

Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS

ScientiaTec

Edição Especial Biotecnologia
Volume 7, Número 3, Outubro 2020



INSTITUTO FEDERAL
Rio Grande do Sul

e-ISSN 2318-9584

ScientiaTec

ScientiaTec: Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS,
Edição Especial Biotecnologia, v. 7, n. 3,
ISSN 2318-9584

Conselho Editorial

Editora-chefe: Cibele Schwanke

IFRS - Campus Porto Alegre

Evandro Manara Miletto

IFRS - Campus Porto Alegre

Filipe Xerxeneski da Silveira

IFRS - Campus Porto Alegre

Gabriela Fernanda Cé Luft

IFRS - Campus Porto Alegre

Lizandra Brasil Estabel

IFRS - Campus Porto Alegre

Magali Lippert da Silva

IFRS - Campus Porto Alegre

Maria Cristina Caminha de Castilhos França

IFRS - Campus Porto Alegre

Telmo Francisco Manfron Ojeda

IFRS - Campus Porto Alegre

Conselho Científico

André Frazão Teixeira (UTAD, Portugal)

Andréa Poletto Sonza (IFRS, Brasil)

Carlos Roberto dos Anjos Candeiro (UFG, Brasil)

Clarice Monteiro Escott (IFRS, Brasil)

Diogo Onofre de Souza (URFGS, Brasil)

Fernanda Valli Nummer (UFPA, Brasil)

Franclin Costa do Nascimento (IFB, Brasil)

Júlio Xandro Heck (IFRS, Brasil)

Leandro Lesqueves Costalonga (UFES, Brasil)

Leonardo Xavier da Silva (URFGS, Brasil)

Luciana Calabro Berti (URFGS, Brasil)

Maria do Rocio Fontoura Teixeira (URFGS, Brasil)

Maria Helena Paiva Henriques (UC, Portugal)

Valdir José Morigi (URFGS, Brasil)

Editores

Ângelo Cássio Magalhães Horn

Karin Tallini

Paulo Artur Konzen Xavier de Mello Silva

Editoração eletrônica

Cibele Schwanke

Bruno Lentz

Diagramação e layout

Bruno Lentz

Avaliador ad hoc

Aline Nondillo

Andrea Pereira Silveira

Cibele Canal Castro

Cláudio Luis Crescente Frankenberg

Cristina Claumann Freygang

Darlene Ane de Paula Vieira

Diego Hepp

Fernanda Cattani

Fernanda da Silva Alabarce

Flávio Caldeira Silva

Isabel Amaral Martins

Joseane Jiménez Rojas

Juliana Schmitt de Nonohay

Kátia Helena Lipp Nissinen

Leonardo da Silva Bittencourt

Liliane Madruga Prestes

Magali da Silva Rodrigues

Magali Lippert da Silva Almeida

Roberta Fogliatto Mariot

Wendell Mombaque dos Santos

PREFÁCIO

O Brasil passa por um momento de desafios na educação pública. A crise fiscal e política que restringe o repasse de recursos pelo atual Governo Federal, ente que vê a educação como despesa e não como investimento, a julgar pelo discurso adotado no Ministério da Educação, afeta diretamente a rede pública de ensino e desestimula seus protagonistas, majoritariamente professores. Como a maior parte da pesquisa produzida no setor público tem origem justamente nas Universidades e Institutos Federais, o resultado é a precarização dessa atividade, elemento fundamental para a soberania de qualquer nação.

Mesmo frente a essa realidade desanimadora, esforços vêm sendo empreendidos dentro da rede federal de educação profissional, científica e tecnológica, tentando superar as dificuldades produzidas por uma política que compromete profundamente o desenvolvimento científico e tecnológico do país. O contingenciamento do orçamento destinado às agências de fomento de pesquisa e inovação implica no corte de bolsas, comprometendo à formação dos futuros recursos humanos. Neste contexto, o grupo de servidores do Curso Técnico em Biotecnologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul publica esta edição especial com o objetivo de comemorar seus 20 anos de existência promovendo o ensino e estimulando a pesquisa.

