas de umidade (perda de massa em g) e  $P = n^\circ$  de gramas da amostra.

## 2.4 DETERMINAÇÃO DE SUJIDADES

Foi utilizado o método de flutuação n° 965.38 descrito pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC International), onde diluiu-se 50 g de amostra em 1 L de água, para melhor solubilidade, a solução foi filtrada a vácuo em funil de buchn e analisada com auxílio de lupa.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise de lipídios é de grande relevância por representar não somente o teor de lipídios, mas também o teor de vários compostos como carotenóides, vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), esteróis, óleos essenciais e outros, os quais são geralmente extraídos pelo solvente, nas condições do método (Carvalho *et al.*, 1990; Eduardo, Bavutti, 2002).

O teor de lipídios variou entre as diferentes marcas de achocolatados (Tabela 1). Alguns fabricantes declaram no rótulo do produto teor de lipídios zero (II, IV e V), o que não condiz com a realidade observada nos resultados das análises. As demais marcas (I e III) apresentaram valor bem próximo ao exposto no rótulo.

**TABELA 1.** Teor de lipídios dos achocolatados nas amostras e o declarado nos rótulos.

Achocolatado	Teor de Lipídio em 20 g na análise (média + desvio -padrão)	Teor de Lipídio em 20 g declarado nos rótulos
MARCA I	0,43 ± 0,24	0,50
MARCA II	0,26 ± 0,18	0,00
MARCA III	0,40 ± 0,26	0,50
MARCA IV	0,31 ± 0,17	0,00
MARCA V	0,84 ± 1,00	0,00

\* Foram analisadas 3 amostras de lotes diferentes em cada marca.

Estudos revelam que o caráter epidêmico e a prevalência crescente da obesidade infantil são influenciados por modificações no estilo de vida, determinadas por fatores culturais, sociais e econômicos. Essas mudanças envolvem hábitos nutricionais inadequados, caracterizados pelo aumento exagerado do consumo de alimentos ricos em gordura e com alto valor energético (RAMOS, 2013).

A ingestão de lipídios geralmente não deve exceder 30% da energia em indivíduos diabéticos. Mais importante, as gorduras saturadas, devido ao seu potencial aterogênico, devem ser restringidas ao máximo de 10% das necessidades energéticas. As poliinsaturadas também devem ser restringidas abaixo de 10% e a ingestão de colesterol deve ser mantida abaixo de 200 mg/dia (MAHAN; ARLIN, 1995; SHILS, 2003).

Em geral, produtos ultraprocessados apresentam alta densidade energética, excesso de gorduras totais e saturadas, maiores concentrações de açúcar e/ou sódio e baixo teor de fibras (Monteiro, 2010; Moubarac, 2013). O achocolatado por si só não fornece grandes quantidades de lipídios à dieta, mas dependendo da quantidade ingerida, ele pode ajudar a aumentar a ingestão lipídica e calórica diária, somando-se a outras fontes de lipídios.

O teor de proteína apresentado na tabela 2 mostra, mostram que duas marcas declararam ausência de proteínas nos rótulos (II e V), o que também não condiz com os resultados expostos pelas análises. As demais marcas (I, III e IV) apresentaram resultados semelhantes aos declarados pelos consecutivos fabricantes.

**TABELA 2.** Teor de proteína dos achocolatados nas amostras e o declarado nos rótulos.

<b>Achocolatado</b>	<b>Teor de Proteína em 20 g na análise</b>	<b>Teor de Proteína em 20g declarado nos rótulos</b>
MARCA I	0,86	0,70
MARCA II	0,95	0,00
MARCA III	0,59	0,50
MARCA IV	1,11	1,40
MARCA V	0,55	0,00

\* Foi analisado apenas 1 amostra para cada marca.

Os dados da POF indicaram que a alimentação das crianças brasileiras é deficiente em frutas, legumes e verduras. Ainda, apresenta excesso de consumo de biscoitos, embutidos, bebidas com adição de açúcar, sanduíches e salgados (BRASIL, 2010).

As evidências científicas apontam que o aumento nas taxas de excesso de peso e DCNT é decorrente, entre outros fatores, da inversão dos padrões alimentares (ENES, 2010).<sup>4</sup> Essa inversão caracteriza-se pela substituição cada vez maior da alimentação tradicional por alimentos e bebidas altamente processados e prontos para consumo (MONTEIRO, 2010).

Nas amostras analisadas, a umidade variou de 0,49% a 1,12%, como mostra a Tabela 3. Como não há informações contidas no rótulo sobre a umidade do produto, a comparação ficou para com a Resolução - CNNPA nº 12, de 1978, que diz que a umidade máxima deve ser de 3%. Sendo assim, todas as amostras se apresentaram dentro do parâmetro.

Um teor maior ou menor de umidade dos achocolatados depende diretamente da umidade dos ingredientes e/ou do processamento e armazenagem do achocolatado (EDUARDO, 2004).

Quanto às sujidades, as amostras analisadas não apresentaram fragmentos de insetos ou outros contaminantes físicos (Tabela 4). Com isso, todas as amostras estão de acordo a resolução da Anvisa.

**TABELA 3.** Teor de umidade dos achocolatados nas amostras e o esperado.

Achocolatado	Teor de Umidade (%) (média + desvio -padrão)	Teor de Umidade (%) Esperado
MARCA I	0,64 ± 0,31	3
MARCA II	0,50 ± 0,03	3
MARCA III	0,75 ± 0,30	3
MARCA IV	1,17 ± 0,28	3
MARCA V	0,88 ± 0,06	3

\* Foram analisadas 6 amostras de 3 lotes diferentes em cada marca.

**TABELA 4.** Presença de sujidades nas amostras e o máximo permitido.

Achocolatado	Presença de Sujidades em 50 g de amostra	Presença de Sujidades permitida em 50 g
MARCA I	Ausente	nenhum
MARCA II	Ausente	Nenhum
MARCA III	Ausente	Nenhum
MARCA IV	Ausente	Nenhum
MARCA V	Ausente	Nenhum

\* Foram analisadas 3 amostras de lotes diferentes em cada marca.

Segundo a Resolução nº 175 de 8 julho de 2003, a matéria prejudicial à saúde humana: é aquela matéria detectada macroscopicamente e ou microscopicamente, relacionada ao risco à saúde humana e abrange: insetos, em qualquer fase de desenvolvimento, vivos ou mortos, inteiros ou em partes, reconhecidos como vetores mecânicos; outros animais vivos ou mortos, inteiros ou em partes, reconhecidos como vetores mecânicos; parasitos; excrementos de insetos e ou de outros animais; objetos rígidos, pontiagudos e ou cortantes, que podem causar lesões no consumidor (BRASIL, 2003). De acordo com a Resolução - CNNPA nº 12, de 24 de julho de 1978, deve apresentar ausência de sujidades, parasitos e larvas.

## 4. CONCLUSÕES

Todas as amostras analisadas apresentaram teor de umidade dentro do estabelecido.

Todas as marcas analisadas estão isentas de sujidades, logo estão de acordo com a legislação vigente.

Algumas marcas de achocolatado mostraram divergência nas informações nutricionais constante nos rótulos quando comparadas nas obtidas a partir de análises laboratoriais, necessitando de maior fiscalização na área de rotulagem.

Maiores informações sobre a importância de leitura dos rótulos dos alimentos devem ser divulgadas, para que a população possa escolher o que consumir de acordo com a qualidade do produto.

## 5. REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2010.

BRASIL. **Resolução - CNNPA nº 12, de 24 de julho de 1978**. ANVISA. Normas Técnicas Especiais relativas a alimentos (e bebidas). São Paulo, SP, 1978. – Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/12\\_78\\_chocolate.htm](http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/12_78_chocolate.htm)> Acesso em 10 de julho de 2018.

BRASIL. **Resolução RDC no 175, de 08 de julho de 2003**. ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais a Saúde Humana em Alimentos Embalados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003. – Disponível em: <[http://www.abic.com.br/publique/media/CONS\\_leg\\_resol175-03.pdf](http://www.abic.com.br/publique/media/CONS_leg_resol175-03.pdf)> Acesso em 05 de julho de 2018.

CARVALHO C.R.L.; MANTOVANI, D.M.B.; CARVALHO, P.R.N.; MORAES, R.M. **Análises químicas de alimentos**. Campinas: ITAL, 1990.

EDUARDO, M.F.; BAVUTTI, H.R.F. **Determinação e comparação do teor de lipídios em alimentos dietéticos e não dietéticos pelo método de Soxhlet**. In: Encontro estadual de farmacêuticos e bioquímicos, Florianópolis, 2002.

EDUARDO, Mércia de Freitas; LANNES, Suzana Caetano da Silva. Achocolatados: análise química. **Rev Bras Cienc Farm.**, v.40, n.3, p.405-412, 2004.

KUMAZAWA, K. Y. I; VISSOTTO, F. Z.; IZABELA DUTRA ALVIM I. D; LIMA, A. C. J; SILVA, M. G. **Estudo para estabelecer formulação e processamento de achocolatados em pó**

**com maior teor de proteínas e enriquecido com ácido ascórbico e vitamina D.** Anais do VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica Campinas, SP, 2013.

MAHAN, L.K.; ARLIN, M. T. **Alimentos, nutrição e dietoterapia.** 8. ed. São Paulo: Editora Roca, 1995.

MONTEIRO, C.A.; et al. Uma nova classificação de alimentos com base na extensão e finalidade de seu processamento. **Cad Saúde Pública.**, v.26, n.11, p.2039-2049, 2010.

MOUBARAC, J.C.; MARTINS, A.P.A.; CLARO, R.M.; LEVY, R.B.; CANHÃO, G.; MONTEIRO, C.A. Consumo de alimentos ultraprocessados e provável impacto na saúde humana. Evidências do Canadá. **Nutr Nutr.**, v.16, n.12, p.2240-2248, 2013.

RAMOS, M.L.M.; PONTES, E.R.J.C.; RAMOS, M.L.M.; BARROS, V.R.S.P. Sobrepeso e obesidade em escolares de 10 a 14 anos. **Rev Bras Promoc Saude.**, v.26, n.2, p.223-232, 2013.

SHILS, M.E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença.** São Paulo: Manole, 2003.

TOMAZINI, C.C.; STROHSCHOEN, A.A.G. Avaliação Das Condições Higiênico-Sanitárias de Achocolatados Comercializados na Região Central do Rio Grande do Sul. **Revista Destaques Acadêmicos.**, v.4, n.3, p.55-59, 2012.

VISSOTTO, F. Z. et al. Avaliação da influência dos processos de lecitinação e de aglomeração nas propriedades físicas de achocolatado em pó. **Ciênc Tecnol Aliment.**, v.26, n.3, p.666-671, 2006.

## ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE COMERCIALIZADOS EM HAMBURGUERIAS NO MUNICÍPIO DE RIO BRANCO, ACRE

Leticia Furtado de Assis<sup>1</sup>, Cydia de Menezes Furtado<sup>2</sup>, Marilene Santos de Lima<sup>3</sup>, Ludmilla da Silva Brandão<sup>2</sup>, Carolina Pontes Soares<sup>4</sup>, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti<sup>5</sup>

1. Universidade Federal do Acre (UFAC), Graduação em Enfermagem Bacharelado, Rio Branco, Acre, Brasil;
2. Universidade Federal do Acre (UFAC), Unidade de Tecnologia de Alimentos, Rio Branco, Acre, Brasil;
3. Universidade Federal do Acre (UFAC), Centro de Ciências Biológicas de da Natureza, Rio Branco, Acre, Brasil;
4. Cento Universitário Uninorte, Rio Branco, Acre, Brasil;
5. Universidade Federal do Acre (UFAC), Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para Amazônia, Rio Branco, Acre, Brasil.

### RESUMO

O hambúrguer é um produto cárneo industrializado, obtido da carne moída de animais de açougue, com adição ou não de outros ingredientes. Sendo um produto submetido a processo de manipulação excessiva com problemático sistema de conservação, que favorece a contaminação por patógenos. Considerando o grande consumo de hambúrguer na cidade de Rio Branco-Acre, se justifica avaliar a qualidade microbiológica de hambúrgueres comercializados nesse município. Foram analisadas duas amostras de hambúrgueres de quatro estabelecimentos distintos. As análises de coliformes termotolerantes, contagem de bactérias aeróbias mesófilas e bolores e leveduras, foram realizadas no laboratório de microbiologia da UTAL/UFAC, seguindo os métodos de análise do Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Todas as amostras analisadas apresentaram contagem elevadas de bactérias mesófilas e seis amostras indicaram a presença de coliformes termotolerantes. Sugere-se ações de controle sanitário na área de alimentos, proporcionando ao consumidor de hambúrguer a oferta de um produto de qualidade e garantindo assim a segurança alimentar do consumidor.

**Palavras-chave:** Segurança alimentar, microbiologia e hambúrguer.

### ABSTRACT

The hamburger is an industrialized meat product obtained from ground meat of butchers, with or without other ingredients. Being a product subjected to excessive manipulation process with problematic system of conservation, that favors the contamination by pathogens. Considering the great hamburger consumption in the city of Rio Branco-Acre, it is justified to evaluate the microbiological quality of hamburgers commercialized in this city. Two samples of hamburgers from four different establishments were analyzed. The analyzes of thermotolerant coliforms, counts of mesophilic aerobic bacteria and molds and yeasts were carried out in the microbiology laboratory of UTAL / UFAC, following the methods of analysis of the Compendium of methods for the microbiological examination of foods. All the samples analyzed showed high counts of mesophilic bacteria and six samples

indicated the presence of thermotolerant coliforms. Health control actions in the food area are suggested, providing the hamburger consumer with the offer of a quality product and thus guaranteeing the consumer's food safety.

**Keywords:** Food safety, microbiology and hamburgers.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre todos os produtos de origem animal, a carne é utilizada pelo homem como uma das mais importantes fontes de alimentação, já que é rica em proteínas de alto valor biológico pelos aminoácidos essenciais que a compõem, decorrendo daí a importância do seu consumo (MARCHI, 2006). Por outro lado, esses produtos quando manipulados e consumidos de forma inadequada podem ser fonte de contaminação alimentar por patógenos causando sérios danos à saúde do consumidor.

De acordo com o perfil epidemiológico no Brasil, de 2006 a 2016, determinado pelo Ministério da Saúde, carnes bovinas *in natura*, processados e miúdos são responsáveis por 2,1% casos de doenças transmitidas por alimentos - DTA no Brasil. O Norte é a região com segunda menor porcentagem de DTA no Brasil (7,1%), atrás do Sudeste (43,6%), Sul (24,6%), Nordeste (19,8%) e a frente do Centro-oeste (6,2%) (BRASIL, 2016). Destacando a *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli* como os principais responsáveis pelos problemas de saúde pública derivados de contaminação alimentar e motivo de constante de preocupação para os órgãos sanitários (OMS, 2018).

Recentemente, no processo de produção alimentícia, observa-se crescente preocupação com a Segurança Alimentar. Este conceito se refere ao acesso aos alimentos com qualidade e quantidade suficientes, com promoção da saúde sanitária e nutricional, respeito da diversidade cultural e sustentabilidade, já o termo alimento seguro refere-se à prevenção de riscos físicos, biológicos e químicos (BERTI; SANTOS, 2016), onde o perigo biológico abrange microrganismos, tais como bactérias, fungos, vírus e parasitas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2019).

A segurança dos produtos derivados da carne e os desafios no controle dos processos geram a necessidade da criação de mecanismos que reduzam o risco potencial de doenças transmitidas por alimentos (LOPES et al., 2017), garantido a soberania alimentar da população.

A Anvisa por meio da resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, define como parâmetro microbiológica da carne *in natura*, na qual enquadra-se a carne moída, onde

estão inseridos o hambúrguer, por exemplo, a ausência de *Salmonella* sp. em 25 gramas de amostra e presença de coliformes a 45°C/g de  $5 \times 10^3$ , além dos indicadores de qualidade, que também podem ser pesquisados, como é o caso de coliformes totais e termotolerantes (BRASIL, 2001).

Apesar de ser um alimento nobre do ponto de vista nutricional e econômico, a carne é um produto altamente perecível, pela sua composição química, pelo elevado teor de água e o pH próximo à neutralidade, que favorecem o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (SOUSA, et al., 2012) como a *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli* (SILVA et al., 2016; CHIEN et al., 2016). A contaminação pode ocorrer em toda a cadeia alimentar, desde a produção primária até o consumo (abate, manuseio, transporte, cozimento, acondicionamento, entre outros).

A industrialização de carnes consiste na sua transformação das carnes em produtos cárneos, atualmente, o hambúrguer obtido da carne moída é uma alternativa para o aproveitamento das carnes menos nobres, o que vem aumentar o lucro dos abatedouros. Por outro lado, os produtos obtidos da carne moída, em particular, apresentam maiores problemas microbiológicos que os outros cortes, devido ao processo de fragmentação. Ao moer a carne pode ocorrer maior contato com outros microrganismos que não fazem parte da microbiota natural do alimento, pelo aumento da relação área/volume (MANTILLA, 2006).

Segundo Germano e Germano (2015), a carne bovina moída é a maior responsável por veicular a bactéria *E. coli* e causar enfermidades de origem alimentar no Brasil, principalmente quando consumida crua ou insuficientemente cozida. Assim, para profissionais da área de alimentos, a qualidade microbiológica de carne é um assunto de grande relevância, pois fornecerá subsídios para o desenvolvimento de novos produtos, conhecimento de inovações tecnológicas e caracterização de uma linha processadora de hambúrgueres.

O hambúrguer já faz parte da rotina alimentar dos brasileiros em virtude de suas características sensoriais, facilidade de preparo e elevado teor de lipídios, proteínas, vitaminas e minerais (QUEIROZ et al., 2005). Por muito tempo foi enquadrado à categoria de comida sem qualidade. Atualmente essa visão vem mudando com a grande introdução no mercado de hamburguerias gourmet.

Com matéria prima de qualidade e ingredientes refinados, o hambúrguer quando processado de maneira correta e com bons acompanhamentos, torna um bom prato, capaz de agradar pessoas de hábitos alimentares mais refinados. Um dos últimos “Codex”, fórum

americano de estudos da alimentação, previu que o hambúrguer será o prato mais difundido no mundo até 2020, superando a fama da pizza. Talvez por isso, diversas nacionalidades insistem em ostentar para si a autoria desse best-seller culinário.

O hambúrguer por ser um produto cárneo industrializado, com adição ou não de tecido adiposo e outros ingredientes, é um produto submetido a um processo de manipulação excessiva com problemático sistema de conservação, favorecendo sua contaminação por patógenos (FORTUNA; NASCIMENTO; FRANCO, 2013).

A pesquisa de alguns microrganismos indicadores é utilizada para avaliar a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos e apontar contaminações de origem fecal, com a provável presença de patógenos ou identificar a deterioração do alimento (SIMÕES, 2011). Assim, para um melhor controle de qualidade de carnes e hambúrgueres, são utilizadas pesquisas de determinações microbiológicas e comparação com parâmetros físico-químicos.

Desta forma, verifica-se se as amostras estão em conformidade com a RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA, por meio de análises que confirmem a presença de coliformes termotolerantes, de microrganismos aeróbios mesófilos e de bolores e leveduras. Essas análises são de grande relevância afim de se comparar a qualidade microbiológica dos hambúrgueres servidos em trailers e hamburguerias.

Considerando o grande consumo de hambúrguer no município de Rio Branco- Acre, se justifica aperfeiçoar constantemente as ações de controle sanitário na área de alimentos, proporcionando ao consumidor a oferta de um produto de qualidade livre de contaminantes, visando a segurança alimentar e melhoria da qualidade de vida da população que o consome. Para isto, faz se necessária a realização de pesquisa microbiológica de hambúrgueres comercializados nessa Capital.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 2 amostras de lotes diferentes de hambúrguer bovino artesanal em quatro hamburguerias na cidade de Rio Branco, AC. As análises microbiológicas foram realizadas, no laboratório de microbiologia da Unidade de Tecnologia de Alimentos (UTAL) da Universidade Federal do Acre (UFAC). Nessa pesquisa, foram realizados os testes confirmativos para coliformes termotolerantes, bactérias aeróbias mesófilas e bolores e leveduras. Os métodos de análises microbiológicas seguiram metodologia proposta pelo

Compendium of methods for the microbiological examination of foods, da American Public Health Association (APHA, 2001).

## 2.1 PREPARO DAS AMOSTRAS E ANÁLISES

Foram feitas as identificações com os códigos dos estabelecimentos comerciais (A, B, C, D) em cada tubo utilizado para as inoculações, com diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , 0,1, 0,01, 0,001 g de amostra, respectivamente. Foram pesadas 25 g de cada amostra e diluída em 225 mL de água peptonada ( $10^{-1}$ ).

### 2.1.1 Coliformes termotolerantes

Após a preparação das amostras, foram transferidas alíquotas de 1 mL em cada tubo das diluições seriadas contendo 9 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com tubos de Durhan invertidos, para verificar a produção de gás, e incubados em estufa 36°C com termômetro calibrado por 48 horas, as amostras com resultado positivo, com produção de gás no tubo de Durhan (teste presuntivo), foram repicadas com alíquotas de 0,1 mL, para tubos de ensaio com meio de cultura EC, incubados em banho-maria à 45°C, teste confirmativo para coliformes termotolerantes.

### 2.1.2 Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

Após a preparação das amostras, foram transferidas alíquotas de 0,1 mL de cada tubo das diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) para meio de cultura seletivo para *Staphylococcus coagulase positiva* ágar Baird Parker (BP) plaqueando as amostras em superfície, incubou por 48h a temperatura de 36°C, após esse período realizou-se a contagem total de colônias típicas de *Sthaphylococos coagulase positiva* por unidade formadora de colônias UFC/g.

### 2.1.3 Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas

Após a preparação das amostras, foram transferidas alíquotas de 0,1 mL de cada tubo das diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) para meio de cultura seletivo para Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas - CBHAM, ágar Padrão para Contagem (PCA) plaqueando as amostras em superfície, incubou por 48h a temperatura 36°C, após esse período realizou-se a contagem total de microrganismos aeróbios mesofilos por unidade formadora de colônias/UFC/g.