Essa edição é composta por 13 artigos que representam um pouco daquilo que vem sendo produzido pelo grupo de servidores ligados ao Curso durante esse período histórico. O primeiro artigo conta alguns aspectos da história que conduziram à criação do Curso, seu planejamento inicial, como ele é atualmente estruturado e qual o seu papel dentro de uma sociedade que se beneficia cada vez mais das ferramentas biotecnológicas. A este artigo seguem-se dois outros que versam sobre a utilização de diferentes substâncias naturais com potencial antitumoral. O volume continua com artigos que descrevem técnicas voltadas ao melhoramento da produção de cultivares e alguns métodos de extração de DNA e sua utilidade para a biologia. O monitoramento da efetividade de antibióticos na prática clínica e a manipulação de micro-organismos na produção de enzimas como a β -galactosidase e lipase,

para a utilização na indústria, são assuntos abordados na sequência. Também são temas dessa edição, a proposta de um novo tipo de anestésico voltado à piscicultura, a caracterização foliar para espécies vegetais e a interação entre parasita e espécie de cultivar. Por fim, completam a edição dois artigos sobre métodos e práticas de biossegurança em laboratórios de ensino e pesquisa.

Sem dúvida, este volume brinda os 20 anos de existência do Curso Técnico em Biotecnologia e o desenvolvimento da ciência, demonstrando os benefícios trazidos à população pela tecnologia envolvendo organismos vivos, a biotecnologia. Esse volume, de maneira inequívoca, aponta na direção da relevância de investimentos que possam gerar tecnologias inovadoras e, por conseguinte, conduzir nosso país a um sólido desenvolvimento, não só econômico, mas social, condição na qual o que é produzido pela ciência é usufruído pelo coletivo.

Karin Tallini

Paulo Artur Konzen Xavier de Mello Silva

Ângelo Cássio Magalhães Horn

**Curso Técnico em Biotecnologia do Instituto Federal de Educação Ciência e
Tecnologia – *Campus* Porto Alegre – 20 anos de história**

Karin Tallini

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(karin.tallini@poa.ifrs.edu.br)

Liliane Madruga Prestes

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(liliane.prestes@poa.ifrs.edu.br)

Paulo Artur Konzen Xavier de Mello Silva

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(paulo.xavier@poa.ifrs.edu.br)

Resumo: Este trabalho apresenta uma breve reflexão acerca dos 20 anos do Curso Técnico em Biotecnologia do IFRS - *Campus* Porto Alegre. O curso teve o início de suas atividades em 1996 na Escola Técnica de Comércio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e hoje faz parte do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) – *Campus* Porto Alegre. O trabalho relata sua origem, contextualizando o estudo: da Escola de Artes e Ofícios à oferta do Curso Técnico de Biotecnologia no IFRS - *Campus* Porto Alegre, assim como a sua organização curricular ao longo do período. Além disso, este artigo menciona as reflexões acerca dos pressupostos teóricos e metodológicos e das práticas educativas voltadas à formação do indivíduo como técnico em Biotecnologia, além das atividades de ensino, pesquisa e extensão e desafios na carreira na atualidade.

Palavras-chave: Biotecnologia; Ensino profissionalizante; Histórico.

**Technical course in biotechnology of the Federal Institute of Education
Science and Technology - *Campus* Porto Alegre - 20 years of history**

Abstract: This paper presents a brief reflection on the 20 years of the Technical Course in Biotecnology at IFRS - *Campus* Porto Alegre. The course started in 1996 at the Technical School of Commerce of the Federal University of Rio Grande do Sul and today is part of the Federal Institute of

Education, Science and Technology of Rio Grande do Sul (IFRS) - Campus Porto Alegre. The work reports its origin, contextualizing the study: from the School of Arts and Crafts to the offer of the Technical Course in Biotechnology at IFRS - Campus Porto Alegre, as well as its curricular organization throughout the period. In addition, this article mentions reflections on theoretical and methodological assumptions and educational practices aimed at training the individual as a technician in Biotechnology, in addition to teaching, research and extension activities and career challenges nowadays.

Keywords: Biotechnology; Vocational education; History.

DA ESCOLA DE ARTES E OFÍCIOS À OFERTA DO CURSO DE TÉCNICO EM BIOTECNOLOGIA

No Brasil, a Lei Federal nº 11.892 de 29/12/2008 (BRASIL, 2008) institui a Rede Federal de Educação Profissional, Científica e Tecnológica, criando os Institutos Federais de Educação, Ciência e Tecnologia (IFs), os quais estão espalhados por todo o território nacional. Neste cenário, cabe destacar o fato de que já existiam escolas técnicas federais, muitas das quais integrantes das Universidades e que passaram a compor os campi dos Institutos. Isso ocorreu com a Escola Técnica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) que passou a integrar o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS), dando origem ao Campus Porto Alegre. Logo, ao contextualizar a origem do Campus Porto Alegre, cabe destacar que apesar dos IFs terem pouco menos de uma década de criação, a escola federal que atualmente é o campus Porto Alegre conta com mais de um século.

A Escola Técnica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul teve a sua origem no curso geral da Escola de Comércio de Porto Alegre, anexada a Faculdade de Livre Direito de Porto Alegre. A nova Escola de Comércio resolveu que seu ensino seria essencialmente prático, adotando o plano fixado pelo Decreto Federal nº 1.339, de 09 de fevereiro de 1905, já seguido pelas Acadêmicas de São Paulo e do Rio de Janeiro (AZEVEDO e CARVALHO, 2010, p.212).

A Escola Técnica de Comércio remonta o período da 1ª República, durante o qual foram criadas as escolas de artes e ofícios destinadas aos meninos egressos da Roda dos Expostos da Santa Casa. Diferentemente da perspectiva atual dos IFs, a educação profissional ofertada à época caracterizava-se pelo caráter

assistencialista e dualista, ou seja, destinada para pobres e/ou denominados “desvalidos da sorte”, conforme evidencia Moura (2010).

A educação profissional no Brasil tem, portanto, a sua origem dentro de uma perspectiva assistencialista, com o objetivo de amparar os órfãos e os demais desvalidos da sorte, ou seja, de atender àqueles que não tinham condições satisfatórias, para que não continuassem a praticar ações que estavam na contraordem dos *bons costumes* - grifo do autor (MOURA, 2010, p. 62).

Neste contexto foi fundada a Escola Técnica de Comércio, em 26 de novembro de 1909, como Escola Técnica de Porto Alegre, habilitava aos cargos da fazenda e às funções de guarda-livros e perito judicial. A partir de 1946, consolidou-se em escola de graus médio com transformação desses cursos no curso Técnico em Contabilidade.

Em 1950, a Escola passou a integrar o Sistema Federal de Ensino como Escola Técnica de Comércio vinculada à UFRGS. Em 1954, foi criado o curso de Administração e, em 1958, o de Secretariado. Com o advento da Lei 5.692, de 11 de agosto de 1971 (BRASIL, 1971), que fixou as Diretrizes e Bases para o ensino de 1º e 2º graus, foram criados os cursos técnicos de Operador de Computador (1975), transformado depois em Processamento de Dados, Transações Imobiliárias (1976), Comercialização e Mercadologia (1979) e Segurança do Trabalho (1989).

A Escola Técnica de Comercio conforme seu Manual do Aluno de 1998 se descreve como:

[...] A Escola Técnica de Comercio se caracteriza como profissionalizante, tendo como objetivo fundamental a preparação de técnicos. Não descuida da educação geral: faz isso como propósito de promover valores humanos que embasem e sustentem a ação profissional do técnico de nível médio [...].