#### 2.1.4 Medidas de pH

Teve como objetivo determinar as condições ácidas ou básicas do meio através da concentração efetiva dos íons hidrogênio. Para a análise, pesou-se 50 g da amostra de hambúrguer e adicionou água destilada a 25°C. Agitou-se o conteúdo e deixou repousar durante 10 minutos. O líquido sobrenadante foi colocado em um béquer e, fez-se as leituras das amostras em pHmetro da marca Tecnal modelo TEC-3MP, devidamente calibrado.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem padrão em placas de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM), não diferencia os tipos de bactérias, esta análise indica a qualidade higiênico-sanitária do alimento. Não há legislação em relação ao padrão microbiológico para CBHAM em hambúrgueres. Porém, Silva et al. (2007) e Morton (2001) descreveram que o número máximo dessa microbiota, em carne moída crua, não deve ultrapassar  $1,0 \times 10^5$  UFC/g.

Como podemos verificar na tabela 1, todas as amostras apresentaram altos valores para CBHAM, mostrando deficiências e/ou falha na sanitização, no controle do processo ou na qualidade dos ingredientes (SILVA et al., 2007).

Fortuna et al. (2014), realizaram pesquisa em hambúrgueres crus e verificaram que em 53,75% de suas amostras apresentaram resultados acima de  $>1,0 \times 10^5$ . Tavares e Serafini (2006) avaliaram a quantidade de CBHAM em hambúrgueres de carne bovina, pronta para o consumo, na cidade de Goiânia, encontrando baixos valores, que variaram de  $10^1$  e  $10^4$  UFC/g. Provavelmente essas baixas contagens se deu a cocção do produto.

Houve crescimento presuntivo de bactérias para o teste de *Staphylococcus coagulase* positiva, mas as colônias não foram confirmadas com o teste de coagulase em plasma de coelho (Tabela 1).

O padrão microbiológico, RDC nº 12 de janeiro 2001, do Ministério da Saúde/MS recomenda o valor máximo de  $5 \times 10^3$  NMP/g de coliformes termotolerantes (fecais) para hambúrguer cru. Os resultados obtidos para essa variável não excederam o valor máximo permitido pela legislação (Tabela 1), embora seis amostras apresentaram coliformes fecais, provavelmente esses baixos valores foi devido ao acréscimo de condimentos. Estando próprios para o consumo humano, após cocção.

**Tabela 1.** Resultados das análises microbiológicas em quatro estabelecimentos comerciais com duas amostragens.

Hamburguerias	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	CBHAM (UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)
A - 1º coleta	< 3	>1,0x10 <sup>5</sup>	ausência
A - 2º coleta	< 3	>1,0x10 <sup>5</sup>	ausência
B - 1º coleta	23	>1,0x10 <sup>5</sup>	ausência
B - 2º coleta	3,6	>1,0x10 <sup>5</sup>	ausência
C - 1º coleta	9,2	>1,0x10 <sup>5</sup>	ausência
C - 2º coleta	160	>1,0x10 <sup>5</sup>	ausência
D - 1º coleta	3,6	>1,0x10 <sup>5</sup>	ausência
D - 2º coleta	35	>1,0x10 <sup>5</sup>	ausência

Nenhuma das amostras analisadas apresentaram resultado positivo para *Staphylococcus* coagulase positiva, demonstrando que, mesmo o hambúrguer tendo manipulação excessiva esse resultado mostrou que houve boas práticas de fabricação.

O pH encontrado para toda as amostras analisadas, garante que a carne está boa para o consumo humano (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados das análises de pH em quatro estabelecimentos comerciais com duas amostragens.

Hamburguerias	pH
A - 1º coleta	5,48
A - 2º coleta	5,50
B - 1º coleta	5,40
B - 2º coleta	5,43
C - 1º coleta	5,60
C - 2º coleta	5,57
D - 1º coleta	5,55
D - 2º coleta	5,50

De acordo com Lawrie (2005), a faixa de pH ótimo para carnes frescas é de 5,40 até 6,40, sendo:

pH de 5,4 a 6,2 - carne boa para consumo.

pH 6,4 - apenas para consumo imediato (limite crítico para consumo).

pH acima de 6,4 - início de decomposição.

## 4. CONCLUSÃO

Os hambúrgueres produzidos em quatro estabelecimento na cidade de Rio Branco, estão em conformidade com o padrão de identidade e qualidade fixados pela legislação para este produto.

Mesmo apresentando coliformes termotolerantes, essa variável não ultrapassou os limites estabelecidos na RDC 12/01/2001 do MS.

Todas as amostras apresentaram faixa de pH de carne boa para o consumo humano.

Nenhuma amostra apresentou *Staphylococcus* coagulase positiva, provavelmente essa baixa contaminação microbiológica poderá ser atribuída ao acréscimo de condimentos aos hambúrgueres.

O parâmetro de contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, apresentaram contagem elevadas em todas as amostras analisadas, esse parâmetro não consta no padrão microbiológico.

Mesmo com os bons resultados apresentados por esse estudo, recomenda-se a implantação de programas de boas práticas que fiscalizem todas as etapas de processamento, manipulação e conservação do hambúrguer comercializado em Rio Branco, inclusive melhorando a qualificação dos manipuladores.

## 5. REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: APHA. 676 p. 2001.

BERTI, R.C.; SANTOS, D.C. Importância do controle de qualidade na indústria alimentícia: prováveis medidas para evitar contaminação por resíduos de limpeza em bebida UHT. **Atas de Ciências da Saúde.**, v.4, n.1, p.23-38, 2016.

BRASIL. Anvisa- Agência Nacional De Vigilância Sanitária, Resolução – RDC, nº. 12 de 2 de janeiro de 2001 – Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União de 10/01/2001. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b)>. Acesso em 10 de julho, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/653-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta/11220-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em 10 de julho, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_vigilancia\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf)>. Acesso em 10 de julho, 2018.

CHIEN, S. Y. et al. Modeling the inactivation of Escherichia coli O157:H7 and uropathogenic E. coli in ground beef by high pressure processing and citral. **Food Control.**, v.73, p.672-688, 2016.

FOOD INGREDIENTS BRASILE. Segurança Alimentar. **Food Ingredients Brasil.** Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/54.pdf>>, 2008.

FORTUNA, J.L.; NASCIMENTO, E.R.; FRANCO, R.M. Correlação entre contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e isolamento de Salmonella spp. em hambúrgueres crus. **Revista Brasileira de Ciência.**, v.20, n.1, p.59-63, 2013.

GERMANO, L.M.P.; GERMANO, S.I.M. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** 5 ed. São Paulo: Manole, 2015.

LAWRIE. R.A. **Ciência da carne.** 6ed. São Paulo: Artmed, 2005.

LOPES, M. A. et al. Fatores associados a percepção e atitude de consumidores de carne bovina com certificação de origem em Uberlândia, Minas Gerais. **Revista Ceres.**, v.64, n.1, p.31-39, 2017.

MANTILLA, S. P. S. **Listeria spp. em carne bovina pré-moída: isolamento, sorologia, sensibilidade das cepas aos antimicrobianos e relação com a presença de sulfato de sódio.** Dissertação (Pós-Graduação em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.

MARCHI, P. G. F. de. **Estudo comparativo do estado de conservação de carne moída através de métodos microbiológicos e físico-químicos.** Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Foodborne disease**. Disponível em: <<https://goo.gl/zXQKs6>>. Acesso em: 31 jan. 2018.

SILVA, D. C. et al. Parâmetros microbiológicos em diferentes cortes de carne bovina resfriada. **Higiene Alimentar.**, v.30, n.260-261, p.116-120, 2016.

SIMÕES, A.C. **Análise higiênico-sanitária de produtos cárneos comercializados na cidade de Botucatu**. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2011.

SOUSA, T.M.; NETO, A.C.; HERNANDES, T.; SOUZA, P.C.S. Microrganismos patogênicos e indicadores de condições higiênico-sanitária em carne moída comercializada na cidade de barra do garças, MT. **Acta Veterinária Brasília.**, v.6, n.2, p.124-130, 2012.

TAVARES, T.M.; SERAFINI, A.B. Avaliação microbiológica de hambúrgueres de carne bovina comercializados em sanduicherias tipo trailers em Goiânia (GO). **Revista de Patologia Tropical.**, v.32, n.1, p.45-52, 2003.

## QUALIDADE DO SAL DE COZINHA COMERCIALIZADO NO MUNICÍPIO DE RIO BRANCO- ACRE

Ianna Andrade Oliveira<sup>1</sup>, Mariana Ennis Figueiredo Barbosa<sup>1</sup>, Marilene Santos de Lima<sup>2</sup>, Layra Lucy Albuquerque<sup>3</sup>, Cydia de Menezes Furtado<sup>4</sup>

1. Universidade Federal do Acre (UFAC), Graduação em Nutrição Bacharelado, Rio Branco, Acre, Brasil;
2. Universidade Federal do Acre (UFAC), Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Rio Branco, Acre, Brasil;
3. Centro Universitário Uninorte, Rio Branco, Acre, Brasil;
4. Universidade Federal do Acre (UFAC), Unidade de Tecnologia de alimentos (UTAL), Rio Branco, Acre, Brasil.

### RESUMO

O sal é fundamental para ressaltar e aumentar o sabor dos alimentos. O produto deve apresentar-se sob a forma de cristais brancos, com granulação uniforme, ser inodoro e ter sabor salino/salgado próprio e adição de iodo. Considerando o grande consumo de sal e o impacto sobre a saúde pública faz-se necessário verificar a qualidade do sal de cozinha. Para isso, foram avaliados os parâmetros físico-químicos dos principais tipos de sal de cozinha comercializados em Rio Branco, Acre. Foram coletadas 3 amostras de lotes diferentes de 5 tipos de sais. As análises físico-químicas para determinação de umidade, cloretos em cloreto de sódio e iodo foram realizadas conforme as normas técnicas do Instituto Adolfo Lutz. Os sais: grosso, rosa e negro do Himalaya, apresentaram valores de iodo fora dos padrões estabelecidos pela RDC N°23/2013, portanto, impróprios para o consumo humano.

**Palavras-chave:** Segurança alimentar, controle de qualidade e análises físico-químicas.

### ABSTRACT

Salt is essential to enhance and enhance the taste of food. The product should be in the form of white crystals, uniformly granulated, odorless and have its own salty / salty taste and added iodine. Considering the high salt consumption and the impact on public health, it is necessary to verify the quality of the cooking salt. For this reason, the physical and chemical parameters of the main types of cooking salt marketed in Rio Branco - Acre were evaluated. Where 3 samples of different lots of 5 types of salts were collected. The physico-chemical variables of determination of humidity, chlorides in sodium chloride and iodine were performed according to the technical norms of the Adolfo Lutz Institute. It was verified that the salts: thick, pink and black of Himalaya, presented values of iodine outside the standards established by RDC N ° 23/2013, therefore, unfit for human consumption.

**Keywords:** Food safety, quality control and physicochemical analysis.

## 1. INTRODUÇÃO

O sal é fundamental para ressaltar e aumentar o sabor dos alimentos. Entretanto, o consumo excessivo de sódio é um dos principais fatores de risco para a hipertensão arterial (ZHAO, 2011 apud SARNO, 2013). A ingestão elevada de sódio também está associada com acidente vascular cerebral, hipertrofia ventricular esquerda e doenças renais (KARPPANEN, 2005 apud SARNO, 2013).

Segundo a ANVISA, a definição de sal para consumo humano refere-se ao “cloreto de sódio cristalizado extraído de fontes naturais, adicionado obrigatoriamente de iodo”. O produto deve apresentar-se sob a forma de cristais brancos, com granulação uniforme, ser inodoro e ter sabor salino/salgado próprio (Decreto nº 75697). Além disso, não pode apresentar sujidades, microrganismos, patogênicos ou outras impurezas. Podem ser adicionados ao sal aditivos, como os minerais (antiumectantes), desde que esteja dentro dos limites estabelecidos pela legislação. O sal pode ser classificado de acordo com a sua composição e processamento (comum, refinado e marinho) e características dos grãos (grosso, peneirado, triturado ou moído) (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

Os sais refinados, após a extração, passam por uma lavagem, são moídos, centrifugados e secos em altas temperaturas. Em seguida, as impurezas são extraídas por peneiração e são adicionados compostos antiumectantes e iodato de potássio, exigidos pela legislação brasileira. O sal grosso sofre um processo de recristalização mais lento, o que explica a formação de cristais maiores (MEDEIROS, 2004 apud PEREIRA, 2008).

O sal de cozinha é uma mistura de alguns sais: NaCl (cloreto de sódio - o constituinte principal, acima de 99%), KIO<sub>3</sub> (iodato de potássio - responsável pela presença de iodo no sal), ferrocianeto de sódio e alumínio silicato de sódio (antiumectantes - responsáveis pela diminuição da umidade do produto) (PEREIRA, 2008).

O sal é composto de 40% de sódio e 60% de cloreto. As necessidades nutricionais de sódio para seres humanos é de, aproximadamente, 500 mg por dia, cerca de 1,2 g de cloreto de sódio (PARANÁ, 2019). Quantidade facilmente obtida com uma alimentação saudável, sem que haja necessidade de adição de sal no preparo de alimentos, mas o consumo médio do brasileiro é de 12,3 g por dia (NAKASATO, 2004). De acordo com o Guia Alimentar para a População Brasileira, a recomendação de sal não deve ultrapassar 5 g de sal por dia, o que equivale 1,7 g de sódio por dia. No Brasil, a partir de dados coletados pela Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) de 2002-2003, estimou-se em 4,7 g/pessoa/dia a quantidade diária de sódio disponível para consumo nos domicílios,

excedendo assim em mais de duas vezes o limite máximo recomendado de ingestão desse nutriente (SARNO, 2013).

No Brasil, em 74,4% da disponibilidade domiciliar de sódio estão presentes em sal e condimentos a base de sal. Na Região Norte a média da população no consumo de sódio na zona urbana é de 4,9 g/p/dia, com um erro padrão de 0,4 e na Zona rural o valor passa para 10,5 g/p/dia, com um erro-padrão de 2,1 (IBGE, 2009).

O sal rosa do Himalaia faz parte do conjunto de sais de rocha que são extraídos em minas e não do mar e por isso possuem uma mistura de cloreto de sódio e outros minerais presentes nas rochas. Os minerais presentes no sal rosa do Himalaia são alumínio, cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, sódio e fosforo (YALÇIN, 2012).

O iodo foi adicionado ao sal pela primeira vez em meados de 1920, mas apenas no ano de 1974 com a Lei 6150 obrigava o fabricante de sal a adicionar no mínimo 10 mg de iodo metalóide por quilo de sal, foi quando a iodação passou a existir no Brasil. De acordo com a Anvisa, o processo de iodação do sal é uma medida adotada em todo o mundo com o objetivo de prevenir distúrbios por deficiência de iodo (DDI), que incluem retardo mental grave e irreversível e surdo-mudez em crianças, anomalias congênitas e bócio.

Os dados do monitoramento do teor de iodo no sal realizado pelo Sistema Nacional de Vigilância Sanitária revelam que o teor médio de iodo é de 35 mg/kg (ANVISA, 2013). A resolução RDC 23/2013, já em vigor no Brasil desde 2013, altera a faixa de iodação do sal de 20 a 60 mg/kg para 15mg/kg a 45 mg/kg.

Considerando o grande consumo de sal e o impacto sobre a saúde pública, se justifica o controle de qualidade do sal de cozinha, proporcionando ao consumidor a oferta de um produto de qualidade com segurança alimentar e, conseqüentemente a melhoria da qualidade de vida da população.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Dos 4 tipos de sais analisados, o sal grosso, sal marinho moído, sal refinado extrafino e o sal rosa do Himalaya moído foram obtidos em uma rede de supermercado no município de Rio Branco, Acre e o sal negro do Himalaya extrafino em um estabelecimento de produtos naturais em razão dele não ser comercializado na rede de supermercado.

Foram analisados 3 lotes diferentes com exceção do sal negro do Himalaya por disponibilizar apenas 2 lotes diferentes no período de realização da pesquisa, totalizando

15 amostras. Cada lote de sal foi analisado em triplicata para as análises de umidade, cloretos de sódio e iodo e depois foram obtidas as médias.

As análises físico-químicas foram realizadas no laboratório de físico-química da Unidade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Acre, conforme a descrição metodológica do Instituto Adolfo Lutz (1985).

## 2.1 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE:

O teor de umidade foi determinado por secagem direta em estufa a 105°C, onde pesou-se 5 g da amostra em capsula de porcelana, previamente tarada. Aquece-se durante 3h. Resfria-se em dessecador com sílica gel e pesa.

Cálculo:

$$100 \times N/P = \text{umidade ou substancias voláteis a } 105 \text{ } ^\circ\text{C por cento m/m.}$$

Onde: N = n° de gramas de umidade (perda de massa em g);

P = n° de gramas da amostra.

## 2.2 DETERMINAÇÃO DE CLORETOS EM CLORETO DE SÓDIO

Este parâmetro é muito importante em uma análise de sal, pois o teor encontrado é classificatório para produto. Na obtenção, pesa-se 5 g da amostra, transfere para um balão volumétrico de 500 mL, com auxílio de 200 mL de água, deixe em repouso por 2h. Complete o volume e agite. Transfira com auxílio de uma pipeta volumétrica, 10 mL dessa solução para um Erlenmeyer de 250 mL. Adicione 50 mL de água e 20 gotas de solução de cromato de potássio a 10%. Titule com solução de nitrato de prata 0,10M.

Cálculo:

$$V \times f \times 0,585/p = \text{cloretos, por cento m/m}$$

Onde: V= n° de mL de solução de nitrato de prata para 0,1 M gasto na titulação

F=fator da solução de nitrato de prata

P=n° de g da amostra usado na titulação

## 2.3 DETERMINAÇÃO DE IODO

O método para dosagem de iodo no sal fundamenta-se na titulação volumétrica do iodo liberado, após a acidificação da amostra adicionada de iodeto de potássio, com solução de tiosulfato de sódio 0,005 M e usando solução de amido como indicador. Pesar 10 g de amostra, transferir para um frasco de iodo de 250 mL com auxílio de 205 mL de água destilada. Agitar até completa dissolução dos cristais. Adicionar 5 mL de solução de ácido sulfúrico 1N e 1 mL de solução de iodeto de potássio a 10%. Iniciar a titulação do iodo liberado, utilizando a solução de tiosulfato de sódio 0,005 N. Usar a solução de amido a 10% como indicador.

Cálculo:

$$V \times f \times 105,8/P = \text{mg de iodo/kg sal}$$

Onde: V=volume em mL de NaS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gasto na titulação

f=fator da solução

p= peso de grama da amostra

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os sais analisados estão de acordo com o Decreto N° 75.697, de 6 de maio de 1975, no qual o sal grosso apresentou menor umidade, assim como menor teor de cloretos de sódio (Tabela1). Entretanto seu nível de iodo está acima do limite permitido de acordo com a RDC N° 23, de 24 de abril de 2013, no qual estabelece um limite de 15 a 45 mg/Kg de iodo por quilograma de sal.

**Tabela 1.** Médias dos teores de Umidade, Cloreto de sódio e iodo obtidos do primeiro lote de sais obtidos no comercio de Rio Branco, AC.

Tipos de sal:	Umidade (%)	Cloretos de sódio (%)	Iodo (mg/Kg)
Sal Grosso	0,4125	19,2926	124,9811
Sal Marinho moído	0,7009	100,6604	34,6763
Sal refinado extrafino	0,6715	105,1584	12,8508
Sal do Himalaya moído	1,0232	65,9355	Ausente
Sal Negro do Himalaya extrafino	0,8043	101,1370	Ausente

O sal do Himalaya moído e o negro do Himalaya extrafino tem a maior porcentagem de umidade e não apresentaram concentração de iodo, o que não está de acordo com a RDC citada a cima e em relação ao rótulo do produto.

O sal refinado extrafino foi o sal que apresentou maior nível de cloretos de sódio no primeiro lote analisado.

Como pode ser visualizado na tabela 2, no segundo lote analisado, o sal grosso apresentou menor teor de umidade, como no primeiro lote, e o maior foi o sal refinado extrafino, diferindo do primeiro lote.

**Tabela 2.** Médias dos teores de Umidade, Cloreto de sódio e iodo do segundo lote de sais obtidos no comercio de Rio Branco, AC.

Tipos de sal	Umidade (%)	Cloretos de sódio (%)	Iodo (mg/Kg)
Sal Grosso	0,3038	107,0088	14,8063
Sal Marinho moído	0,6302	96,8522	31,7011
Sal refinado extrafino	0,6780	121,7269	25,6320
Sal do Himalaya moído	0,4678	104,8496	104,5644
Sal Negro do Himalaya extrafino	0,6487	98,2060	Ausente

A porcentagem referente aos cloretos de sódio o sal grosso apresentou uma diferença discrepante do valor coletado na análise passada. Entretanto mantem-se o maior teor de cloretos de sódio ao sal refinado extrafino. As concentrações de iodo apresentam-se inadequadas no sal grosso, como no primeiro lote, o sal do Himalaya moído, que está acima do recomendado pelo Ministério da saúde de 15 a 45 mg/kg e o sal negro do Himalaya que em contradição com seu rótulo não apresentou iodo.

No terceiro lote analisado (Tabela 3), o sal grosso continua apresentando menor teor de umidade, assim como os dois lotes antecedentes. Sua concentração de cloretos de sódio foi o menor dos sais analisados, seguido pelo sal do Himalaya moído, e o maior foi o sal refinado extrafino.

Diferente dos dois primeiros lotes analisados o sal grosso, sal marinho moído e o sal refinado extrafino estão de acordo com a RDC N°23 de abril de 2013. O sal do Himalaya moído não apresentou iodo assim como no primeiro lote analisado. Essa diferença pode

ser em razão do sal adquirido para a pesquisa ser ofertado em fração e embalado pela rede de supermercado, não podendo afirmar se os sais comercializados são de lotes diferentes.

**Tabela 3.** Médias dos teores de Umidade, Cloreto de sódio e iodo do terceiro lote de sais obtidos no comércio de Rio Branco, AC.

Tipos de sal	Umidade (%)	Cloretos de sódio (%)	Iodo (mg/Kg)
Sal Grosso	0,0019	100,2810	26,3786
Sal Marinho moído	0,0052	104,6791	16,5379
Sal refinado extrafino	0,0039	107,1527	31,9394
Sal do Himalaya moído	0,0022	102,7988	Ausente
Sal Negro do Himalaya extrafino	Não analisado	Não analisado	Não analisado

Nas análises de cloretos, vale ressaltar, que os valores atribuídos não foram retirados sólidos totais insolúveis, por essa razão alguns valores de cloretos excederam 100%. Não sendo possível a verificação conclusiva da quantidade de cloretos de sódio nos sais analisados.

Na média, o sal grosso apresenta o menor teor de umidade e o sal negro e do Himalaya moído apresenta o maior teor (Tabela 4).