No que diz respeito às diretrizes pedagógicas conforme, o Manual do Aluno de 1998, se descreve como:

[...] Queremos através da Escola, a formação de uma sociedade fraterna, onde o homem seja valorizado antes e acima da técnica: onde os valores humanos embasem e sustentem o homem técnico. Para isso a Escola deve considerar o aluno em três aspectos: como indivíduo, a partir do pensamento, criatividade e criticidade; como cidadão, que desenvolve o espírito de cidadania, sociabilidade,

integração, motivação e visão geral da sociedade; como profissional, viabilizando condições para a formação da competência e atualização. [...]

Tal concepção de educação profissional pautou, durante muito tempo, as políticas educacionais brasileiras. De um lado, a oferta da formação profissional era destinada às camadas populares e, de outro, o ensino propedêutico era voltado para a formação das elites. Buscando romper com tal dualista histórica, a criação dos IFs pautou-se na busca de promover a oferta da educação profissional, tanto no âmbito da Educação Básica, quanto no Ensino Superior promovendo a expansão do ensino público, gratuito e de qualidade. Para tanto, as ações desenvolvidas na formação inicial e continuada visam a articulação entre as ações de ensino, da pesquisa e da extensão partindo do entendimento do trabalho enquanto princípio educativo e do caráter interdisciplinar nos processos de produção e difusão de conhecimentos.

Visando consolidar tais princípios e atender as demandas do contexto local e regional, entre os cursos ofertados no IFRS - Campus Porto Alegre citamos o Curso Técnico em Biotecnologia - subsequente. Conforme enfatizado Faleiro *et al.* (2011), tal área de conhecimento tem origem na união da biologia com a tecnologia.

A Biotecnologia – conceitualmente, a união de biologia com tecnologia – é um conjunto de técnicas que utiliza os seres vivos, ou parte desses, no desenvolvimento de processos e produtos que tenham uma função econômica e (ou) social. A biotecnologia envolve várias áreas do conhecimento e, em consequência, vários profissionais, sendo uma ciência de natureza multidisciplinar (FALEIRO *et al.*, 2011, p. 13).

Os autores destacam que investigar o surgimento da Biotecnologia, remete a própria história da humanidade, uma vez que a necessidade de transformação e adequação do meio às necessidades individuais e coletivas culminou no desenvolvimento de estratégias voltadas à subsistência. Como exemplo, citam o desenvolvimento e o aprimoramento de técnicas para a ampliação da produção e conservação de alimentos, tais como a fermentação de bebidas e produção de pães.

Considerando o seu conceito amplo, podemos dizer que a biotecnologia iniciou-se com a agricultura ou agropecuária, ou seja, com a capacidade do homem de domesticar plantas e animais para seu benefício. Estima-se que 8000 anos a.C., na Mesopotâmia, berço da civilização, os povos selecionavam as melhores sementes das melhores plantas para aumentar a colheita. Outro exemplo

histórico da biotecnologia é a utilização da levedura na fermentação da uva e do trigo para produção de vinho e pão, o que já acontecia por volta de 7000 anos a.C. Estima-se que a utilização de bactérias para a fermentação do leite para produção de queijos já acontecia a 3000 anos a.C. Logicamente, os povos dessa época não faziam ideia que as leveduras e bactérias fossem utilizadas nesses processos de fermentação (FALEIRO *et al.*, 2011, p.16).

Nesta mesma seara de estudos, Malajovich (2012) ressalta que com o aumento da população mundial e a migração para as cidades, além das questões relacionadas à alimentação, surgiram outras demandas, como exemplo, cita a necessidade de implementação de saneamento urbano e de estratégias voltadas à promoção da saúde coletiva.

Neste cenário, surge a biotecnologia enquanto área de conhecimento, cujo termo é utilizado pela primeira vez no ano de 1919, resultante da articulação não apenas da biologia e da tecnologia, mas incluindo outras tais como a biologia, a imunologia, a química, a bioquímica, entre outras.