**Tabela 4.** Médias geral dos teores de Umidade, Cloreto de sódio e iodo de sais obtidos no comércio de Rio Branco, AC.

Tipos de sal	Umidade (%)	Cloretos de sódio (%)	Iodo (mg/kg)
Sal Grosso	0,2394	75,5274	55,3986
Sal Marinho moído	0,4456	100,7305	27,6384
Sal refinado extrafino	0,4511	111,3460	23,4740
Sal do Himalaya moído	0,4977	91,1946	34,8548
Sal Negro do Himalaya extrafino	0,7265%	99,6715%	Ausente

Em relação aos cloretos de sódio o sal grosso é o que possui menor porcentagem e o maior é o sal refinado extrafino. Pelo ministério da saúde os únicos sais inadequados são o grosso por exceder a concentração máxima e o sal negro por não apresentar iodo.

## 4. CONCLUSÕES

No presente estudo constatou-se que todos os sais analisados estão em conformidade com o DECRETO N° 7.697, de 6 de maio de 1975 em relação a variável umidade.

O sal refinado extrafino e do Himalaya apresentaram valores de cloretos de sódio que ultrapassaram o valor máximo estipulado pela legislação de 99,99%.

O iodo presente nas amostras de sal grosso e sal negro do Himalaya estão inadequados aos valores estabelecidos pela RDC N°23 de 2015 da Anvisa. Os demais sais encontraram-se dentro dos padrões preconizados. Entretanto vale ressaltar a diferença de umidade, cloretos de sódio e iodo nos sais de mesma marca, o que leva a considerar que não há um controle de qualidade no padrão de qualidade dos sais comercializados.

## 5. REFERÊNCIAS

BRASIL. **Decreto n° 75.697, 06 de maio de 1975.** Aprova padrões de identidade e qualidade para o sal destinado ao consumo humano. Brasília, DF, Maio de 1975.

CONSELHO FEDERAL DE NUTRICIONISTAS. **A melhor opção é escolher não exagerar no sal. Blog Saúde.** Disponível em: <http://www.cfn.org.br/index.php/a-melhor-opcao-e-escolher-nao-exagerar-no-sal/>. Acesso em 26 de abril, 2017.

CONSELHO FEDERAL DE NUTRICIONISTAS. **Publicada a norma sobre iodação do sal para consumo humano.** Ascom Anvisa. Disponível em: <http://www.cfn.org.br/index.php/legacy-1378/>. Acesso em 26 de abril, 2017.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.

NAKASATO, M. **Sal e hipertensão.** Rev Bras Hipertens., n.11, n.2, 95-97, 2004.

OLIVEIRA, J.C.M. **Ministério da Saúde, Resolução da - RDC N° 23, de 24 de abril de 2013.** Ministério da Saúde. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/res0023\\_23\\_04\\_2013.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/res0023_23_04_2013.html) Acesso em: 26 de abril 2017.

ESTADO DO PARÁ. **Os desafios da escola pública paranaense na perspectiva do professor pdf.**

Disponível:<[http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/cadernospde/pdebusca/producoes\\_pde/2014/2014\\_ufpr\\_cien\\_pdp\\_luciane\\_marilis\\_dupchak.pdf](http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/cadernospde/pdebusca/producoes_pde/2014/2014_ufpr_cien_pdp_luciane_marilis_dupchak.pdf)> Acesso em: 07 fev. 2019.

PEREIRA, A.V.; et al. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de sal de cozinha. **Iniciação Científica Cesumar.**, v.10, n.2, p.97-101, 2008.

PORTAL SAÚDE. **Redução de Sódio, Açúcar e Gordura Trans.** Departamento de Atenção Básica. Promoção da Saúde e da Alimentação Saudável. Disponível em: <[http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape\\_promocao\\_da\\_saude.php?conteudo=reducao](http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape_promocao_da_saude.php?conteudo=reducao)> Acesso em 27 de abril, 2017.

PUFF, J. **Brasileiro consome mais que o dobro do sal recomendado pela OMS.** BBC News Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <[http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2014/08/140812\\_reducao\\_sodio\\_jf\\_kb](http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2014/08/140812_reducao_sodio_jf_kb)> Acesso em 13 de agosto de 2014.

SARNO, F.; et al. Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira, 2002-2003. **Rev. Saúde Pública.**, v.43, n.2, p.219-225, 2009.

SARNO, F.; et al. Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira, 2008-2009. **Revista de Saúde Pública.**, v. 47, n.3, p.571-578, 2013.

## ESTATÍSTICA DESCRITIVA E SUAS APLICAÇÕES

**Gleison Guardia, Leonardo Mota de Andrade**

1. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Ji-Paraná, Rondônia, Brasil.

### RESUMO

O objetivo do presente capítulo é esclarecer alguns conceitos e utilizar a ferramenta Excel para determiná-los, por isso, no passo a passo que nos propomos a fazer, acreditamos ter orientado o leitor no uso desta ferramenta e na construção do conceito estatístico. Sendo assim, consideramos que nossa proposta tenha atingido seu objetivo, permitindo ao iniciante no estudo científico e laboratorial, construir um Banco de Dados, manipulá-lo gerando seus relatórios tabelas, gráficos e medidas de análises mais aprofundadas.

**Palavras-chave:** Estatística, banco de dados e excel.

### ABSTRACT

The purpose of this chapter is to clarify some concepts and use the Excel tool to determine them, so in the step by step we propose to do, we believe we have guided the reader in the use of this tool and the construction of the statistical concept. Therefore, we consider that our proposal has reached its goal, allowing the beginner in the scientific and laboratory study, to build a Database, to manipulate it generating its reports tables, graphs and more detailed analysis measures.

**Keywords:** Statistics, database and excel.

## 1. INTRODUÇÃO

Em todos os momentos de nossa vida estamos tomando decisões que nos orientam no que fazer e em que caminhos seguir, em alguns momentos acertamos, em outros erramos, porém, todo o nosso direcionamento depende da escolha que fazemos e ninguém pode ver além delas. Esta prática corriqueira e usual nos define, Em alguns momentos nos aproximando, e em outros momentos, também nos distanciando, tornando o mundo mais diverso, atraente e interessante de se viver.

No meio acadêmico, nas pesquisas científicas ou sociais, devemos minimizar ao máximo os erros, exigindo assim uma tomada de decisão ou escolha mais acertada, para possibilitar avanços e reproduções confiáveis de conceitos revelados. Nestas condições as tomadas de decisões não podem ser baseadas em vontades ou intuições, devemos

proceder embasado em informações que nos justifiquem naquele momento, tornando comum o consenso mesmo entre pessoas de pensamentos divergentes.

A Estatística é uma ciência que permitirá a tomada de decisões e posicionamentos frente a um fenômeno ou escolha, baseando-se em informações e análises de cálculos matemáticos, nutridos e regidos por raciocínios lógicos e conceitos fundamentalizados. Sua aplicabilidade serve de base irrefutável (quando feita corretamente) para as afirmações dentro do meio acadêmico/científico. Isto fundamentaliza-se com rigorosos e detalhados processos que devem seguir um ritual descritivo, garantindo a imparcialidade, honestidade e veracidade das conclusões tomadas, referenciadas em suas análises (PINTO, 2013).

Baseando-se em dados coletados para uma análise, a Estatística Descritiva tomará para si a missão de subsidiar a análise e conclusão sobre os dados que se dispõem. A Inferência Estatística, permitirá concluirmos e nos posicionarmos em previsões para análises ou fenômenos futuros de eventos estudados. A Estatística Probabilística nos permitirá um estudo das condições favoráveis à reprodução de um evento dentro de um espaço amostral definido BUSSAB (2006). Assim sendo, em suas divisões elas se completam, não impedindo porém, o seu estudo em separado. Neste capítulo restringiremos ao estudo da Estatística Descritiva e suas ferramentas de análise.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 POPULAÇÃO

Definir a população em Estatística é obrigatoriedade que se tem em dizer com que tipo de sujeitos se deseja trabalhar. Numa pesquisa, podemos envolver em objetos de estudos, uma variedade distinta e enorme de elementos, das quais podemos citar: - pessoas, objetos, fenômenos, elementos naturais, reações etc. Quando delimitamos a população, orientamos nossos leitores sobre os procedimentos específicos que este tipo de sujeitos, nos levará a adotar durante a abordagem e coleta de dados necessários aos objetivos (TRIOLA, 2005).

### 2.2 AMOSTRA

Torna-se evidente e consensual que o trabalho com análises estatísticas de uma população nem sempre é possível. Como exemplo podemos citar que numa análise bacteriológica de um lago, ser inviável a análise de todas as moléculas de água que o compõem, consentimos que algumas quantidades retiradas do todo, (lago) poderá

representa-lo. Isso caracteriza a amostra dentro do espaço maior chamado de população, TRIOLA (2005). Assim sendo, entende-se por amostra a parte possível de análise de uma população previamente escolhida.

Vamos aqui considerar duas situações básicas para a construção da amostragem numa pesquisa científica: 1º Se faz a coleta da amostra, já definida nos capítulos anteriores, coletando-se apenas o necessário para a análise, procedendo com o uso e interpretação de todas as amostras disponíveis, que disporemos a seguir no uso das medidas estatísticas para a tomada de decisão; 2º Nos dispomos em analisar uma informação retirada de um Banco de Dados, contendo inúmeras amostras armazenadas ao longo do tempo, ou como resultados de várias pesquisas anteriormente analisadas. O primeiro caso é simples e deve-se proceder direto com as análises, já no segundo, necessita-se de uma nova amostragem dentro deste Banco de Dados, neste sentido propomos dois casos, Amostragem Periódica e Amostragem Aleatória.

Amostragem Periódica consiste em listar o banco de dados em intervalos pré-determinados, coletando a informação correspondente do número presente na sequencia estabelecida. Podemos citar como exemplo, uma amostragem feita com alunos regularmente matriculados em uma Instituição, onde listamos seus números de Matrículas, decidindo como exemplo, usar as informações dos sujeitos retirados periodicamente, para que essa informação seja precisa, primeiramente definimos o tamanho da amostra que queremos dentro do universo do Banco de Dados. Digamos que neste caso temos 1500 alunos e queremos 100 amostras para análise. Devemos primeiramente estabelecer qual será o intervalo de amostragem que teremos, para tanto dividiremos o total de alunos pelo total de amostras desejadas:

$$Ap = \frac{Bd}{n} \text{ onde } \begin{cases} Ap = \text{Amostra Periódica} \\ Bd = N^\circ \text{ de Amostras do Banco de dados} \\ n = N^\circ \text{ de amostras desejadas} \end{cases}$$

Logo teremos:

$$Ap = \frac{1500}{100} \rightarrow Ap = 15.$$

Assim, o período de extração de amostra será num intervalo de 15 pontos na sequênci, sendo as amostras na ordem: {15º, 30º, 45º, 60º ....1500º} a grande vantagem

deste tipo de seleção de amostra, é a representatividade mais precisa que conseguimos da dimensão do Banco de Dados, devido sua característica, a seleção retira valores de toda a sua extensão, garantindo alunos de todos os períodos.

Amostragem Aleatória caracteriza-se por ser uma amostragem onde a escolha não segue um padrão, ela acontece ocasionalmente dentro do Banco de Dados, apenas definimos quantas amostras queremos, e sujeitos são retirados ao acaso, até que se atinja a quantidade desejada. Neste tipo de amostragem podemos ter números próximos, e não teremos garantias de que todas as classes serão representadas, ainda devemos considerar que, como o sorteio é ao acaso, praticamente é impossível repetir a seleção da amostra e obtermos os mesmos valores.

### 2.3 SELECIONANDO AMOSTRAS NO EXCEL

Dispomos de vários softwares que permitem o tratamento dos dados estatísticos de uma pesquisa, para tantos, se faz necessário o download, licença ou instalação de algum destes dispositivos, além do conhecimento do uso da ferramenta adotada. Pensando nestes princípios, passamos a considerar o Excel como ferramenta para esses cálculos, pelo princípio básico de que em sua grande maioria, os computadores utilizam-se de softwares da Microsoft, e o Excel como um office desta empresa, já está instalado nas máquinas, não necessitando assim da sua aquisição, o que nos remete apenas à segunda parte, referente aos conhecimentos do uso desta ferramenta. Propomos assim, fazer o tratamento dos dados com este programa, limitando-nos a demonstrar de maneira simples, como utiliza-lo para esta finalidade.

Primeiramente devemos instalar o aplicativo do Excel que fará estas tarefas. Na figura 1 deste capítulo, apresentamos o local onde se encontra esta ferramenta no Excel 2010, em outras versões difere-se apenas desta opção estar no próprio ícone do programa.

Seguindo estes 6 passos que descrevemos na Figura 01, o pacote de Estatística estará habilitado no programa, e disponível no canto superior direito da ferramenta Dados, conforme figura 2.

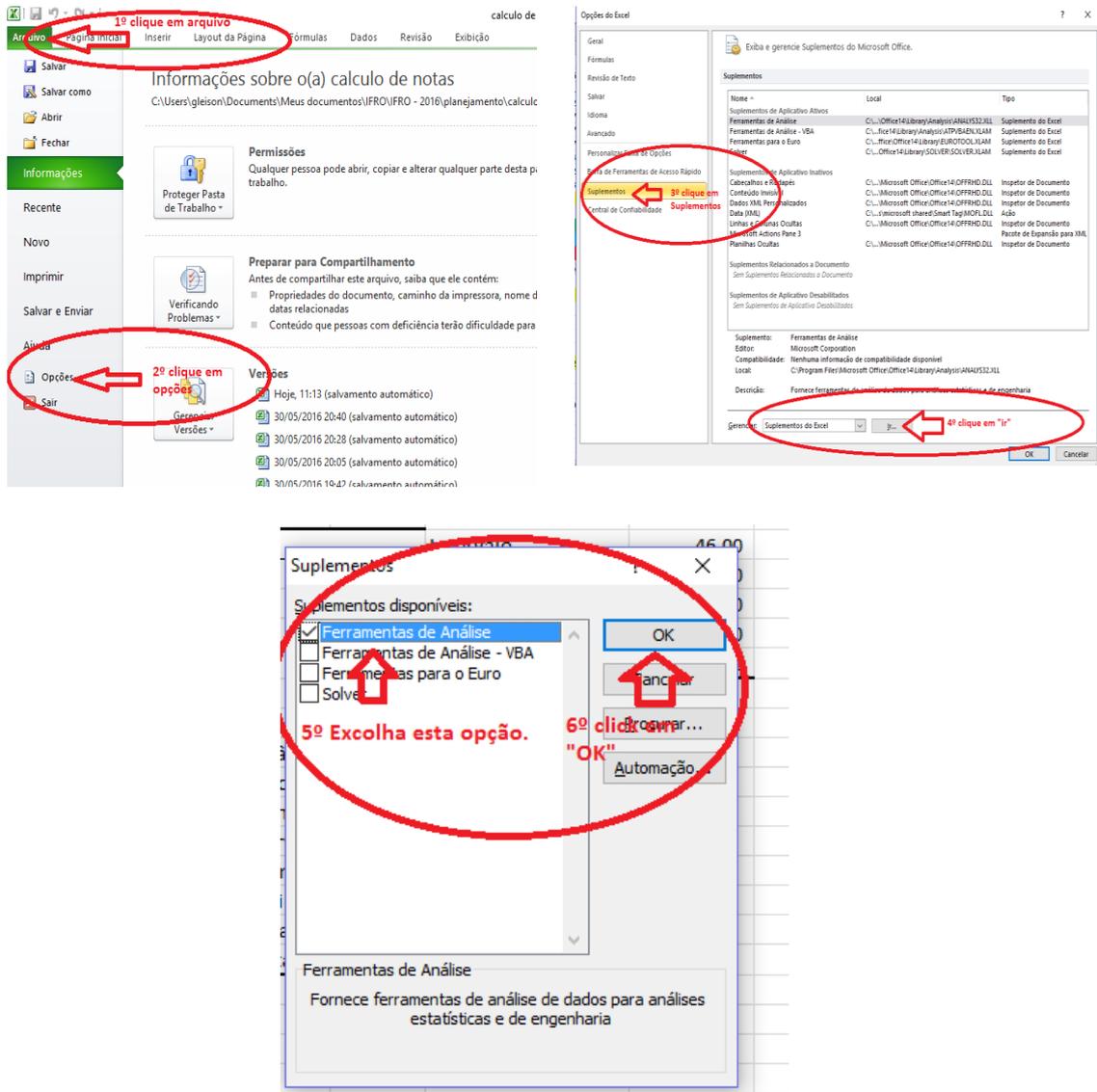


Figura 1. Roteiro de instalação das Ferramentas Estatísticas no Excel 2010.  
 Fonte: Próprio Autor.

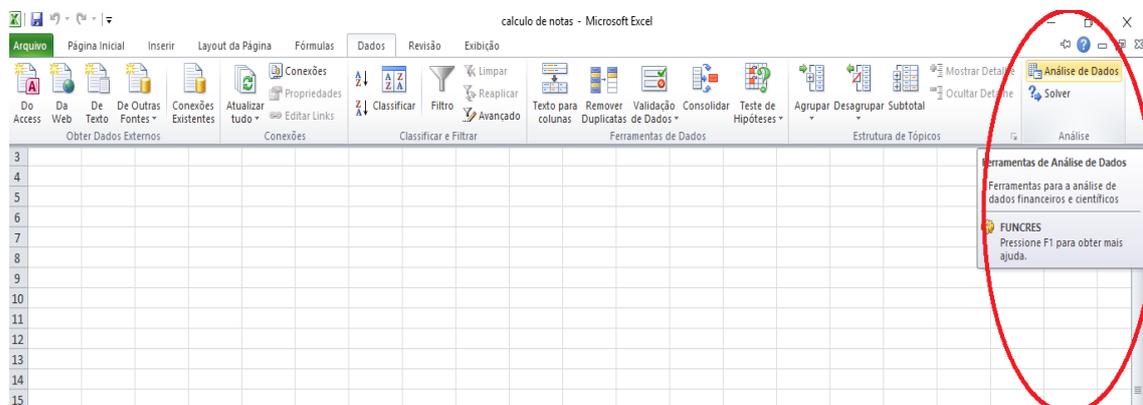


Figura 2. Análise de Dados Instaladas  
 Fonte: Próprio Autor

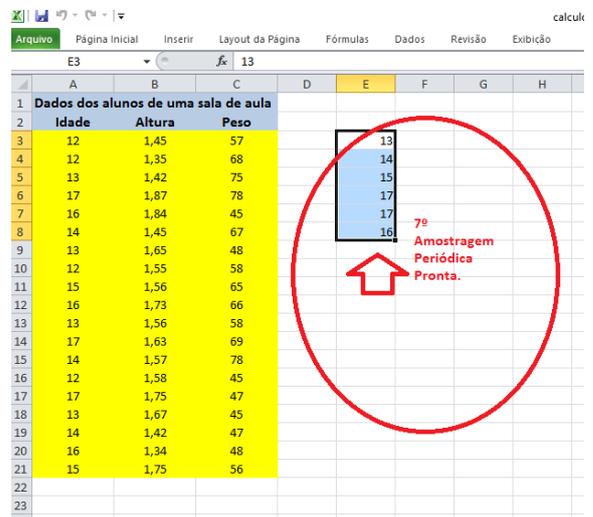
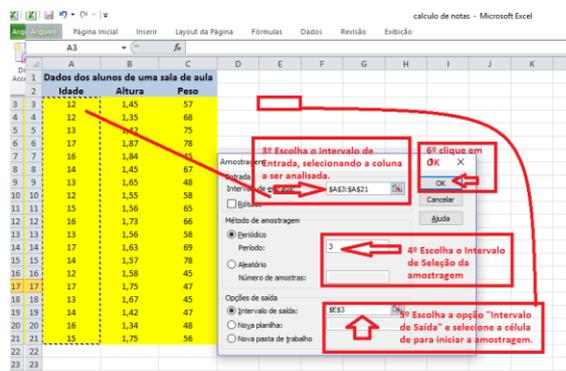
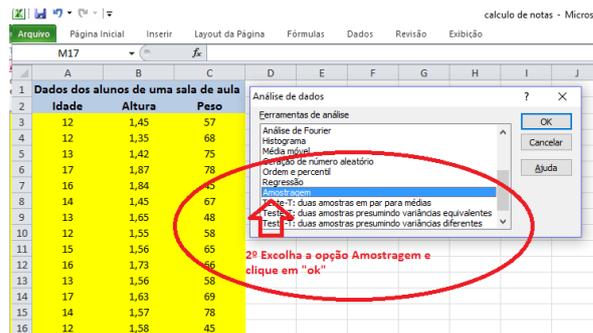
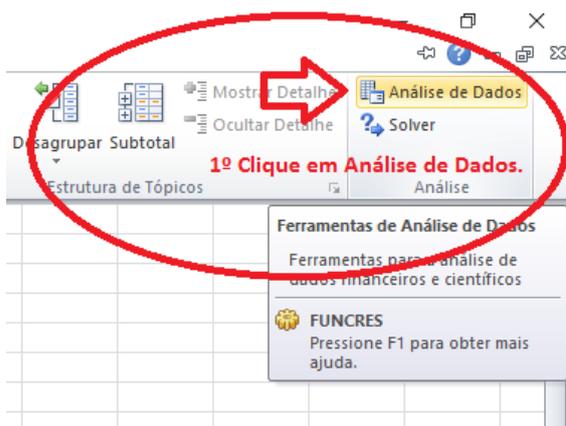
Partimos do princípio que um banco de dados foi montado utilizando as linhas e colunas do Excel, e que se deseja selecionar amostras dentro deste banco de dados. Geralmente utilizam-se as colunas para os tipos de variáveis e as linhas para as amostragens coletadas. A figura 3 apresenta uma simulação de banco de dados para exemplificação no nosso artigo.

	A	B	C
1	<b>Dados dos alunos de uma sala de aula</b>		
2	<b>Idade</b>	<b>Altura</b>	<b>Peso</b>
3	12	1,45	57
4	12	1,35	68
5	13	1,42	75
6	17	1,87	78
7	16	1,84	45
8	14	1,45	67
9	13	1,65	48
10	12	1,55	58
11	15	1,56	65
12	16	1,73	66
13	13	1,56	58
14	17	1,63	69
15	14	1,57	78
16	12	1,58	45
17	17	1,75	47
18	13	1,67	45
19	14	1,42	47
20	16	1,34	48
21	15	1,75	56
22			

Figura 3. Exemplo de Banco de Dados

Fonte: Próprio Autor

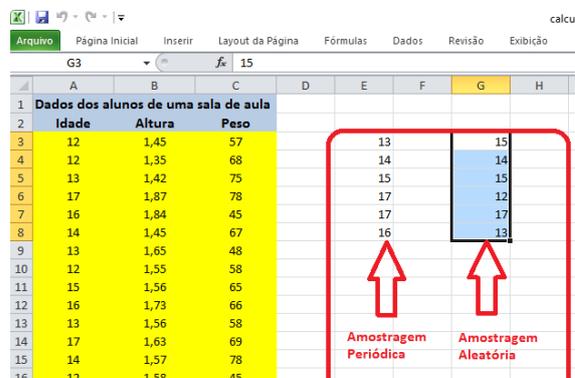
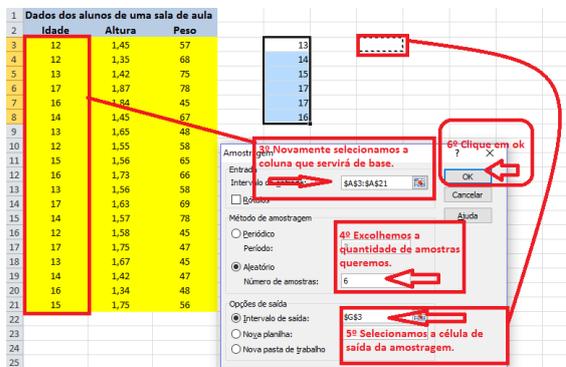
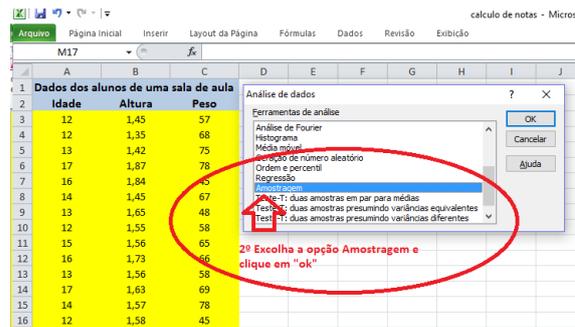
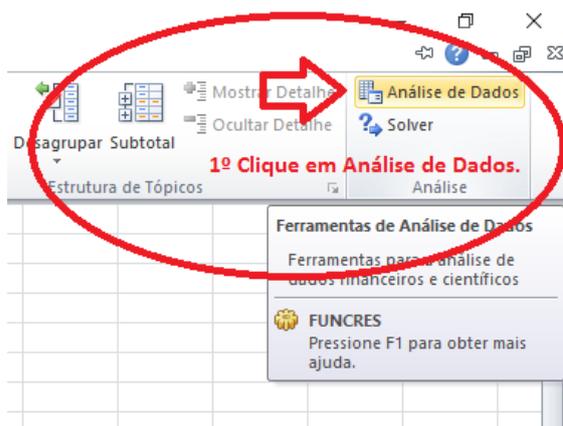
Na figura 4, teremos uma sequência de imagens para exemplificar a seleção de uma Amostra Periódica. Nela descreveremos todos os atalhos que devem ser utilizados para este fim.



**Figura 4.** Selecionando uma Amostragem Periódica  
Fonte: Próprio Autor

Na figura 5, teremos uma sequencia de imagens para exemplificar a seleção de uma Amostra Aleatória. Nela descreveremos todos os atalhos que devem ser utilizados para este fim.

Na análise das duas imagens, verificamos de imediato que embora ambas sejam retiradas de um mesmo banco de dados, a Amostragem Aleatória sempre produzirá resultados diferenciados conforme são executadas. Este recurso no *Excel* permitirá seleções em grandes bancos de dados, possibilitando um trabalho rápido, sem interferência humana, e aceitável dentro de uma pesquisa científica.



**Figura 5.** Selecionando uma Amostragem Aleatória  
Fonte: Próprio Autor

## 2.4 VARIÁVEIS

Dentro de uma pesquisa (dependendo do tipo de pesquisa) podemos ter dois tipos de variáveis: - as qualitativas e as quantitativas. As variáveis qualitativas, comuns em pesquisas sociais, podem apresentar-se em duas formas: - qualitativas nominais, quando se referem basicamente a adjetivos que os distinguem (cor dos olhos, cabelo, sexo, etc), qualitativas ordinais, quando a variável tem uma ordem de organização (formação acadêmica, posição em uma corrida, opinião sobre certo produto, etc). O foco deste trabalho, seguindo a coerência deste livro, será para as variáveis quantitativas, descritas no paragrafo a seguir.

Variáveis Quantitativas são basicamente todo tipo de variável que se utiliza de valores para se representar, podemos descrever as quantitativas discretas, que apresentam

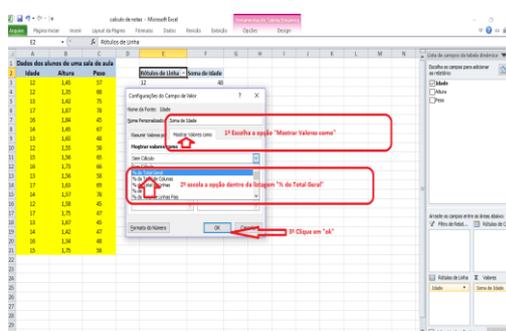
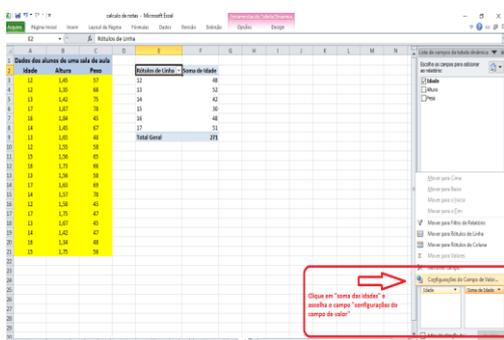
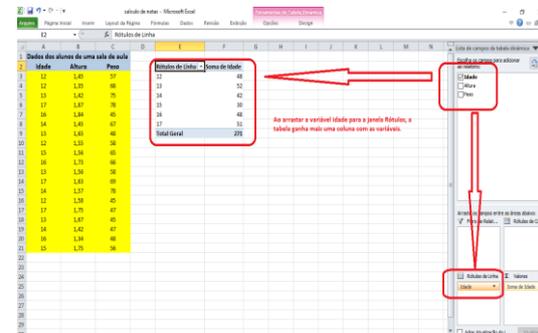
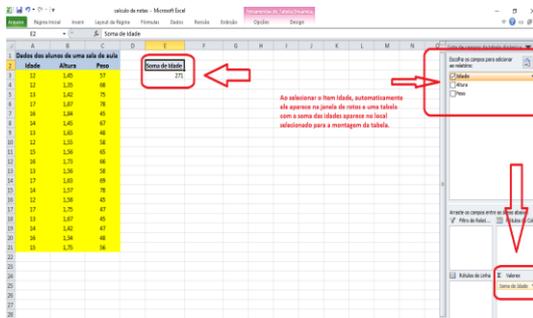
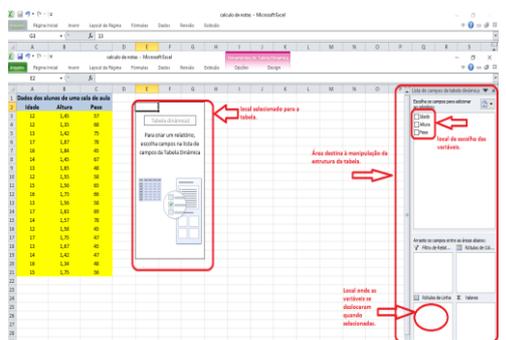
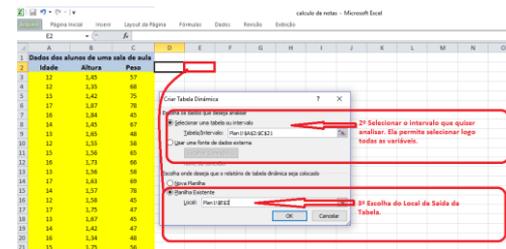
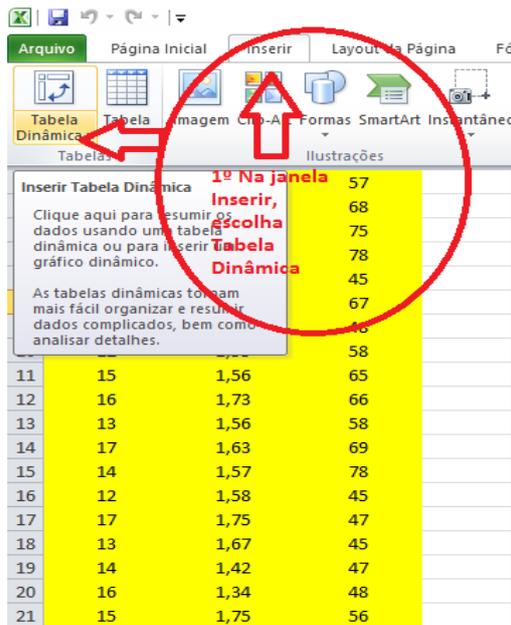
como valores números inteiros, e as quantitativas contínuas que apresentam como valores, números racionais. Tomando com princípios as pesquisas feitas em laboratórios, basicamente utilizaremos estes dois tipos de variáveis para mensurar os resultados produzidos, assim sendo, nossos estudos apresentaram basicamente este tipo de informação nos seus bancos de dados.

## 2.5 TABELAS

A construção de tabelas é uma forma de apresentação dos dados organizadamente, ela servirá de base para os gráficos e as análises que deverão ser feitas, como também para publicações como forma de apresentar o banco de dados resumidamente e de forma acessível. Poderemos ter tabelas onde a quantidade de variáveis distintas serão pequenas, permitindo que cada uma seja representada (variável idade de nosso banco de dados), porém também poderemos ter muitas variáveis distintas numa análise, exigindo assim um agrupamento destas amostras em intervalos de classes, para uma melhor apresentação dos dados, (variável da altura ou peso, apresentado em nosso banco de dados). Estudaremos a forma de trabalhar com os dois casos:

A figura 6 trás uma sequência de imagens que permite a construção destas tabelas para dados não agrupados; utilizaremos aqui todos os dados do Banco de Dados, devido estarmos representando uma pesquisa onde o Banco será todo analisado.

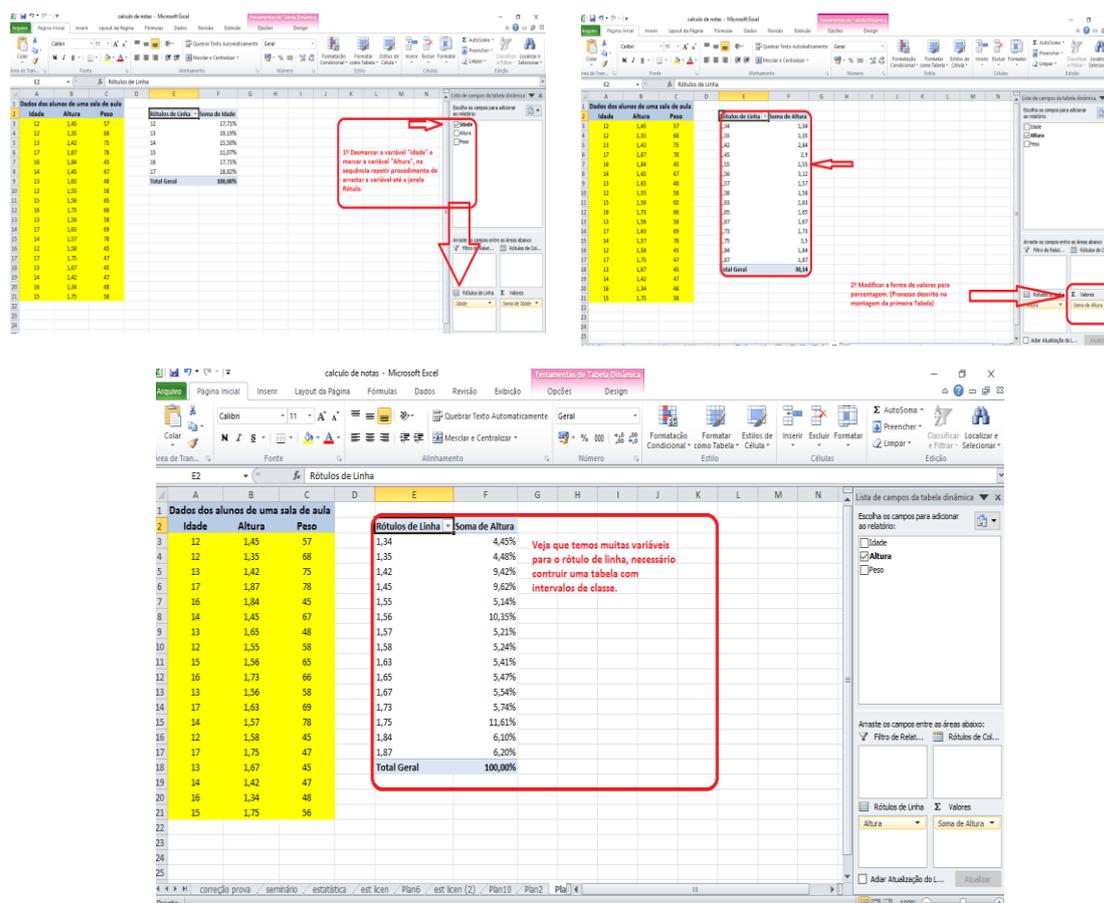
A figura 6 trás essa sequência para a variável “idade”, porém, para montar a tabela das outras variáveis, basta apenas remover a “idade” da janela de rotos, “selecionar” e arrastar para a mesma a variável desejada; o restante do procedimento será semelhante. A figura 7 trará uma sequência de imagens exemplificando a construção de uma tabela para dados agrupados, utilizando a variável altura do nosso banco de dados:



Idade	Altura	Peso	Porcentagem
12	1,40	37	17,71%
12	1,45	68	15,50%
13	1,42	75	11,07%
13	1,87	78	17,71%
16	1,84	45	18,82%
14	1,45	67	
13	1,65	48	
12	1,55	58	
15	1,56	65	
16	1,79	66	
13	1,56	58	
17	1,63	69	
14	1,57	78	
12	1,58	45	
17	1,75	47	
13	1,67	45	
14	1,42	47	
16	1,34	48	
15	1,75	56	
<b>Total Geral</b>			<b>100,00%</b>

Os dados se apresentarão em frequência percentual.

Figura 6. Montagem de uma tabela Dinâmica – Dados não agrupados  
Fonte: Próprio Autor



**Figura 7.** Montagem de uma tabela Dinâmica – Dados agrupados  
 Fonte: Próprio Autor

Observe que a tabela com os dados da variável “altura” possui muitas linhas, devido a grande variedade de informações distintas para essa informação. Apresentar os dados desta forma torna-se pouco produtivo, logo então, devemos modificar esta tabela para intervalos de classes. Seguindo as recomendações de Pinto (2013), iremos determinar o numero de classes e o intervalo apropriado para esta distribuição.

Para determinar o número de classes (**k**), devemos utilizar a Regra de Sturges, que determina:

$$K=1+3,3\log(n)$$

Onde: **k** é o número de classes que a distribuição terá e **n** representa o número de elementos da distribuição. Nossa tabela possui **n=19**, assim sendo:

$$K=1+3,3\log(n)$$

$$K=1+3,3\log(19)$$

$$K=1+3,3(1,28)$$

$$K=5,22$$

**Por critério de arredondamento k=5**

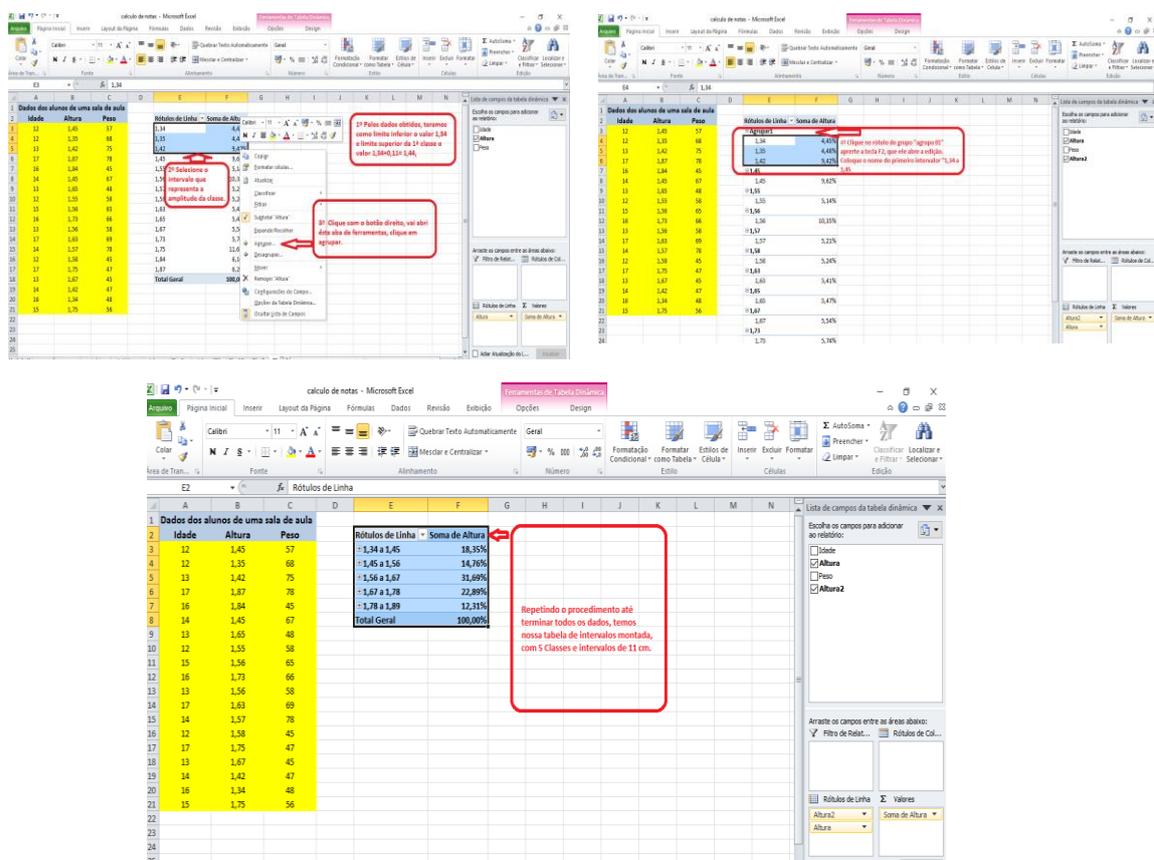
A nossa tabela tendo  $k=5$ , significa dizer que ela deverá ter no máximo 5 classes. Tendo determinado esta informação, devemos agora calcular a amplitude das classes, que chamaremos de  $h$ . Ela é dada pela razão entre a diferença do Valor Máximo (limite superior da distribuição) e Valor Mínimo (limite inferior da distribuição) por  $k$ .

$$h = \frac{AT}{k} \rightarrow \frac{Vmax - Vmin}{k}$$

$$h = \frac{1,87 - 1,34}{5} \rightarrow \frac{0,53}{5} \rightarrow 0,106$$

$$h = 0,11$$

Após os cálculos, percebe-se que a nossa tabela de dados agrupados terá, 5 linhas de variáveis com e cada intervalo terá o comprimento de 11cm. A figura 8 apresenta a sequência de imagens que demonstram como construir tal tabela no Excel.



**Figura 8.** Montagem de uma tabela Dinâmica – Dados agrupados – Montando Intervalos  
Fonte: Próprio Autor

Observe que a tabela ficou reduzida, com a frequência acumulada de cada intervalo, permitindo assim uma visão mais resumida da variável “Altura”. Este tipo de procedimento sempre será recomendado para dados com variáveis contínuas (não inteiras) pela grande diversidade de valores, o que na construção das tabelas e gráficos, levaria a uma confusão maior do que a informação que se deseja transmitir ao leitor.

## 2.6 GRÁFICOS

A construção dos gráficos é uma forma de expressar geometricamente as informações contidas nas tabelas. Sua relevância é inegável devido a grande quantidade de informações que podem ser disponibilizada na linguagem visual, além de, apresentar possibilidades diversas de figuras e formatos. Um cuidado que se deve ter ao escolher um gráfico, restringe-se basicamente no cuidado e bom senso para que ele informe e não confunda o leitor.

Existem disponíveis no programa Excel, uma variedade considerada de tipos de gráficos, permitindo no momento de sua construção, visualizar um à um, escolhendo o mais adequado. Alguns princípios iniciais são recomendados pela literatura, e devemos levar em consideração. Informações com poucas variáveis podem ser apresentadas com gráficos de setores, no caso com muitas variáveis não se recomenda, devido gerar mais confusão do que informação. Informações com tabelas onde as variáveis são agrupadas gerando intervalos de classe, devem-se utilizar basicamente o Histograma e o Polígono de Histograma, podendo ser representado pelo gráfico de linhas.

A figura 9 apresenta a sequência de imagens que demonstram sugestões e orientações de construção de gráficos, demonstrando principalmente como construir um histograma.

A construção dos outros tipos de gráficos serão semelhantes e apresentam características mais simples, o que geralmente ocasionam dúvidas são os histogramas que foram descritos pela figura acima.