A partir de 1850 surgem novas áreas do conhecimento. Nasce a Microbiologia, a Imunologia, a Bioquímica e a Genética. A Química Industrial se desenvolve aceleradamente e, também, aumenta a intervenção da Engenharia Agrícola e da Pecuária no gerenciamento do campo. Em 1914, Karl Ereky, um engenheiro agrícola húngaro, desenvolve um gigantesco plano de criação de suínos visando substituir as práticas tradicionais por uma indústria agrícola capitalista baseada no conhecimento científico. Deve-se a Ereky (1919) a primeira definição de biotecnologia, como “a ciência e os métodos que permitem a obtenção de produtos a partir de matéria-prima, mediante a intervenção de organismos vivos”. Para ele, a era bioquímica substituiria a era da pedra e do ferro. O século XX assiste a um desenvolvimento extraordinário da ciência e da tecnologia (eletrônica e informática). Da convergência entre ambas resultam logros extraordinários em vários setores produtivos, onde os seres vivos constituem a base de itens tão diversos como a produção de variedades vegetais mais produtivas, a fabricação de novos alimentos, o tratamento do lixo, a produção de enzimas e os antibióticos. (MALAJOVICH, 2012, p.17).

Diante do exposto, cabe salientar o caráter interdisciplinar e a importância da biotecnologia na atual conjuntura, em particular, envolvendo a busca de estratégias voltadas ao atendimento de demandas individuais e/ou coletivas. Neste sentido, a oferta do Curso Técnico em Biotecnologia na rede pública federal de educação profissional e, particularmente, no IFRS - Campus Porto Alegre, busca democratizar

o acesso a tais conhecimentos, historicamente produzidos, corroborando para a melhoria da qualidade de vida da população.

HISTÓRICO DA ORGANIZAÇÃO CURRICULAR DO CURSO TÉCNICO EM BIOTECNOLOGIA

No início dos anos de 1990, época de muitas descobertas, foi estabelecido o consórcio internacional para o sequenciamento do genoma humano e a Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, a FDA (*Food and Drug Administration*) aprova o primeiro produto alimentício geneticamente modificado (GM), o tomate FlavrSavr® (CARRER *et al.*, 2010).

Nos anos de 1990 pouco se ouvia falar de biotecnologia no Brasil, normalmente, as notícias sobre os avanços na agricultura e na medicina eram provenientes de estudos desenvolvidos por pesquisadores nas universidades e pela Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA) e aquelas advindas dos países de dito “primeiro mundo”, como temas como: as plantas transgênicas e a clonagem de mamíferos.

Em 1991, um grupo de professores da Escola Técnica de Comércio da UFRGS, propôs a criação de um Curso Técnico em Biotecnologia em parceria com o Centro de Biotecnologia da Universidade com auxílio dos professores da graduação em Biotecnologia.

Em 1995 a proposta de abertura de um novo curso foi, finalmente, aceita pelos membros da comunidade escolar e, em dezembro do mesmo ano, um currículo composto de 8 semestres e 5.382 horas-aula desenvolvidas em dezoito semanas por semestre, com média de 32 horas-aula semanais, foi idealizado e aprovado pela congregação. Neste currículo, já constavam componentes que, atualmente, permanecem na organização curricular do curso como, por exemplo, Parasitologia, Genética, Bioquímica, Microbiologia e Cultura de Células Animais, porém com uma carga-horária praticamente igual aos cursos de Graduação em Biotecnologia.

O Curso Técnico em Biotecnologia começou a ser oferecido pela Escola Técnica de Comércio da UFRGS em 1996, concomitantemente ao ensino médio, com alunos selecionados através de exame de seleção. Cabe dizer que, neste

mesmo ano a Escola Técnica de Comércio da UFRGS passa a se chamar Escola Técnica da UFRGS.