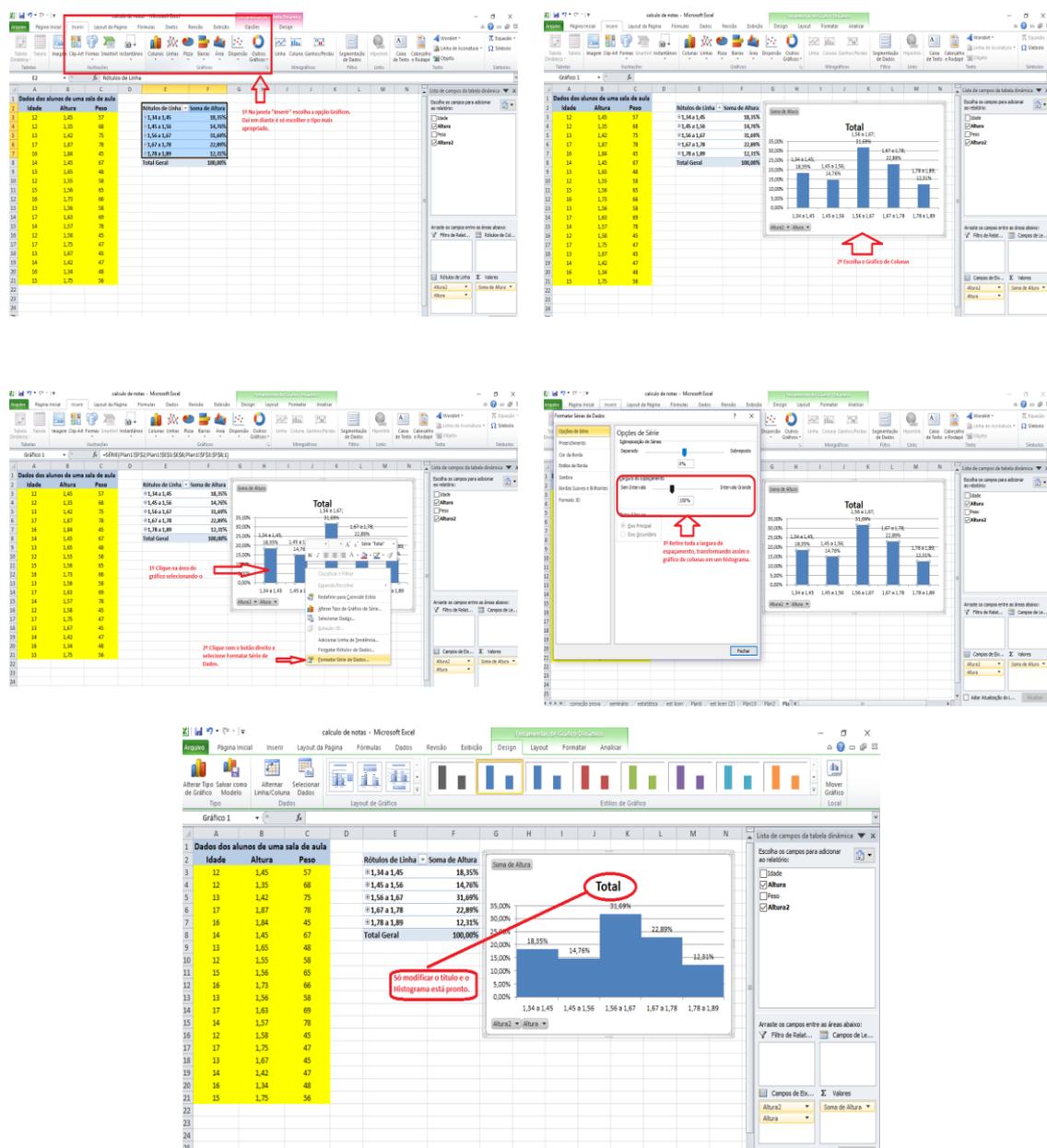


Figura 9. Construindo Gráficos – histograma  
Fonte: Próprio Autor

## 2.7 MEDIDAS ESTATÍSTICA PARA DADOS QUANTITATIVOS

### 2.7.1 Medidas de Posição;

As Medidas de Posição ou Centralidade tem com característica permitir uma análise mais central dos dados, nela podemos estudar o que acontece no meio da distribuição, verificando principalmente a tendência em que os dados se apresentam. São três as principais, Média, Moda e Mediana.

A Média tem como característica principal nivelar todos os dados, ele expressa um resumo dessas informações, permitindo compreender a centralidade onde a concentração é maior. O grande problema da média é que os extremos influenciam nos dados, e tendo um dado discrepante (*outliers*), tende a interferir no seu valor. (REIMANN *et al.*, 2008)

A mediana tem a característica de apresentar o dado central da distribuição, não dependendo de valores extremos (*outliers*) ela é uma medida de posição. Ela representa 50% das amostras e sua localização dentro da distribuição. Por essa características, quando temos valores muitos extremos dentro de uma distribuição de amostras, se torna mais eficiente utilizar as Medidas Estatísticas que baseiam-se na mediana e não na média.

A moda é uma medida que representa os dados mais próximos, pela sua característica ela representa o valor mais repetitivo. Quando temos uma distribuição de com intervalos de classe, a proximidade dos dados e sua concentração numa região, automaticamente irão gerar uma classe mais concentrada, representando assim uma classe moda. Podem existir também, numa pesquisa com dados discretos, onde não seja montada uma tabela com intervalos de classe, não ocorrer frequências que se destaquem das demais, determinando o que chamamos de distribuição amodal.

### **2.7.2 Medidas de Dispersão**

As Medidas de Dispersão apresentam como característica principal, medir o quanto os dados se distanciam da centralidade. Uma vez que compreendemos como eles se organizam no centro da distribuição, investiga-se aqui o quanto eles estão longe desse eixo central e os motivos que os levaram a tal procedimento. Dentre as medidas destacamos: - Variância, Desvio Padrão, Coeficiente de Variação, Assimetria e Curtose.

Variância é uma medida estatística que mede a área do polígono que comporta as principais medidas distante da centralidade, quanto menor esta medida, menor e a dispersão, fazendo com que os dados sejam mais concentrados na tendência central das amostras.

O desvio padrão permite encontrar o que poderíamos chamar de lado do polígono que gera a variância, ele trás uma dimensão da distância da média dos dados em relação a Media Aritmética.

O Coeficiente de Variação tem a característica de permitir comparar dispersões com unidades de medidas diferentes. Ele apresenta os dados em uma margem percentual dos desvios, transformando unidades diversas em uma mesma unidade de medida e dimensão, “percentual”.

Assimetria é uma medida que permite verificar a distribuição dos dados dentro de uma análise estimada como ideal. Nos dados Simétricos (concentração ideal), os extremos da distribuição tem frequência bem menor que os dados das distribuições centrais. Chama-se assimetria positiva ou negativa qualquer distorção desta relação. A tabela 1 abaixo apresenta essa informação dentro das variações possíveis.

Tabela 1. **Dados Simétricos**

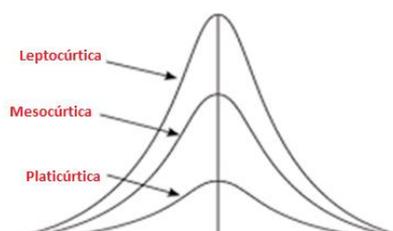
Medida	Interpretação
$As \geq 1$	Assimétrica Positiva
$1 < As < 0,15$	Assimétrica Positiva Moderada
$0,15 \leq As \leq -0,15$	Simétrica
$-0,15 < As < -1$	Assimétrica Negativa Moderada
$As \leq -1$	Assimétrica Negativa

Curtose é uma medida de dispersão relativa à quantidade de frequência das classes envolvidas, quando temos uma distribuição onde as menores classes e as maiores apresentam uma distribuição relativamente menor que as classes centrais, porém a taxa de diferença não é abrupta, temos uma curtose ideal que a designamos por Mesocúrtica. Quando a distribuição apresenta uma frequência muito grande nas classes centrais em relação às classes dos extremos, temos uma distribuição Leptocúrtica. Platicúrtica será uma distribuição onde a diferença da frequência das classes centrais é pouco diferente as classes extremas. A tabela 2 abaixo representa essa distribuição:

Tabela 2. **Dispersão relativa**

Mesocúrtica	Leptocúrtica	Platicúrtica
$C = 0,263$	$C < 0,263$	$C > 0,263$

Em resumo temos:



**Figura 9.** Dispersão relativa

A construção desses dados no Excel é extremamente simples, e apresentaremos uma sequência de imagens na figura 10, demonstrando como construí-los:

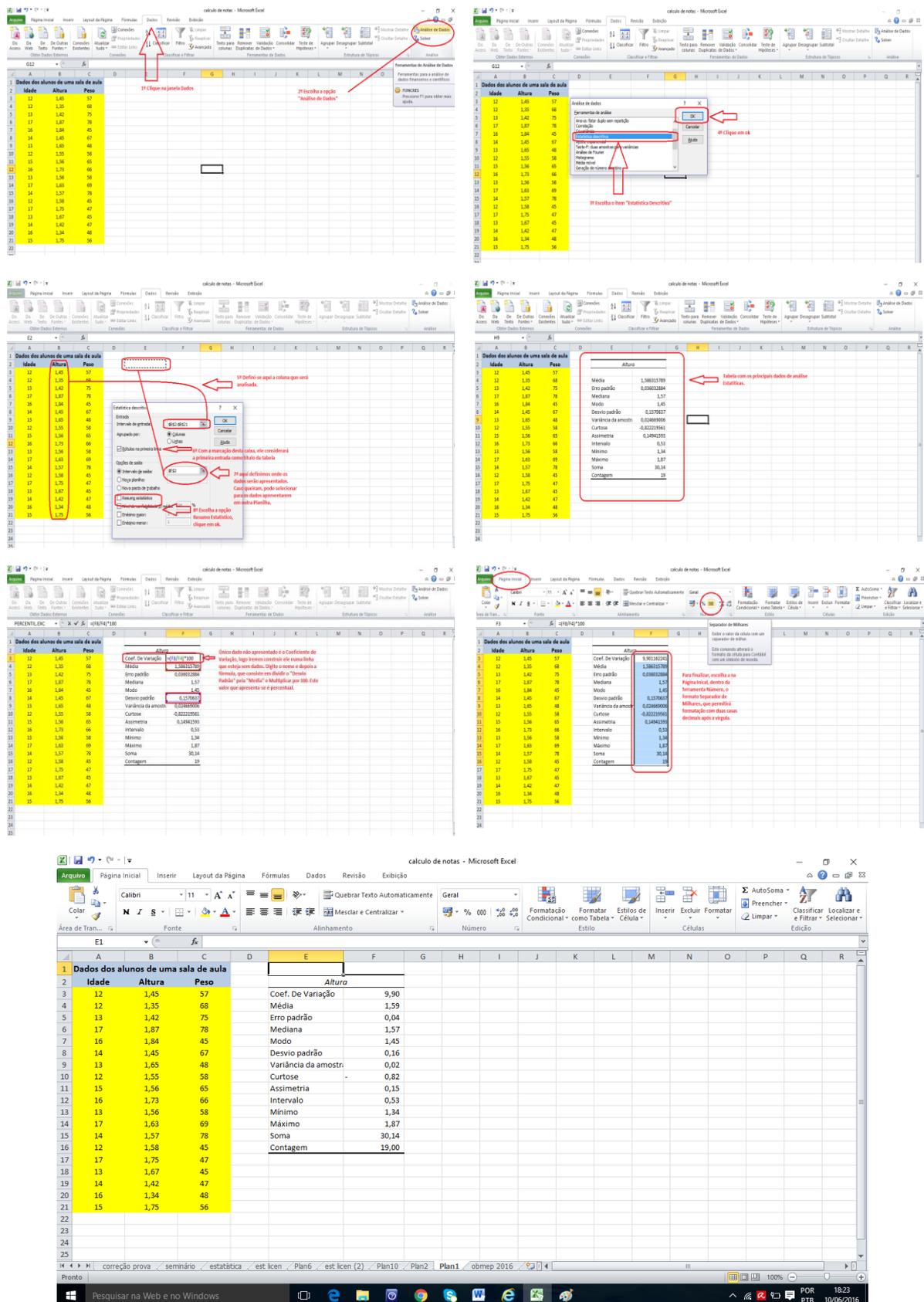


Figura 10. Construindo Gráficos – histograma  
Fonte: Próprio Autor

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este roteiro aqui apresentado, acreditamos que se tornou possível o tratamento inicial dos dados estatísticos, permitindo a maioria das interpretações necessárias ao estudo de um trabalho científico. Existem outras análises, testes, que um determinado estudo pode exigir, e todos eles se encontram dentro da janela “Análise de Dados” onde, no início definimos tipo de “Amostragem” e na figura anterior fizemos o “Resumo Estatístico”.

O objetivo do presente capítulo foi esclarecer alguns conceitos e utilizar a ferramenta Excel para determiná-los, por isso, no passo a passo que nos propomos a fazer, acreditamos ter orientado o leitor no uso desta ferramenta e na construção do conceito estatístico. Sendo assim, consideramos que nossa proposta tenha atingido seu objetivo, permitindo ao iniciante no estudo científico e laboratorial, construir um Banco de Dados, manipulá-lo gerando seus relatórios tabelas, gráficos e medidas de análises mais aprofundadas.

### 4. REFERÊNCIAS

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística Básica**. 5 ed. São Paulo: Saraiva, 2006.

LARSON, R.; FARBER, B. **Estatística Aplicada**. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

LEVIN, J.; FOX, J.A. **Estatística para Ciências Humanas**. 9 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

PINTO, S.S. **Estatística**. v1: Porto Alegre, 2013.

REIMANN, C; FILZMOSER, P; GARRETT, R; DUTTER, R. **Statistica data analysis explained**. Applied environmental statistics with R. 1ª ed. Chichester. Ed. John Wiley & Sons, 2008.

TRIOLA, M.F. **Introdução à Estatística**. 9 ed. Rio Janeiro: LTC, 2005.

## CULTIVO DE MINI-CORAÇÕES COMO PROPOSTA DE FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA TRIDIMENSIONAL (3D)

**Carolina Pontes Soares<sup>1</sup>, Isac de Almeida Barbosa Neto<sup>1</sup>, Natasha de Souza Pontes<sup>1</sup>, Francimar Leão Jucá<sup>2</sup>, Layra Lucy Albuquerque<sup>1</sup>, Cydia Furtado<sup>2</sup>**

1. Centro Universitário Uninorte, Rio Branco, Acre, Brasil;

2. Universidade Federal do Acre (UFAC), Rio Branco, Acre, Brasil.

### RESUMO

Pesquisadores investem em tecnologias para desenvolver de ferramentas biotecnológicas que possam a vir a tratar ou curar doenças cardiovasculares. Os cardiomiócitos ou células cardíacas estão organizados no in vivo em uma organização estrutural tridimensional bastante complexa. Embora os estudos in vitro possam revelar detalhes sobre a biologia celular dessas células, geralmente são cultivadas em ambientes bidimensionais simplificados (2D). Porém para compreensão dos mecanismos fisiológicos que se assemelham com o in vivo faz necessário a utilização de culturas de células cardíacas composta de células organizadas 2D e tridimensionais (3D). Os resultados mostram diferenças significativas entre os dois cultivos celulares em relação à morfologia das células, capacidade de contração, taxa de proliferação, presença de estruturas de adesão intercelular, organização das miofibrilas, morfologia mitocondrial, conteúdo do retículo endoplasmático, filamentos do citoesqueleto e distribuição da matriz extracelular. e expressão de marcadores de diferenciação cardíaca. O modelo de cultura de agregados cardíacos contendo células 2D e agregados 3D é uma excelente ferramenta para estudos sobre os efeitos de diferentes drogas, ou fatores de crescimento, dando informações valiosas sobre a resposta biológica de células cultivadas em diferentes organizações espaciais.

**Palavras-chave:** Cultura de células, Agregados cardíacos e Coração.

### ABSTRACT

Researchers have invested in technologies to develop biotechnology tools that may come to treat or cure cardiovascular diseases. Cardiomyocytes or cardiac cells are organized in vivo in a very complex three-dimensional structural organization. Although studies in vitro may reveal details about the cell biology of these cells, generally, they are grown in simplified two-dimensional environments (2D). However, to understand the physiological mechanisms that resemble in vivo, it is necessary to use cardiac cell cultures which are composed of two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) organized cells. The results have shown significant differences between the two cell cultures in terms of cell morphology, contraction capacity, proliferation rate, presence of intercellular adhesion structures, organization of myofibrils, mitochondrial morphology, endoplasmic reticulum content, cytoskeleton filaments and extracellular matrix distribution and expression of cardiac differentiation markers. The cardiac aggregate culture model containing 2D cells and 3D aggregates is an excellent tool for studies related to the effects of different drugs, or growth factors, providing

valuable information about biological response of cells grown in different spatial organizations.

**Keywords:** Cell culture, Cardiac aggregates and Heart.

## 1. INTRODUÇÃO

O cultivo de mini-corações tem sido utilizado como ferramenta de estudo de doenças cardiovasculares as quais acometem a população mundial. Cerca de 40 % dos pacientes que apresentam a sintomatologia das doenças cardiovasculares evoluindo para a insuficiência cardíaca com uma estimativa de vida de 5 anos, sendo mais grave que câncer de próstata. De acordo com a Organização Pan-americana de Saúde as doenças cardiovasculares são a principal causa de óbitos na população mundial. Estima-se que 17,7 milhões de pessoas morreram por doenças cardiovasculares em 2015, representando 31% de todas as mortes em nível global. Desses óbitos, estima-se que 7,4 milhões ocorrem devido às doenças cardiovasculares. Das 17 milhões de mortes prematuras (pessoas com menos de 70 anos) por doenças crônicas não transmissíveis, 82% acontecem em países de baixa e média renda e 37% são causadas por doenças cardiovasculares (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2019).

Desta forma entender os mecanismos que promovem a hipertrofia celular cardíaca, e que progredem para a deterioração das estruturas cardíacas é o passo que permitem criar novos fármacos que serão propostas de tratamento das doenças cardiovasculares que evoluem para uma insuficiência cardíaca. Esta revisão bibliográfica teve como objetivo mostrar as novas ferramentas biotecnológicas relacionadas ao cultivo de células cardíacas bidimensional (2D) e agregados 3D que possam servir de ferramentas para tratamento farmacológico bem como a compreensão das vias de sinalização de processos biológicos cardíacos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MORFOLOGIA DO CORAÇÃO

A utilização das ferramentas virtuais para ensinar a anatomia das estruturas cardíacas tem sido muito aplicada atualmente. Para que sejam feita uso desta ferramenta faz-se necessário o estudo detalhado da anatomia nos quais as reconstruções são baseadas e devem ser precisos (MORI, 2019).

O coração possui uma organização helicoidal, espiral dupla, apresentando quatro válvulas sendo duas valvas atrioventriculares (mitral e tricúspide) e duas semilunares (pulmonar e aórtica) e quatro câmaras, sendo dois átrios e dois ventrículos (TORRENT-GUASP et al., 2001). Diante da sua importância anatomo-fisiológica o coração é um órgão localizado no mediastino médio, onde desempenha funções hemodinâmicas, de condução, sucção, ejeção e pressão no sistema condutor e manutenção arterio-venoso dos diversos órgãos. Desse modo é necessário um sistema biofísico autoajustável, biomecânico e vetorial elétrico que desenvolva o ciclo cardíaco. Como pilar dessa divisão anatômica, evidencia-se o esqueleto fibroso do coração, estrutura complexa de colágeno que ancora as fibras musculares cardíacas formando os septos interatriais, ventriculares e anéis fibrosos circulantes sustentadores dos óstios das valvas cardíacas (MARESKY et al., 2019).

O átrio direito recebe o sangue venoso sistêmico proveniente da veia cava superior e da veia cava inferior, bem como o sangue de retorno das coronárias através do seio Coronário. Sua parede medial e posterior é formada pelo septo interatrial, estrutura que o separa do átrio esquerdo. O seu assoalho é a válvula atrioventricular direita que se abre no ventrículo direito. Visto pelo lado direito, o septo interatrial apresenta uma estrutura característica, a fossa oval, a qual exibe contorno saliente e região central constituída por uma lâmina delicada (JOHANSSON; ERIKSSON; DELLBORG, 2009).

Estudos de necropsia sugerem que ele esteja presente em até 27% dos adultos. Permanecendo na cavidade da VCI e do seio coronário temos estruturas valvares, requiscios embrionários, que são respectivamente a valva de Eustáquio e a valva de Thebésio (BURCH; MIZUGUCHI; DINARDO, 2012). Próximo à desembocadura da VCS, no AD também se encontram duas estruturas importantes para o automatismo cardíaco: o nó sinusal e o nó atrioventricular (AV). Como delimitação inferior do AD, a valva atrioventricular direita é constituída por Anel fibroso, cordas tendíneas e músculos papilares, projeções musculares cônicas com bases fixadas à parede e três cúspides (MOORE, 2018).

A segunda cavidade do coração direito, o VD, é uma câmara tubular com formato em V. O anel tricúspideo e o pulmonar formam as pontas desse V, onde as paredes livres, septal e apical delineiam as margens anterior, posterior e inferior desta cavidade. O formato irregular do VD dificulta a avaliação dos volumes e da função sistólica com métodos ecocardiográficos como os uniplanares e geométricos simples (HAHN; ABRAHAM; ADAMS, 2013).

Seguindo o sentido em direção para os pulmões, tem-se a a valva pulmonar que é

uma estrutura anterior no tórax e encontra-se em um plano oblíquo em relação ao plano da valva aórtica. A Valva Pulmonar é uma valva semilunar constituída por três válvulas denominadas por suas posições relativas à valva aortica (esquerda, direita e anterior (DWARAKANATH; CASTRESANA; BEHR, 2015). A valvar aórtica é uma continuação da via de saída do ventrículo esquerdo que, está à direita e posterior à via de saída do ventriculo direito, com sua margem posterior encunhada entre o orifício da VM e o SIV muscular (PIAZZA; DE JAEGERE; SCHULTZ, 2008).

Em relação a anatomia interna e externa do AE podemos destacar internamente que o átrio contém paredes lisas, músculos pectíneos e uma aurícula muscular menor. Em relação à caixa torácica, é a câmara cardíaca mais posterior do coração que encontra-se adjacente ao esôfago, e separado apenas pelo pericárdio fibroso (HO; MCCARTHY; FALETR, 2008). A carina traqueal, o esôfago e a aorta descendente estão imediatamente atrás da parede posterior do AE. Em relação ao AD, o AE é mais posterior e superior e está separado do AD pelo Septo-interatrial (DAL-BIANCO; LEVINE, 2013).

O coração fornece ao sistema circulatório uma pressão indispensável para a ejeção sanguínea, onde ao realizar a sístole e a diástole ejeta o o sangue para diferentes partes do corpo através dos vasos. O septo interventricular e interatrial separa o coração em duas metades que consistem de um átrio e um ventrículo (MYERSON; FRANCIS; NEUBAUER, 2013). Desta forma o coração possui uma morfologia anatômica bem descrita fazendo necessário descrever a sua formação embriológica.

## 2.2 EMBRIOLOGIA CARDÍACA

O coração é o primeiro órgão a se formar durante a embriogênese, e sua função circulatória é crítica desde o início para a viabilidade do embrião de vertebrados (ZAFFRAN; FRASCH, 2002). O músculo cardíaco desenvolve-se a partir do mesoderma esplâncnico, através dos dois primórdios cardíacos laterais que migram para a linha média e que se fundem iniciando a formação do tubo cardíaco que inicialmente é simétrico. O tubo cardíaco alonga-se e começa a realizar o movimento de formação de alças (looping) que é o primeiro sinal de assimetria esquerda-direita do coração. Durante o looping, os futuros ventrículos tornam-se distintos e aumentam para fora, e a região atrial bem como o sistema venoso são forçados dorsalmente e cranialmente. Isso faz com que as câmaras primitivas se alinhem, o que é necessário para a futura integração entre elas (HARVEY, 2002).

Os precursores celulares, moleculares e teciduais das válvulas tricúspide e mitral são estabelecidos durante o looping. Estas válvulas são formadas a partir de células da

camada endocárdica do coração, as quais migram e proliferam para formar coxins endocárdicos, que por sua vez dão origem à região de saída do coração, originando as válvulas aórticas e pulmonares (BRUNEAU, 2000). A camada exterior do coração (epicárdio), a circulação coronária e os fibroblastos intersticiais são todos derivados de uma população mesenquimal localizada na base do desenvolvimento do coração denominada de órgão pré-epicárdico. Após completar o looping cardíaco, o tubo cardíaco cresce pela proliferação dos cardiomiócitos já existentes no coração embrionário (KELLY; HARVEY, 2004).

Os mioblastos cardíacos diferenciam-se a partir do miocárdio primitivo e se desenvolvem através da ativação de genes cardíacos específicos, onde alguns fatores de transcrição são fundamentais no controle da cardiomiogênese. Embora alguns destes fatores tenham sido determinados, os seus papéis durante a cardiomiogênese necessitam ser melhor caracterizados (HARTUNG et al., 2013).

Existem diversas famílias de fatores de transcrição envolvidas na cardiomiogênese dentre as quais estão as famílias GATA, MEF2 e Nkx2.5. Os fatores GATA são uma família de reguladores transcricionais que são expressos de uma maneira específica (HARVEY, 2002). A família MEF2 pertence à família de reguladores transcricionais MADS-box, e apresenta uma função central na morfogênese e miogênese de células musculares esqueléticas, cardíacas e lisas. O desenvolvimento cardíaco depende também da regulação da atividade de outros fatores de transcrição, como as famílias T-Box e Homeodomínio (YOUNG et al., 2011).

### 2.3 MARCADORES CARDIOMIOGÊNICOS

O Nkx2.5 é o marcador mais precoce do desenvolvimento do coração, precedendo outros genes cardíacos específicos. Este interage com os fatores de transcrição e membros das famílias T-Box e GATA, colaborando na regulação de diferentes promotores (BRUNEAU et al., 2000; HIROI et al., 2001; VON BOTH et al., 2004). Sua expressão também é detectada em mioblastos, no mesoderma visceral da extremidade distal do estômago e no tecido mesentérico próximo ao estômago (LINTS et al., 1993). A expressão de Nkx2.5 em células progenitoras embrionárias cardíacas e em coração adulto sugere um papel na diferenciação da linhagem do miocárdio e na manutenção do fenótipo cardíaco (ANDERSON, 2018).

## 2.4 O MÚSCULO CARDÍACO

O músculo estriado cardíaco, o qual constitui o miocárdio, é formado por células alongadas que são geralmente mononucleadas ou binucleadas, e que se unem às células vizinhas através de junções celulares que serão explicadas com maior detalhe mais à frente. O miocárdio mostra muitas características estruturais e funcionais intermediárias entre os tecidos musculares esqueléticos e lisos. Suas contrações são fortes e utilizam uma grande quantidade de mitocôndrias, como no músculo estriado esquelético, e, como o músculo liso, suas contrações são contínuas e iniciadas por mecanismos involuntários (YOUNG et al., 2007).

As células cardíacas são alongadas e cilíndricas com aproximadamente 85 a 100  $\mu\text{m}$  de comprimento e 15 a 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Os cardiomiócitos dos átrios são menores do que os dos ventrículos. O miocárdio consiste em um arranjo tridimensional de cardiomiócitos alongados e aderidos a outros cardiomiócitos adjacentes. Em nível celular, é possível se observar que as miofibrilas de uma célula cardíaca parecem ter uma continuidade, em termos de alinhamento, com as miofibrilas da célula vizinha. Estudos indicam que a formação de adesões celulares tem um papel fundamental durante este processo de alinhamento de miofibrilas de células adjacentes (SHEIKH; ROSS; CHEN, 2009).

Os cardiomiócitos apresentam estriações transversais por toda miofibrila o que se assemelha com o aparelho contrátil do músculo esquelético (KIERSZENBAUM, 2008). Entretanto apresentam algumas diferenças, como os túbulos T que são encontrados na região do disco Z e são mais largos que os de músculos esqueléticos (estes encontrados na região de junção de banda A-I), o retículo sarcoplasmático não é tão longo quanto o do músculo esquelético, a presença de díades (interação entre o túbulo T com uma cisterna do retículo sarcoplasmático) ao invés de tríades que são típicas de músculo esquelético, e maior quantidade de mitocôndrias em comparação com o músculo esquelético (GUYETTE et al., 2016).

Os principais componentes dos sarcômeros são os filamentos grossos (15 nm de diâmetro e 1,5  $\mu\text{m}$  de comprimento), constituídos de miosina do tipo II, e os filamentos finos (6 nm de diâmetro e 1  $\mu\text{m}$  de comprimento), constituídos de actina, tropomiosina e as troponinas C, T e I (também conhecido como o complexo das troponinas). Os filamentos grossos e finos estão organizados num padrão longitudinal e regular na direção do movimento do sarcômero (SARANTITIS et al., 2011).

## 2.5 DISCOS INTERCALARES

Outra característica importante no músculo cardíaco é a presença de discos intercalares, que ligam as células cardíacas funcionando como regiões juncionais especializadas entre estas células e onde suas extremidades se unem (coincidindo sempre com a linha Z). Os discos intercalares são responsáveis por transmitir a força de contração e oferecem áreas de baixa resistência elétrica para a rápida disseminação da excitação através do miocárdio (BAHARVAND et al., 2005). Os cardiomiócitos estão unidos uns aos outros através dos discos intercalados que é uma região complexa e essencial para as funções elétricas, mecânicas, de sinalização e comunicação entre as células (WILSON et al., 2013).

As junções aderentes (as faixas de adesão) e os desmossomas desempenham principalmente um papel mecânico, dando uma direção longitudinal aos cardiomiócitos. Alterações nas moléculas que constituem as estruturas desses dois tipos de adesões estão associadas a doenças cardíacas (HIRSCHY et al., 2005).

As junções comunicantes ou junções do tipo gap estão presentes principalmente nas porções longitudinais dos discos intercalares e são locais de baixa resistência elétrica, através dos quais ocorre excitação de célula para célula. Possuem um papel importante na excitação do miocárdio bem como na mediação da propagação do impulso, coordenando a contração cardíaca (GROS et al., 2004). No coração adulto, os canais das junções comunicantes são essenciais para a propagação do potencial de ação a partir do nodo sinoatrial para a integridade mecânica do miocárdio. As junções comunicantes possuem conexons que são canais intercelulares responsáveis pela troca de íons, metabólitos, e pequenas moléculas entre cardiomiócitos vizinhos (WILSON et al., 2013).

Os conexons têm um papel importante tanto no início do desenvolvimento cardíaco como na diferenciação e na proliferação de cardiomiócitos. Estes conexons são compostos por proteínas denominadas conexinas, que possuem mais de 20 genes identificados em vertebrados. Estes genes codificados são nomeados de acordo com seus respectivos pesos moleculares (SOHL; WILLECKE, 2004).

Dentre as conexinas expressas no coração de vertebrados podemos citar as conexinas 37, 40, 43 e 45. Em cardiomiócitos ventriculares as isoformas embrionárias são as conexinas 40 e 45. Sabe-se que ambas as isoformas são substituídas durante o desenvolvimento pela conexina 43 em células ventriculares do miocárdio (SEVERS et al., 2006).

## 2.6 O CITOESQUELETO DO MÚSCULO CARDÍACO

O citoesqueleto dos cardiomiócitos possui um lugar especial entre as estruturas subcelulares, devido à sua complexidade e sua excepcional organização. As proteínas que compõem o citoesqueleto cardíaco e suas interações são alvos de estudos. Tem sido demonstrado que mutações dessas proteínas estão envolvidas em várias cardiomiopatias (MARIAN, 2010).

O citoesqueleto das células cardíacas possui uma estrutura altamente organizada que é responsável pela eficiência da contração muscular. Em cardiomiócitos, o citoesqueleto é um fator intrínseco determinante na eficácia da função destas células, já que qualquer dano ao citoesqueleto poderá levar à insuficiência cardíaca (HELING et al., 2000). Um conjunto de proteínas do citoesqueleto compõe as miofibrilas e as suas interações com a membrana plasmática e com a matriz extracelular (GANOTE; ARMSTRONG, 1993).

## 2.7 MICROFILAMENTOS E MICROTÚBULOS

O microtúbulos dos cardiomiócitos são responsáveis por transmitir os estímulos químicos e mecânicos de dentro da célula, contribuindo dessa forma para a estabilidade já que estão ligados a estruturas subcelulares da célula, tais como as mitocôndrias, o Aparelho de Golgi e as miofibrilas. Eles são capazes de alterar a resposta das células do miocárdio para o antagonista  $\beta$ -adrenérgico (SCHWEITZER et al., 2011).

Os microfilamentos são compostos de actina, onde o monômero globular é chamado de actina-G e a sua forma polimérica filamentosa é chamada de actina-F. Existem duas isoformas de actina alfa ( $\alpha$ ) nos músculos estriados, a esquelética e a cardíaca, que são diferentes das isoformas de células de músculo liso e de células não musculares, sendo cada uma destas 4 variantes de actina codificada por um gene diferente. As células musculares ainda possuem as duas isoformas citoplasmáticas beta e gama (PERRIN; ERVASTI, 2010).

Os filamentos de actina se ligam a uma grande variedade de proteínas acessórias que permitem aos mesmos participarem de diferentes funções. Algumas dessas proteínas acessórias ligam os filamentos de um mesmo tipo entre si, a outro tipo de filamento e, ainda, a componentes celulares. Existem também proteínas acessórias motoras (as miosinas), que hidrolisam ATP, produzindo força e movimento direcionado ao longo desses filamentos (DARNELL et al., 2000). Estas proteínas associadas à actina são essenciais para o correto funcionamento dos sarcômeros das células musculares cardíacas, podendo citar como

exemplos a tropomiosina, as troponinas (I, C e T) e a miosina do tipo II (MERMELSTEIN et al., 2000).

## 2.8 FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

As proteínas nebulina e nebulite participam da interação dos filamentos de desmina com as linhas Z. A localização da desmina na linha Z é descrita como tendo um papel na manutenção da integridade do sarcômero no momento da contração cardíaca. Além de sua localização na linha Z, a desmina também se encontra associada à membrana externa do envelope nuclear (MERMELSTEIN et al., 2006). Existe um aumento de desmina em cardiomiócitos na hipertrofia cardíaca. Além disso, alterações nos filamentos intermediários de desmina foram associados com a redução da função cardíaca (DI SOMMA et al., 2004).

## 2.9 O MODELO DE ESTUDO DE CULTURA DE CARDIOMIÓCITOS

Duas abordagens principais para terapia de substituição do tecido cardíaco têm sido descritas nas duas últimas décadas: a utilização equivalente de células isoladas *in vitro* e o uso de tecidos gerados pela bioengenharia (ZIMMERMANN et al., 2002; MOTLAGH et al., 2003; SHAPIRA-SCHWEITZER et al., 2007).

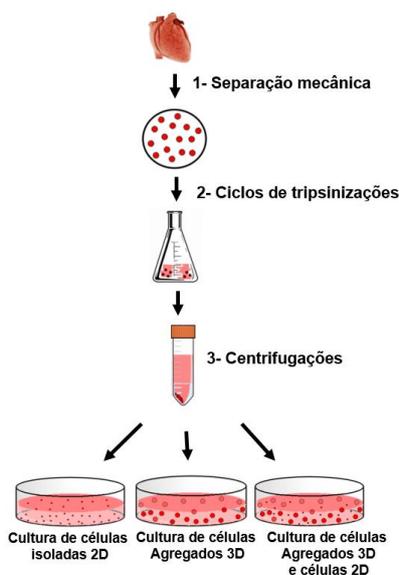
A técnica de cultivo de células primárias de vertebrados surgiu na década de 50 e vem sendo aprimorada após vários anos de desenvolvimento. A evolução desta técnica foi conseguida principalmente através da introdução de antibióticos, que controlam as contaminações, e do uso de enzimas proteolíticas, como a tripsina, que ajudam o isolamento de células a partir de fragmentos de tecidos. Esta técnica é bastante utilizada atualmente na área de pesquisa biomédica. Existem muitas vantagens no uso de cultura de células como modelo experimental, dentre eles podemos citar: o controle das variáveis experimentais, a homogeneidade das amostras e a diminuição do uso de animais em experimentos (RYAN, 2008).

Culturas de cardiomiócitos podem ser feitas de duas formas principais: culturas crescidas em ambientes em duas dimensões (2D) ou em três dimensões (3D). As culturas em 2D são aquelas em que as células são isoladas do tecido e crescem em uma monocamada. Já as culturas em 3D são aquelas em que pequenos fragmentos de tecido são isolados e crescem mantendo a estrutura tridimensional do tecido de origem. A cultura de cardiomiócitos em 2D possui a vantagem de ser mais acessível a estudos sobre a distribuição e expressão de proteínas e outras macromoléculas em compartimentos celulares específicos, quando comparados a culturas de cardiomiócitos em 3D. Por outro

lado, o tecido cardíaco não é composto de células isoladas e os cardiomiócitos são encontrados em estreito contato uns com os outros no coração, onde funcionam de uma maneira altamente coordenada onde a ligação entre as células é parte fundamental do órgão (GUPTA, 2012).

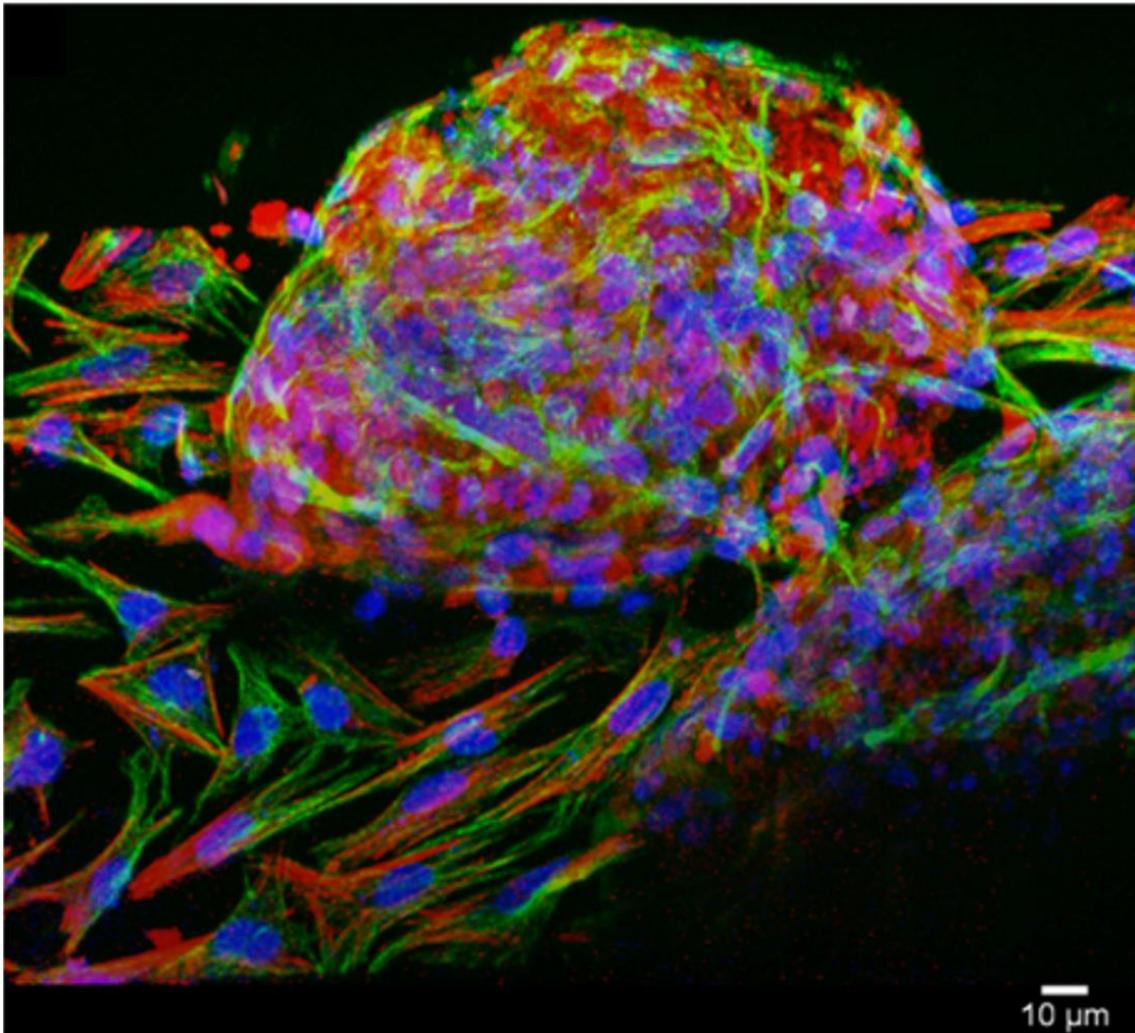
Existem alguns trabalhos na literatura que abordam as vantagens/desvantagens dos modelos de culturas de cardiomiócitos em 3D. Sabe-se que tecidos e órgãos dependem de uma estrutura complexa tridimensionalmente (3D) e multicelular para seu funcionamento (TAVAKOLI; AMINI, 2013). Restabelecer a arquitetura desses tecidos nos modelos ex vivo ou in situ é um grande objetivo da engenharia de tecidos e da medicina regenerativa. O coração é um dos alvos principais nessas investigações, porém as organizações tridimensionais das células que o compõe ainda não são estão bem esclarecidas (AKINS et al., 2010). Ross e Borg (2001) mostraram que culturas 3D de cardiomiócitos mimetizam a morfologia do tecido cardíaco in vivo permitindo desta forma as interações célula-célula, a diferenciação e as propriedades elétricas, as quais são qualidades essenciais para a identidade e a integridade das estruturas do coração.

De acordo com Soares (2012) as culturas de agregados cardíacos 3D e células 2D no mesmo ambiente mostram um grande potencial em termos experimentais, já que estas culturas são compostas por 2 tipos de culturas, células cardíacas 2D e os agregados cardíacos 3D organizadas no mesmo ambientes (Figura 1). Além de ter sido observado migração celular das células cardíacas do agregado (Figura 2).



**Figura 1.** Representação esquemática demonstrando 3 tipos de cultivo de células e agregados 3D.

Fonte: (SOARES et al., 2019)



**Figura 2.** Na imagem podemos observar as diferenças morfológicas entre as células 2D e o agregado 3D. Em azul podemos observar a marcação da sonda Dapi dos núcleos das células 2D e dos Agregados, em vermelho o citoesqueleto de actina e em verde a trama de microtúbulos (SOARES et al., 2012).

Os agregados cardíacos 3D são na verdade pequenos fragmentos de coração, o que os torna semelhante ao tecido cardíaco in vivo. Já as células em 2D são células cardíacas isoladas umas das outras e um pouco mais distantes da situação in vivo. Isto pode explicar as diferenças por nós observadas em relação as células organizadas em 2D ou 3D. Esta morfologia das células 2D é bem diferente da descrita para cardiomiócitos encontrados no tecido cardíaco, visto que estes se apresentam em formato alongado e bipolar (GUYETTE, 2016).

Quanto as diferenças nas características foram vistas nas adesões intercelulares, motilidade celular, proliferação celular, organização da matriz extracelular, morfologia das mitocôndrias, formação das estruturas do sarcômero, capacidade de contração

espontânea, e expressão de vários marcadores da diferenciação cardíaca. De acordo com Soares (2012) essas diferenças refletem provavelmente nas variações encontradas em relação a organização tridimensional de cada ambiente (Imagem 1). Ocorrer a migração celular das células 2D e das células do agregado cardíaco nesse modelo de cultura é um processo essencial no desenvolvimento, e também está associada a processos patológicos. A migração de uma célula ou grupo de células, de uma área para outra, geralmente em resposta a um sinal químico, é fundamental para algumas funções tais como: reparação de feridas, diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e metástase tumoral (JAKAB et al., 2008).

### 3. CONCLUSÃO

O modelo de cultura de células cardíacas 2D e agregados 3D apresentam um enorme potencial para estudos sobre os mecanismos de ação de diferentes substâncias que tem como alvo diferentes estruturas celulares, sendo uma excelente ferramenta para estudos sobre os efeitos de diferentes drogas, ou fatores de crescimento, dando informações valiosas sobre a resposta biológica de células cultivadas em diferentes organizações espaciais.

### 4. REFERÊNCIAS

AKINS, R.E.J.; ROCKWOOD, D.; ROBINSON, G.; SANDUSK, G.D.; RABOLT, J.; PIZARRO, C. Three-Dimensional Culture Alters Primary Cardiac Cell Phenotype. **Tissue Engineering: Part A.**, V.16, p.629-641, 2010.

ANDERSON, D.J.; KAPLAN, D.I.; BELL, K.M.; KOUTSIS, K.; HAYNES, J.M.; MILLS, R.J.; et al. NKX2-5 regulates human cardiomyogenesis via a HEY2 dependent transcriptional network. *Nat Commun.*, v.9, n.1, p.1373, 2018.

BAHARVAND, H.; AZARNIA, M.; PARIVAR, K.; ASHTIANI, S. K. The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. **J Mol Cell Cardiol.**, v.38, p.495-503, 2005.

BURCH, T.M.; MIZUGUCHI, K.A.; DINARDO, J.A. Echo didactics: echocardiographic assessment of atrial septal defects. **Anesth Analg.**, v.115, p.776-778, 2012.

CORDERO-GRANDE, L.; VEGAS-SÁNCHEZ-FERRERO, G.; CASASECA-DELA-HIGUERA, P.; SAN-ROMÁN-CALVAR, J.A.; REVILLA-ORODEA, A.; MARTÍN-FERNÁNDEZ, M.; et al. Unsupervised 4D myocardium segmentation with a Markov Random Field based deformable model. **Med Image Anal.**, v.15, n.3, p.283–301, 2001.

DAL-BIANCO, J.P., LEVINE, R.A. Anatomy of the mitral valve apparatus Role of 2D and 3D echocardiography. **Cardiol Clin.**, v.31, n.151-164, 2013.