O Secretário da Educação Média e Tecnológica do Ministério da Educação e do Desporto, Átila Lira, através da Portaria nº 134 de 23 de outubro de 1997, autoriza o funcionamento do Curso Técnico em Biotecnologia a partir de 1998 (BRASIL, 1997).

No ano seguinte, a publicação da Resolução nº 04 de 08 de dezembro de 1999 do presidente da Câmara de Educação Básica do Conselho Nacional de Educação instituiu as Diretrizes Curriculares Nacionais para a Educação Profissional de Nível Técnico e cria o Cadastro Nacional de Cursos de Educação Profissional de Nível Técnico (BRASIL, 1999). Na tentativa de se adequar às novas regras e diretrizes, o colegiado do Curso Técnico em Biotecnologia, juntamente com a equipe pedagógica da Escola Técnica da UFRGS, reformulou o Plano de Curso e publicaram, em 2000, uma nova organização curricular.

Pensando em atender a demanda de mercado identificada e as diretrizes pedagógicas norteadoras vigentes, o currículo experimental do Curso Técnico em Biotecnologia foi publicado com uma organização curricular dividida em quatro módulos de ensino semestrais com caráter de terminalidade, sem vínculo de dependência entre eles, a saber:

1. Processos Bioquímicos e Genéticos;
2. Análises Celulares, Moleculares, Microbiológicas e Parasitológicas;
3. Bioprocessos;
4. Gestão de Biotecnologias.

A cada módulo concluído o aluno tinha direito a certificação de qualificação, sendo que ao final dos quatro módulos, a Escola Técnica da UFRGS concedia o Certificado de Habilitação de Técnico em Biotecnologia.

No início dos anos 2000, a área da biotecnologia avança vertiginosamente, juntamente com a informática. O Consórcio do Genoma Humano e o grupo Celera publicam a nossa sequência genômica, a ovelha clonada Dolly morria com problemas respiratórios e a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) era criada para auxiliar o governo na implementação de uma política nacional de biossegurança relativa aos cultivos transgênicos (CARRER *et al.*, 2010). Nessa mesma época, o governo reconhece a biotecnologia como área estratégica no

desenvolvimento do País e implementa uma série políticas públicas incentivando o crescimento da biotecnologia, principalmente no Rio Grande do Sul.

Em julho de 2001, a Secretaria de Educação Média e Tecnológica do Ministério da Educação, através da Coordenação Geral de Educação Profissional, emitiu orientações para reformulação e apresentação dos planos de cursos técnicos com base na resolução CNE/CEB nº 04/99 (BRASIL, 1999). Aproveitando a obrigatoriedade da adequação do plano às diretrizes curriculares nacionais, em 2002, o Curso Técnico em Biotecnologia implantou um novo currículo experimental, agora na área profissional de Química. No estudo de mercado realizado, o plano de Curso Técnico em Biotecnologia (UFRGS, 2002) identificou uma demanda carente e premente de profissionais na área, principalmente, na indústria.

A nova organização curricular do curso promoveu uma modificação no formato do percurso formativo do discente. Neste novo formato foram contemplados 3 semestres conteudistas de 300 horas, mais um estágio supervisionado (300 h), totalizando uma carga horária de 1200 horas, organizado como segue:

1. Processos Moleculares e Genéticos;
2. Análises Bioquímicas, Histológicas e Imunológicas;
3. Processos Microbiológicos, Parasitológicos e Bioprocessos;
4. Estágio Curricular.

Essa organização era pautada em elaboração e execução de projetos nos três primeiros semestres do curso, exigindo dos alunos conhecimento e aplicação da metodologia científica, do delineamento de experimentos e da instalação de projetos biotecnológicos. O processo pedagógico, considerado moderno para época, incentivou muitos alunos egressos a continuarem sua jornada formativa na academia universitária de várias instituições.

Os conteúdos desenvolvidos no componente curricular com a mesma designação (Elaboração e Execução de Projetos) em semestres sucessivos, mais tarde, incitaram os docentes do colegiado a reformularem o currículo modificando o nome deste e de outros componentes.