DWARAKANATH, S., CASTRESANA, M.R., BEHR, A.Y. The feasibility of simultaneous orthogonal plane imaging with tilt for short-axis evaluation of the pulmonic valve by transesophageal echocardiography. **Anesth Analg.**, v.121, n.624-629, 2015.

GUPTA, V.; KIRIS, L.I.H.A.; HENDRIKS, E.A.; VAN DER GEEST, R.J.; VAN DE GIESSEN, M.; NIESSEN, W.; et al. Cardiac MR perfusion image processing techniques: a survey. **Med Image Anal.**, v.16, n.4, p.767-785, 2012.

GUYETTE, J.P.; CHAREST, J.M.; MILLS, R.W.; JANK, B.J.; MOSER, P.T.; GILPIN, S.E.; et al. Bioengineering human myocardium on native extracellular matrix. **Circ Res.**, v.118, p.56-72, 2016.

HAHN, R.T.; ABRAHAM, T.; ADAMS, M.S. Guidelines for performing a comprehensive transesophageal echocardiographic examination: recommendations from the American Society of Echocardiography and the Society of Cardiovascular Anesthesiologists. **J Am Soc Echocardiogr.**, v.26, p.921-964, 2013.

HARTUNG, S.; SCHWANKE, K.; HAASE, A.; DAVID, R.; FRANZ, W. M.; MARTIN, U.; et al. Directing cardiomyogenic differentiation of human pluripotent stem cells by plasmid- based transient overexpression of cardiac transcription factors. **Stem Cells Dev.**, v.22, n.7, p.1112-1125, 2013.

HARVEY, R. P. Patterning the vertebrate heart. **Nat Rev Genet.**, v.3, n.7, p.544-556, 2002.

HIROI, Y.; KUDOH, S.; MONZEN, K.; IKEDA, Y.; YAZAKI, Y.; NAGAI, R. et al. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. **Nat. Genet.**, v.28, p.276-280, 2001.

HIRSCHY, A.S.; EHLER, E.; PERRIARD, J.C. Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart. **Dev Biol.**, v.289, n.2, p.430-441, 2006.

HO, S.Y.; ANGEL, C.J.; SANCHEZ-QUINTANA, D. Left atrial anatomy revisited. **Circ Arrhythm Electrophysiol.**, v.5, p.220-364, 2012;

HO, S.Y.; MCCARTHY, K.P.; FALETRA, F.F. Anatomy of the left atrium for interventional echocardiography. **Eur J Echocardiogr.**, v.12, p.11-15, 2011.

JAKAB, K.; NOROTTE, C.; DAMON, B.; MARGA, F.; NEAGU, A.; BESCH-WILLIFORD, C. L.; KACHURIN, A.; et al. Tissue Engineering by Self-Assembly of Cells Printed into Topologically Defined Structures. **Tissue Engineering Part A.**, v.14, n.3, 413-421, 2008.

JOHANSSON, M.C.; ERIKSSON, P.; DELLBORG, M. The significance of patent foramen ovale. A current review of associated conditions and treatment. **Int J Cardiol.**, v.134, p.17-24, 2009.

KELLY, R.G.; HARVEY, R.P. Cardiomyogenic Precursor Cells in the Mammalian Embryo: Induction, Heterogeneity, and Morphogenesis. **Handbook of Stem Cells.**, v.1, p.305-315, 2004.

- LANG, R.M.; BADANO, L.P.; TSANG, W. EAE/ASE recommendations for acquisition and display using three-dimensional echocardiography. **J Am Soc Echocardiogr.**, v.25, p.3-46, 2012.
- MARESKY, H.S.; OIKONOMOU, A.; ALI, I.; DITKOFISKY, N.; PAKKAL, M.; BALLYK, B. virtual reality and cardiac anatomy: Exploring immersive three-dimensional cardiac imaging, a pilot study in undergraduate medical anatomy education. **Clin Anat.**, v.32, n.2, p.238-243, 2019.
- MARIAN, A.J. Hypertrophic cardiomyopathy: from genetics to treatment. **Eur J Clin Invest.**, v.40, p.360-369, 2010.
- MERMELSTEIN, C.S.; ANDRADE, L.R.; PORTILHO, D.M.; COSTA, M.L. Desmin filaments are stably associated with the outer nuclear surface in chick myoblasts. **Cell Tissue Res.**, v.323, p.351-357, 2006.
- MOORE, K.L.; DALLEY, A.F.; ANNE, M.R. **Anatomia orientada para a clínica**. 8ª ed., 2018.
- MORI, S.; TRETTER, J.T.; SPICER, D.E.; BOLENDER, D.L.; ANDERSON, R.H. What is the real cardiac anatomy? **Clin Anat.**, v.32, n.3, 288-309, 2019.
- MOTLAGH, D.; SENYO, S.E.; DESAI, T.A.; RUSSELL, B. Microtextured substrata alter gene expression, protein localization and the shape of cardiac myocytes. **Biomaterials.**, v.24, p.2463–2476, 2003.
- MYERSON, S.G.; FRANCIS, J.; NEUBAUER, S. Cardiovascular magnetic resonance. OUP, Oxford. **PLoS One.**, v.7, n.5, p.e38147. 2013.
- OPASBrasil. **Organização Panamericana de Saúde**. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096)> acesso em 24/01/2015
- PIAZZA, N.; DE JAEGERE, P.; SCHULTZ, C. Anatomy of the aortic valvar complex and its implications for transcatheter implantation of the aortic valve. **Circ Cardiovasc Interv.**, v.1, p.74-81, 2008.
- ROSS, R. S.; BORG, T. K. Integrins and the myocardium. **Circ Res.**, v.88, p.1112, 2001.
- RYAN, J. **Introduction to animal cell culture**. Technical Bulletin, 2008.
- SARANTITIS, I.; PAPANASTASOPOULOS, P.; MANOUSHI, M.; BAIKOUSSIS, N.G.; APOSTOLAKIS, E. The Cytoskeleton of the Cardiac Muscle Cell. **Hellenic J Cardiol.**, v.53, p.367-379, 2011.
- SEVERS, N.J.; DUPONT, E.; THOMAS, N. Alterations in cardiac connexin expression in cardiomyopathies. **Adv Cardiol.**, v.42, p.228-242, 2006.
- SHAPIRA-SCHWEITZER, K.; SELIKTAR, D. Matrix stiffness affects spontaneous contraction of cardiomyocytes cultured within a PEGylated fibrinogen biomaterial. **Acta Biomater.**, v.3, p.33-41, 2007.

SHEIKH, F.; ROSS, R.S.; CHEN, J. Cell-cell connection to cardiac disease. **Trends Cardiovasc Med.**, v.19, p.182–190, 2009.

SOARES, C.P.; MIDDLEJ, V.; OLIVEIRA, M.E.W.; BENCHIMOL, M.; COSTA, M.L. MERMELSTEIN, C. 2D and 3D-Organized Cardiac Cells Shows Differences in Cellular Morphology, Adhesion Junctions, Presence of Myofibrils and Protein Expression. **PlosOne.**, v.7, n.5, p.e38147, 2012.

TAVAKOLI, V.; AMINI, A.A. A survey of shaped-based registration and segmentation techniques for cardiac images. **Comput Vis Image Underst.**, v.117, n.9, p.966-989, 2013.

TORRENT-GUASP, F; BUCKBERG, G.D.; CLEMENTE, C.; COX, J.L.; COGHLAN, H.C.; GHARIB, M. The structure and function of the helical heart and its buttress wrapping. I. The normal macroscopic structure of the heart. **Semin Thorac Cardiovasc Surg.**, v.13, n.4, p.301-319, 2001.

WILSON, A.J.; SCHOENAUER, R.; EHLER, E.; AGARKOVA, I.; BENNETT, P.M. Cardiomyocyte growth and sarcomerogenesis at the intercalated disc. **Cell Mol Life Sci.**, p.1374-1375, 2013.

YOUNG, D.A.; DEQUACH, J.A.; CHRISTMAN, K.L. Human cardiomyogenesis and the need for systems biology analysis. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.**, v.3, n.6, p.666-680, 2011.

ZAFFRAN, S.; FRASCH, M. Early signals in cardiac development. **Circulation Research.**, v.91, n.6, p.457-469, 2002.

ZIMMERMANN, W.H.; SCHNEIDERBANGER, K.; SCHUBERT, P.; DIDIÉ, M.; MÜNDEL, F. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. **Circ Res.**, v.90, p.223–230, 2002.

## ANUROS: DA REJEIÇÃO A IMPORTÂNCIA DO CONHECIMENTO NA EDUCAÇÃO AMBIENTAL

**Hassem Ide Neto<sup>1</sup>, Patrícia Malta de Menezes<sup>1</sup>, Cydia Menezes Furtado<sup>2</sup>, Solange Maria Chalub Bandeira Texeira<sup>1</sup>, Janaína Silva de Almeida Queiroz<sup>1</sup>**

1. Centro Universitário Uninorte, Graduação em Ciências Biológicas, Rio Branco, Acre, Brasil;
2. Universidade Federal do Acre (UFAC), Unidade de Tecnologia de Alimentos, Rio Branco, Acre, Brasil.

### RESUMO

Uns dos grupos de animais mais ameaçados atualmente são os anfíbios anuros, fato que pode estar relacionado ao desconhecimento de seu importante papel ecológico. Os animais desse grupo são cercados de mitos e lendas de culturas distintas, sendo considerados muitas vezes como perigosos pela sociedade. No entanto, nunca refletimos o inverso, onde o ser humano se torna perigoso para esses animais. Para formar uma população consciente e preocupada com os problemas ambientais, a educação ambiental pode ser um instrumento valioso, preservando o meio ambiente através de conhecimentos e ações participativas. O presente trabalho tem o objetivo de discutir sobre as diversas relações estabelecidas entre os anuros e os seres humanos, buscando uma reflexão acerca da importância que esses vertebrados apresentam na vida de todos os outros seres vivos que compõem o complexo sistema biosfera. As atividades foram desenvolvidas nas escolas AME (Associação Modelar de Ensino) e na Escola Neutel Maia, pública, ambas localizadas em Rio Branco, Acre. Foram aplicados questionários semiestruturados envolvendo dois professores e 212 alunos para analisar a concepção que a comunidade escolar tem em relação aos sapos e avaliar a importância ecológica, econômica e social que as pessoas atribuem aos mesmos. Foram desenvolvidas aulas práticas para difundir o papel dos anuros na natureza e contribuir para reverter o nível de rejeição desses organismos entre alunos do ensino fundamental.

**Palavras-Chave:** Educação Ambiental; Anuros; Rejeição.

### ABSTRACT

Some of the most threatened groups of animals today are anuran amphibians, a fact that may be related to the lack of knowledge of their important ecological role. The animals in this group are surrounded by myths and legends from different cultures, and are often considered dangerous by society. However, we never reflect the reverse, where humans become dangerous to these animals. In order to form a population that is conscious and concerned with environmental problems, environmental education can be a valuable instrument, preserving the environment through participatory knowledge and actions. The present work has the objective of discussing the various relationships established between anurans and beings human beings, seeking a reflection on the importance that these vertebrates present in the life of all other living beings that compose the complex biosphere system. The activities were developed in the AME (Modeling Teaching Association) and the Neutel Maia School, public, both located in Rio Branco, Acre. Semi-structured

questionnaires involving two teachers and 212 students were applied to analyze the school community's conception of frogs and to evaluate the ecological, economic and social importance that people attribute to them. Practical classes were developed to disseminate the role of anurans in nature and help to revert the level of rejection of these organisms among elementary school students.

**Keywords:** Environmental Education; Anuros; Rejection.

## 1. INTRODUÇÃO

Uns dos grupos de animais mais ameaçados atualmente são os anfíbios anuros, fato que pode estar relacionado ao desconhecimento de seu importante papel ecológico (HOFFMANN et al., 2010). Os anuros apresentam algumas características biológicas e ecológicas, tais como dependência de água ou de habitat úmidos para a reprodução, pele permeável e exposta, baixa capacidade de deslocamento e sensibilidade às mudanças no ambiente e por esses motivos, qualquer alteração no hábitat pode causar grandes impactos nas populações (HADDAD; PRADO, 2005; ROSSA-FERES et al., 2008; TOLEDO, 2009).

De uma maneira geral, os anuros demonstram sinais de condições adequadas de hábitat, pelo fato de sua história de vida estar diretamente associada ao ambiente, não só por apresentarem forte sensibilidade às alterações na qualidade da água, já que são dependentes do meio aquático (GASCON, 1991), como também, grande parte das espécies, se relacionam intensamente com a vegetação nas proximidades dos corpos d'água, onde a qualidade da estrutura da paisagem garante a manutenção das populações (PARRIS, 2004).

Por outro lado, os animais desse grupo são cercados de mitos e lendas de culturas distintas, sendo considerados muitas vezes como perigosos pela sociedade. No entanto, nunca refletimos o inverso, onde o ser humano se torna perigoso para esses animais. Na cultura árabe, oriental e pré-colombiana eles assumem um papel de destaque, sendo associados a deuses, espíritos bons e protetores. Entretanto, na Europa, no período da Idade Média, os anuros ganharam um papel aterrorizante, onde foram associados à bruxaria e manifestações do mal. Isso pode ser atribuído ao fato da similaridade entre a forma do corpo do anuro e a forma do corpo humano (WOEHL; WOEHL, 2008).

No mundo inteiro, relevantes e diferentes valores são atribuídos aos anfíbios anuros, como por exemplo, na regulação das cadeias alimentares, principalmente no controle de pragas. Conseqüentemente, são esses animais que trazem contribuições importantes para a manutenção da produção agrícola, além de serem considerados bons indicadores

ambientais devido a sua sensibilidade a alterações no meio (HADDAD, 2008; TOLEDO, 2009). Economicamente possuem importância na medicina e farmacologia devido a substâncias químicas secretadas por sua pele, e há também espécies, como a rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) que são comestíveis, sendo cultivadas em diferentes países do mundo (BARROS, 2005).

Devido ao hábito noturno e aparência peculiar destes animais, foram criados vários mitos e crendices populares em torno destes, fazendo com que as pessoas, acabam por matá-los sem saber que os mesmos têm papel importante nos ecossistemas (CRESPO; OLIVEIRA, 1989). A redução desses anfíbios apresenta consequências ecológicas importantes, pelo fato de terem grande importância na cadeia alimentar (LOEBMANN, 2005).

A utilização dos anuros como indicadores de alterações ambientais, tem sido reconhecida por diversos pesquisadores (BLAUSTEIN; WAKE, 1990). No entanto, o nível de rejeição anuro é normalmente elevado por falta de conhecimento, mas através da conscientização ambiental é possível construir conceitos capazes de desmistificar as aversões populares existentes sobre algumas espécies animais, inclusive os anfíbios anuros (sapo, perereca e rã).

As crianças em idade escolar possuem uma curiosidade fértil que pode ser explorada, pois não têm medo de manusear e observar coisas novas. Elas não têm os preconceitos dos adultos, sendo grandes multiplicadores de conhecimento. Partindo deste princípio é importante trabalhar conceitos básicos de educação ambiental, buscando formar sujeitos conscientes capazes de entender as questões que lhes são postas e com seus saberes, melhorar a condição ambiental do lugar onde vivem (ANJOS, 2003).

Deve-se compreender que todos os seres vivos têm sua devida importância, portanto é necessária a prática da educação ambiental em diferentes espaços, levando em consideração que a necessidade da conservação do meio ambiente é cada vez maior e necessita ser trabalhada com a sociedade e em todos os níveis de educação de forma contextualizada com a realidade (DIAS, 1991; MEDEIROS et al., 2011). Para que haja a conservação da biodiversidade é necessária a desmistificação de certas crenças sobre esse grupo de animais, deixando claro seu papel para a manutenção da qualidade ambiental, enquanto bioindicadores e com potencial farmacológico.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar o nível de rejeição dos anuros em escolas de ensino fundamental de Rio Branco, difundindo informações sobre o grupo, através de atividades de Educação Ambiental.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades foram desenvolvidas nas escolas AME (Associação Modelar de Ensino) particular, localizado na Rua Antônio Pinheiro Sobrinho, Bairro Santa Quitéria e na Escola Neutel Maia, pública, localizada na Av. Nações Unidas, bairro Bosque. Foram aplicados questionários semiestruturados envolvendo dois professores e 212 alunos para analisar a concepção que a comunidade escolar tem em relação aos sapos e avaliar a importância ecológica, econômica e social que as pessoas atribuem aos mesmos.

Foram desenvolvidas palestras para difundir o papel dos anuros na natureza e contribuir para reverter o nível de rejeição desses organismos entre alunos do ensino fundamental (Figura 1). As aulas práticas abordaram os mitos populares sobre danos causados pelos sapos, como o aparecimento de “cobreiros” e outros problemas de pele. Na aula prática (figura 2) foram apresentados os anfíbios anuros do Acervo Didático de Zoologia do Professor Moisés Barbosa da Universidade Federal do Acre (UFAC). Nessa atividade, os alunos tiveram a possibilidade manusear os espécimes e de se expressarem sobre sua experiência.



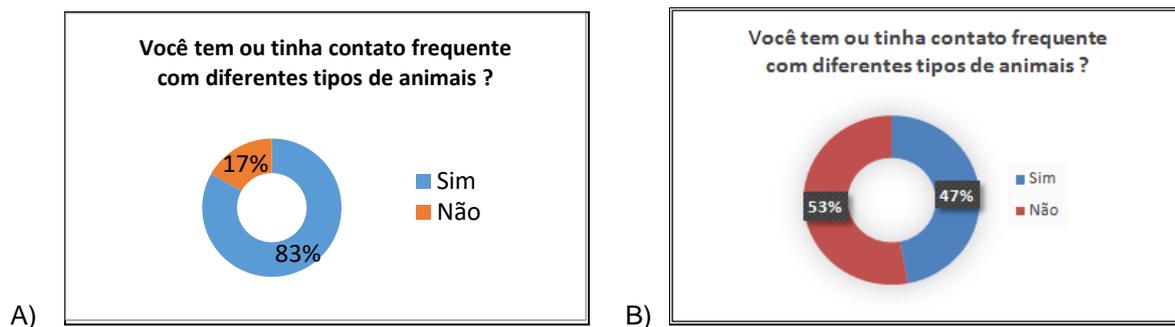
**Figura 1.** Palestra para difusão do papel dos anuros na natureza.  
Foto: Patrícia Malta



**Figura 2.** Apresentação do acervo de anfíbios anuros da Universidade Federal do Acre.  
Fonte: Hassem Ide.

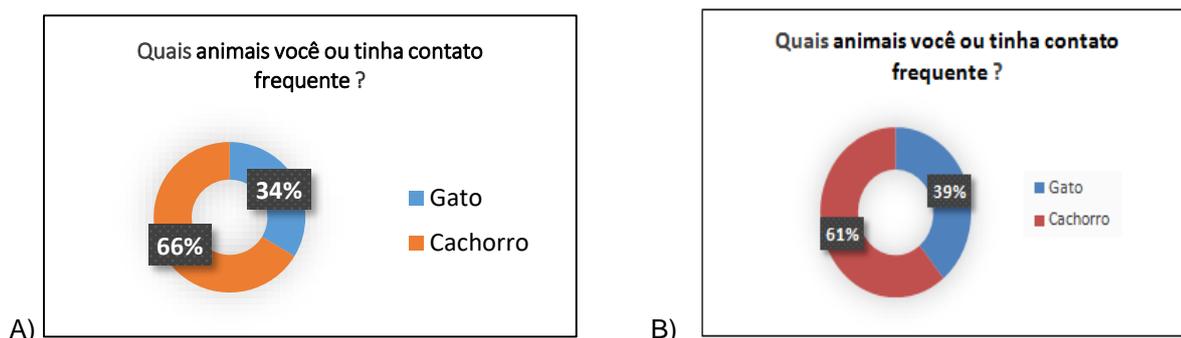
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com relação ao questionamento relativo ao contato frequente com diferentes tipos de animais, observou-se que 83% e 47% dos alunos do AME e Escola Neutel Maia, respectivamente responderam que sim. No AME, apenas 17% dos alunos responderam que não, e na Escola Neutel Maia 53% dos alunos entrevistados disseram que não tiveram contato frequente com animais (Figura 3).



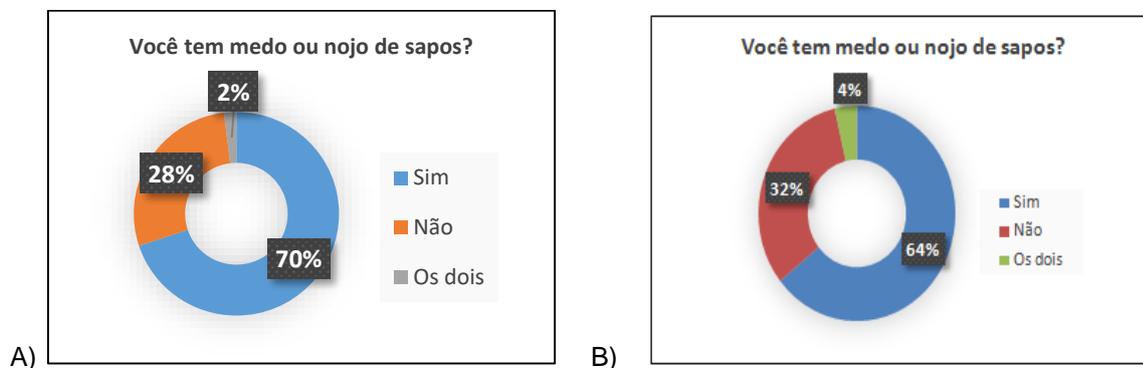
**Figura 3.** A) Referente a pergunta se os alunos tinham contato frequente com diferentes tipos de animais no Colégio AME. B) Referente a pergunta se os alunos tinham contato frequente com diferentes tipos de animais na Escola Neutel Maia.

Em relação a quais animais têm ou tinham contato frequente, observou-se que 66% foram cachorros e 34% foram gato, no Colégio AME. Já a na Escola Neutel Maia observou-se que 61% dos alunos têm mais contato com cachorro e 39% com gato (Figura 4).