Em 2010, com a reformulação do plano de curso, a formação do técnico em biotecnologia continuou ocorrendo em 4 semestres de módulos de ensino independentes, com exceção do estágio curricular obrigatório (IFRS, 2010):

1. Analista em técnicas moleculares e genéticas;
2. Analista em técnicas bioquímicas e histológicas;

3. Analista em biotecnologias industriais;
4. Estágio curricular técnico em biotecnologia.

O discente ingressante deve cursar todos os componentes curriculares do primeiro semestre e, a partir do segundo semestre pode optar por matricular-se em qualquer módulo, inclusive em estágio curricular obrigatório. Esse privilégio garante inclusive a matrícula concomitante em dois turnos, o que possibilita a conclusão do curso em 3 semestres ou a recuperação de componentes curriculares, nos quais o aluno tenha sido reprovado.

Nesse novo plano de curso houve mudanças, o componente curricular Biossegurança foi introduzido em dois semestres do curso, no segundo semestre foi criado o componente de Introdução a Biotecnologia Ambiental e no terceiro a Bioestatística e a Gestão de Laboratórios. A Informática foi deslocada para o primeiro semestre, passando para o segundo semestre o inglês, a Parasitologia e os Processos Fermentativos, que passou a ser chamado de Processos Bioquímicos. Vários outros componentes mudaram sua designação, como por exemplo, Educação Postural tornou-se Saúde e Trabalho e as Técnicas de Redação Científica passou a ser Língua Portuguesa.

Os conteúdos foram adequados aos nomes criados. A Genética excluiu a parte de Evolução e começou a ser chamada de Genética Aplicada. O componente curricular que mais se modificou foi aquele que se repetia em todos os semestres, a Elaboração e Execução de Projetos. No primeiro semestre, foi designado somente de Elaboração de Projetos, onde os alunos aprendem a metodologia científica e a escrever seus experimentos na forma de projetos. No segundo semestre, o componente recebeu o nome de Execução de Projetos, no qual os alunos participam de projetos de citologia e histologia. E, no terceiro semestre, a maior das transformações, o componente foi designado de Empreendedorismo e os alunos aprendem noções de negócios empresariais na área de Biotecnologia.

Em 08 de maio de 2015, o Conselho Superior do IFRS aprovou a Resolução nº 046 (Organização Didática) (IFRS, 2015), alterada mais tarde pela Resolução nº 071, de 25 de outubro de 2016. Por conta desta Organização Didática que tenta padronizar os planos de curso do IFRS, portanto, o currículo do Curso Técnico em Biotecnologia vai, novamente, se modernizar e oferecer a melhor formação profissional para os alunos do ensino público federal.

O CURRÍCULO EM AÇÃO: DAS PRÁTICAS EDUCATIVAS VOLTADAS À FORMAÇÃO DO TÉCNICO EM BIOTECNOLOGIA

O curso Técnico em Biotecnologia iniciou suas atividades práticas no primeiro semestre de 1998, para este fim foi destinada uma sala, no primeiro andar do prédio da então Escola Técnica do Comércio, a fim de que ocorressem as aulas práticas específicas de biotecnologia. Os professores envolvidos no início da implantação do curso instituída pelo decreto nº2.208 de 1997 (BRASIL, 1997) do Curso Técnico em Biotecnologia foram: Ana Izaura Pereira Flores (Botânica), Karin Tallini (Biotecnologia), Paula Beatriz de Araújo (Zoologia) e Pedro Bolívar Marzulo Oliveira (Biologia Geral) com orientação pedagógica de Sonia Cardoso. Nos ajustes subsequentes, com a saída da professora Paula Beatriz de Araújo e professor Pedro Bolívar Marzulo Oliveira já sob o Decreto nº 5.154/04 (BRASIL, 2004), se incorporaram os professores Juliana Schmitt de Nonohay e Paulo Artur Konzen Xavier de Mello e Silva, assim sendo, neste quadro até o momento havia 4 professores atuantes na área de Biotecnologia.