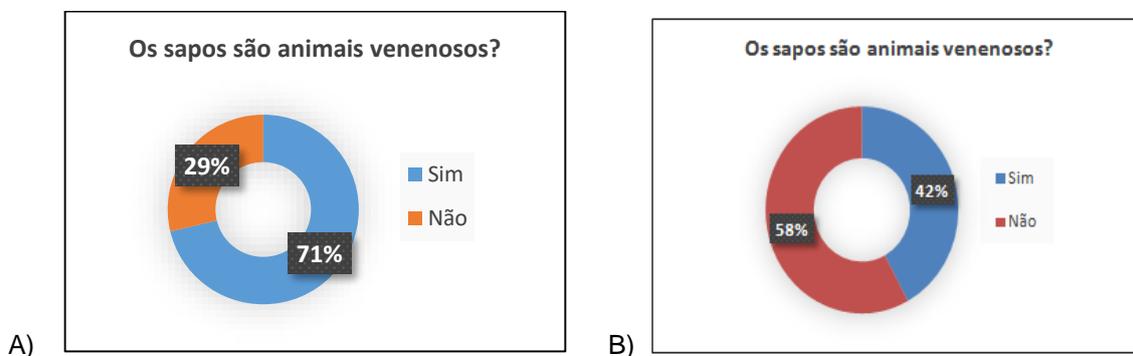
**Figura 4.** A) Referente a quais animais os estudantes do Colégio AMEM tem ou tinha contato frequente. B) Referente a quais animais os estudantes da Escola Neutel Maia têm ou tinham contato frequente.

Sobre o questionamento, se têm medo ou nojo de sapos, 70% alunos do AME disseram que sim e 28% não. Enquanto 64% alunos da Escola Neutel Maia disseram sim e 32% não, conforme indicado nas figuras 5.



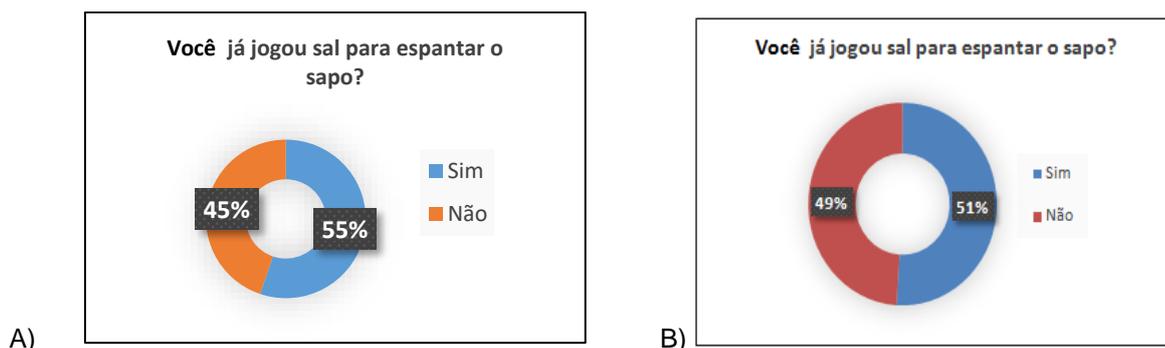
**Figura 5.** A) Referente a pergunta realizada no Colégio AME se os estudantes tinham medo ou nojo de sapo. B) Referente a pergunta realizada na Escola Neutel Maia se os estudantes tinham medo ou nojo de sapo.

Em relação à questão, se os sapos são animais venenosos, notou-se que 71% dos alunos do AME disseram sim e 29% não, enquanto na Escola Neutel Maia 58% disseram não e 42% sim (Figura 6).



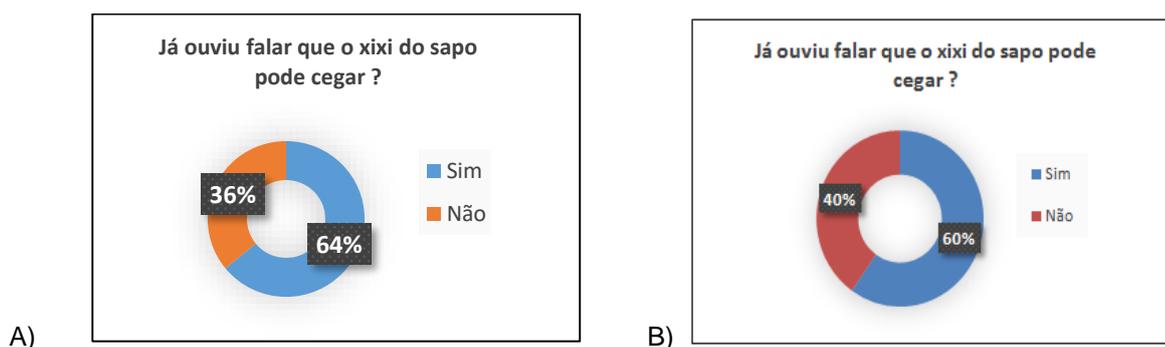
**Figura 6.** A) Referente a pergunta realizada no Colégio AME se os sapos são animais venenosos. B) Referente a pergunta realizada na Escola Neutel Maia se os sapos são animais venenosos

Em relação à questão, você já jogou sal para espantar os sapos, 55% dos alunos do AME responderam que sim e 45% que não. Enquanto 51% alunos da Escola Neutel Maia responderam sim e 49% que não (Figura 7).



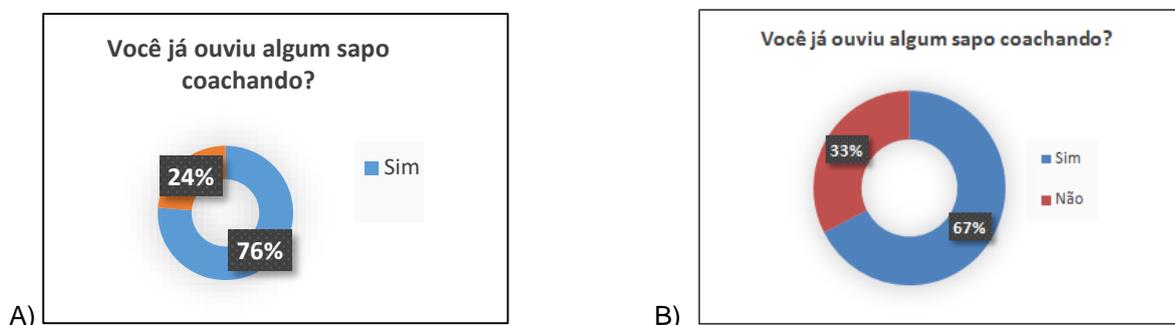
**Figura 7.** A) Referente a pergunta se os estudantes do Colégio AMEM já jogaram sal para espantar os sapos. B) Referente a pergunta se os estudantes na Escola Neutel Maia já jogaram sal para espantar os sapos.

Sobre o questionamento, se já ouviram falar que o xixi de sapo pode cegar, 64% alunos do AME disseram que sim, enquanto 36% disseram não. Já 60% dos alunos da Escola Neutel Maia disseram sim e 40% não (Figura 8).



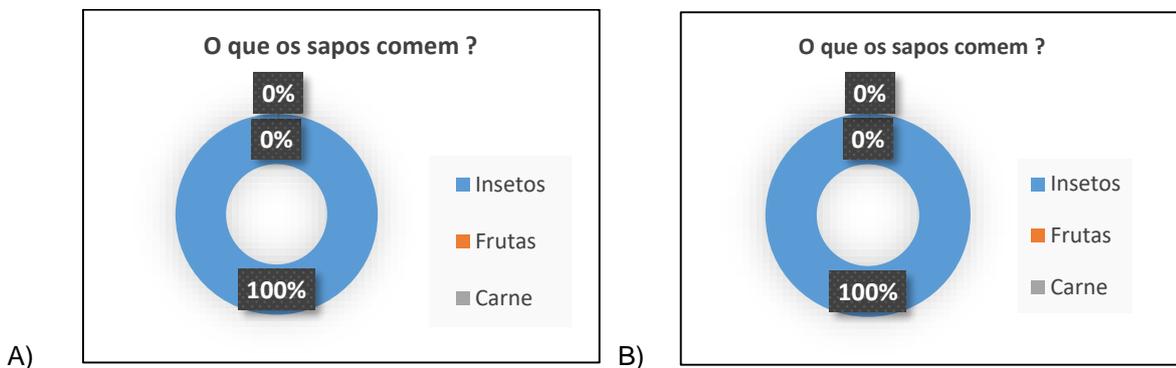
**Figura 8.** A) Referente a pergunta realizada no Colégio AME se os estudantes já ouviram falar que xixi do sapo pode cegar. B) Referente a pergunta realizada na Escola Neutel Maia se os estudantes já ouviram falar que xixi do sapo pode cegar.

Sobre se já ouviram algum sapo coaxando, 76% colégio AME responderam sim, enquanto 24% não. Já na Escola Neutel Maia 67% disseram sim e 33% não (Figura 9).



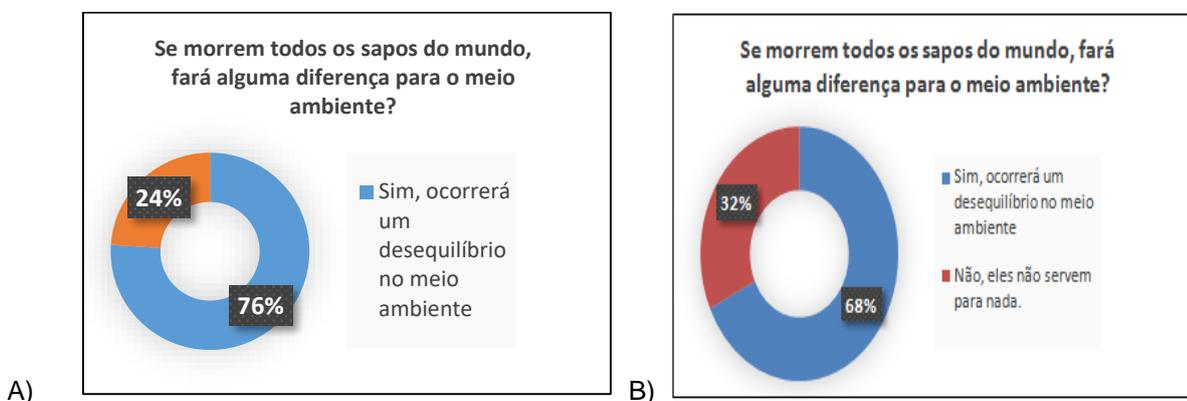
**Figura 9.** (A) Referente a pergunta realizada aos alunos do Colégio AME se já ouviram algum sapo coaxar. (B) Referente a pergunta realizada aos alunos da Escola Neutel Maia se já ouviram algum sapo coaxar.

Quanto a questão referente ao que os sapos comem, 100% dos alunos de ambas as escolas afirmaram os sapos comem insetos (Figura 10).



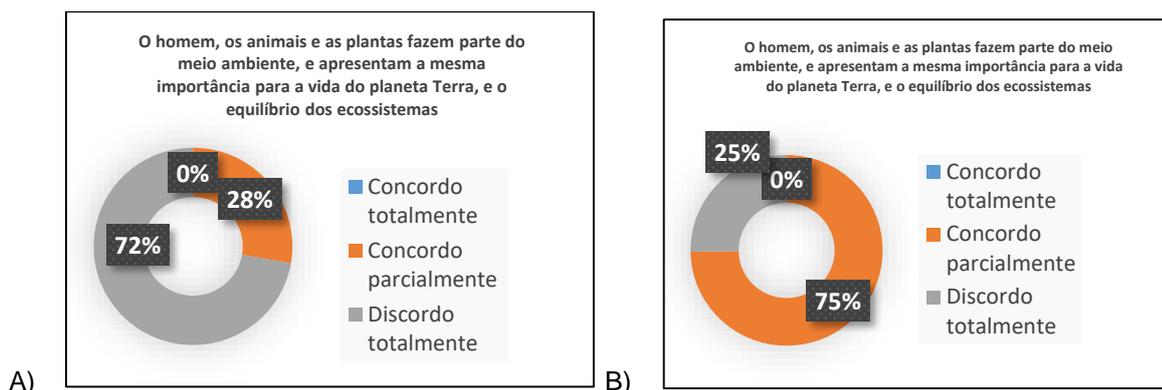
**Figura 10.** A) Referente a pergunta realizada aos estudantes do Colégio AME sobre o que os sapos comem. B) Referente a pergunta realizada aos estudantes da Escola Neutel Maia sobre o que os sapos comem.

Em relação questão, se morrem todos os sapos do mundo, fará alguma diferença para o meio ambiente, 76% dos alunos do AME responderam que sim, e 24% não. Já 68% dos alunos da Escola Neutel Maia disseram que sim e 32% não (Figura 11).



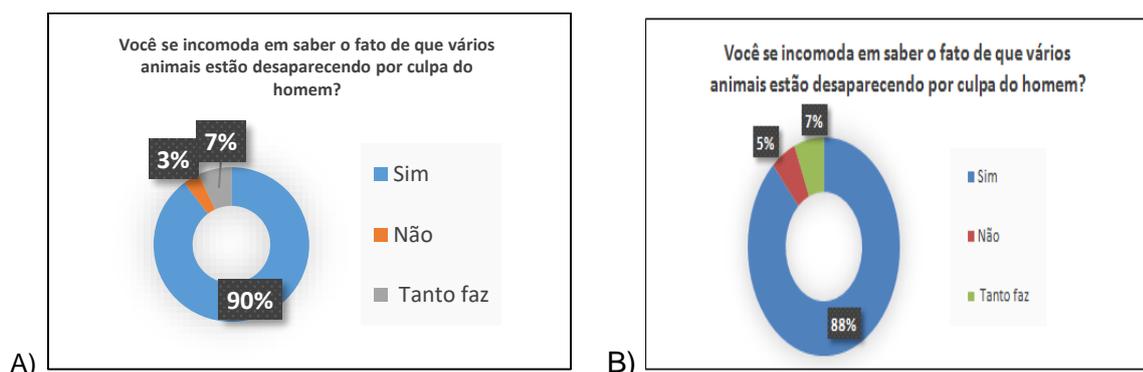
**Figura 11.** A) Referente a pergunta Realizada no Colégio AME: Se morrem todos os sapos do mundo, fará alguma diferença para o meio ambiente? B) Referente a pergunta Realizada na Escola Neutel Maia: Se morrem todos os sapos do mundo, fará alguma diferença para o meio ambiente?

Em relação ao questionamento, o homem, os animais e as plantas fazem parte do meio ambiente, e apresentam a mesma importância para a vida do planeta Terra, e o equilíbrio dos ecossistemas, 72% alunos do AME concordaram parcialmente e 28% discordaram totalmente. Enquanto 75% dos alunos da Escola Neutel Maia concordaram parcialmente e 25% discordam, conforme observado na Figura12.



**Figura 12.** A) Referente a pergunta Realizada no Colégio AME: O homem, os animais e as plantas fazem parte do meio ambiente, e apresentam a mesma importância para a vida do planeta Terra, e o equilíbrio dos ecossistemas. B) Referente a pergunta Realizada na Escola Neutel Maia: O homem, os animais e as plantas fazem parte do meio ambiente, e apresentam a mesma importância para a vida do planeta Terra, e o equilíbrio dos ecossistemas.

Sobre o questionamento, você se incomoda com o fato de que vários animais estão desaparecendo por culpa do homem, 90 % dos alunos do AME responderam sim e 3% não, enquanto 7% responderam que tanto faz. Já 88% dos alunos da Escola Neutel Maia responderam que sim, 5% que não e 7% disseram que tanto faz (Figuras 13).



**Figura 13.** A) Referente a pergunta Realizada no Colégio AME: Você se incomoda em saber que vários animais estão desaparecendo por culpa do homem? B) Referente a pergunta Realizada na Escola Neutel Maia: Você se incomoda em saber que vários animais estão desaparecendo por culpa do homem?

## 4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados observados nos gráficos é possível perceber a diferença, entre as respostas dos alunos do ensino público e do ensino particular, onde foram aplicados os questionários do projeto. No Colégio AME e na Escola Neutel Maia, percebeu-se que o nível de conhecimento dos alunos foi distinto para o tema abordado. Na escola particular foi visto que o nível de conhecimento sobre Anuros (sapos, rã e pererecas) indicou um maior percentual do que na escola pública.

Considerando que a estrutura das escolas é distinta, isso pode também ter influenciado no nível de aprendizagem dos alunos: a Escola Neutel Maia tem cerca de 35 alunos por sala, enquanto que no AME as salas de aula têm no máximo 15 alunos. Em termos de aprendizagem verificou-se que o elevado número de alunos pode dificultar o trabalho dos professores, pois os mesmos ficaram dispersos durante a realização das palestras e o nível de aprendizagem não foi o esperado para todos. Já no Colégio AME, boa parte dos alunos demonstraram interesse em aprender mais sobre o assunto, valendo ressaltar que dentre as quatro turmas em que foram aplicados os questionários, três alunos eram autistas e suas respostas foram muito boas.

As respostas dadas às questões: “O homem, os animais e as plantas fazem parte do meio ambiente, e apresentam a mesma importância para a vida do planeta Terra, e o equilíbrio dos ecossistemas?” e “Se morrem todos os sapos do mundo, fará alguma diferença para o meio ambiente?”, em ambas escolas, indicam a necessidade de um trabalho maior de sensibilização, dos alunos quanto ao papel dos mesmos nos ecossistemas.

Quanto ao aspecto ligado a rejeição verificou-se que as respostas relativas às questões: “Já ouviu falar que xixi de sapo pode cegar?; Você já jogou sal para espantar os sapos?; Os sapos são animais venenosos?; e Você tem medo ou nojo de sapo?, foram afirmativas para um percentual de alunos acima de 50%, em ambas escolas. O nível de conhecimento sobre Anuros (sapos, rã e pererecas) apresentou um maior percentual na escola particular do que na escola pública, provavelmente devido à melhor estrutura da mesma, em especial quanto ao número de alunos por sala, o que facilita em muito o trabalho do professor.

Apesar de o percentual das respostas serem mais positivos do que negativos, os resultados demonstram que ainda há desconhecimento sobre o papel dos animais nos

ecossistemas, em ambas escolas, indicando a necessidade de um trabalho maior de sensibilização, aliado aos conteúdos de Ciências Naturais das aulas convencionais.

Ainda se observa um certo grau de rejeição dos alunos em relação aos anfíbios, para as quais as respostas foram afirmativas para um percentual de alunos acima de 50%, corroborando a necessidade de um trabalho mais forte de Educação Ambiental em ambas escolas.

## 5. REFERÊNCIAS

ANJOS, M. B. **Desenvolvimento Sustentável: raízes e conceitos**. Rio de Janeiro: UNIPLI, 2003.

BARROS, F. B. **Sapos e seres humanos: uma relação de preconceitos?** Dissertação (Mestrado em Agricultras Amazônicas) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Pará, Belém, 2005

BLAUSTEIN, A.R.; WAKE, D.B. Declining amphibian populations: a global phenomenon? **Trende in Ecology and Evolution.**, v.5, p.203-204, 1990.

CRESPO, E. G.; OLIVEIRA, M. E. **Atlas da distribuição dos Anfíbios e Répteis de Portugal Continental**. 1989.

DIAS, G. F. **Educação Ambiental: Princípios e Práticas**. São Paulo, Gaia, 1991.

GASCON, C. Population and community level analyses of species occurrences of central Amazonian rainforest tadpoles. **Ecology.**, v.72, n.05, p.1731-1746, 1991.

HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. A. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience.**, v.55, n.3, p.207-217, 2005.

HADDAD, C. F. B. **Uma Análise da Lista Brasileira de Anfíbios Ameaçados de Extinção. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília: MMA, 2008.

HOFFMANN, M. et al. The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. **Science.**, v.330, n.10, p.1503-1509, 2010.

LOEBMANN, D. **Os Anfíbios da Região Costeira do Extremo Sul do Brasil: Guia Ilustrado**. Pelotas: USEB. 2005.

MEDEIROS, A. B. et al. A Importância da educação ambiental na escola nas séries iniciais. **Revista Faculdade Montes Belos.**, v.04, n.01, p.22-26, 2011.

PARRIS, K. M. Environmental and spatial variables influence the composition of frog assemblages in sub-tropical eastern Australia. **Ecography.**, v.27, n.03, p.392-400, 2004.

ROSSA-FERES, D. C. et al. **Herpetofauna.** Diretrizes para a conservação e restauração da biodiversidade no estado de São Paulo. São Paulo, SAM, 2008.

TOLEDO, L. F. **Anfíbios como bioindicadores.** Instituto Brasileiro Pró-Cidadania, Recife – Brasil, p.196-208, 16 ago. 2009.

WOEHL, G.; WOEHL, E. N. **Anfíbios da Mata Atlântica.** Instituto Rã-Bugio. Jaraguá do Sul – SC – Brasil, 2008.

## ORGANIZADORES

### Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti



Possui graduação em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná - CEULJI/ULBRA (2007), Especialista em Didática e Metodologia do Ensino Superior, Mestrado em Genética e Toxicologia Aplicada pela Universidade Luterana do Brasil - ULBRA (2011) e Doutorado em Biologia Experimental pela Universidade Federal de Rondônia (UNIR). É docente da Universidade Federal do Acre (UFAC) e professor permanente do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde na Amazônia Ocidental (MECS). É coordenador do Laboratório de Medicina Tropical (LabMedt) da UFAC, onde desenvolve pesquisas principalmente na área da relação parasito-hospedeiro.

### Clarice Maia Carvalho



Possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Amazonas (2000), Mestrado em Biotecnologia pela Universidade de São Paulo (2005) e doutorado em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas (2010). É docente da Universidade Federal do Acre (UFAC) e professor permanente e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia. É coordenadora do Laboratório de Microbiologia da UFAC, onde desenvolve pesquisas principalmente do potencial biotecnológico de microrganismos da Amazônia.

### Renato André Zan



Possui graduação em Química pela Universidade Federal de Santa Maria (2000), Mestrado em Química pela Universidade Federal de Santa Maria (2002), e Doutorado em andamento em Química de Produtos Naturais pelo IPPN da Universidade Federal do Rio de Janeiro. É docente do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Rondônia, Instituto Federal de Rondônia (IFRO), onde desenvolve pesquisas na área de Química, com ênfase em síntese inorgânica e orgânica, fitoquímica e ensino de química.

### Romeu Paulo Martins Silva



Possui graduação em Educação Física pelo Centro Universitário do Triângulo (2003), Especialização em Fisiologia do Exercício pela Universidade Veiga de Almeida, UVA/RJ (2005), Mestrado em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia (2007) e Doutorado em Genética e Bioquímica (2011). É docente da Universidade Federal do Acre (UFAC) e professor permanente e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde na Amazônia Ocidental (MECS). É coordenador do Laboratório Multifuncional da UFAC, onde desenvolve pesquisas principalmente do potencial de plantas da Amazônia na área da saúde.

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-65-80261-03-1



DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261031