Os primeiros equipamentos para os laboratórios de biotecnologia foram adquiridos no ano de 1997, pelo, então, diretor Aldo Antonello Rosito, por meio de um projeto de ensino técnico submetido ao Ministério da Educação para a efetivação de uma parceria com uma empresa privada. Entre os equipamentos adquiridos e considerados básicos estavam a cabine de fluxo laminar vertical, cubas de eletroforese, centrífugas, espectrofotômetro digital, microscópios, estufas, banho-maria, cubas de eletroforese.

Ressaltamos que o curso foi o segundo a ser implementando no país e, neste sentido, sua trajetória foi de muitos desafios e parcerias com outros cursos, para a implementação tanto dos laboratórios, quanto do corpo docente e de pessoal técnico. Citamos o fato de que o curso contou com auxílio de vários departamentos da UFRGS, tais como Bioquímica, Biotecnologia, Farmácia, Fisiologia, Química e Veterinária que doaram reagentes e materiais, além de outros professores de cursos de graduação e pós-graduação que auxiliaram nas primeiras aulas práticas, já que para muitas outras disciplinas específicas como Cultura de Tecidos Vegetais, Genética Molecular, Parasitologia, Tecnologia de Processos Fermentativos, as aulas só foram possíveis com apoio de professores substitutos.

Inicialmente, 1996, o Curso ocorria de forma concomitantemente, com o ensino médio (na época, denominado como 2º grau) com duração de 04 anos, sendo os dois últimos destinados à formação técnica. Para atender tal formação específica a partir do 3º ano foi contratada uma única professora especializada para ministrar as atividades práticas além de contar com um servidor auxiliar da área técnica. Embora houvesse a previsão da ampliação do corpo docente com a inclusão de 09 especialistas para a parte prática, isso somente foi efetivado no ano de 2010. Diante desta realidade de escassez de recursos humanos, uma das estratégias adotadas neste período foi o envolvimento dos discentes em atividades relacionadas à organização do espaço físico e materiais do laboratório.

A fim de buscar alternativas para a implementação do Curso, no ano de 1998, durante três meses, a primeira turma ficou responsável por classificar e organizar todos os materiais recebidos para o laboratório, o que foi realizado mediante o acompanhamento da docente e do auxiliar. Além disso, foi feito ao longo do ano a relação de materiais de consumo para a realização das atividades práticas.

Podemos exemplificar que para que as primeiras aulas práticas de cultura de células ocorressem, não tinham disponíveis ainda vários equipamentos e insumos para os processos de esterilização. Então foi possível utilizar técnicas como a de suspensão de células, para as quais utilizavam-se animais e tecidos vivos que não precisavam de muitos processos de esterilização, já que o cultivo de placas de células no início foi inviável. Foram realizadas parcerias com o Biotério do Instituto de Biociências que forneceu ratos Wistar, além do apoio de professores do Departamento de Fisiologia da UFRGS que auxiliaram nas primeiras aulas práticas das turmas de modo presencial, seguindo as orientações e normativas previstas na legislação da época quanto ao uso de animais para tal fim. Também foi realizada uma parceria com o Departamento de Veterinária da UFRGS, onde os alunos tinham aula utilizando sêmen de carneiro.

Concomitantemente, fez-se um estudo para adaptar as aulas de Bioquímica, pois na maior parte os protocolos conhecidos e estabelecidos para aulas práticas se utilizavam, preferencialmente animais ou alguns tipos de material biológico advindo destes. Entre as estratégias utilizadas optou-se por utilizar alimentos tendo início uma pesquisa para criar e adaptar novos protocolos de aulas práticas. No referido estudo, o curso teve o apoio de professores do Departamento de Fisiologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUC – RS no

desenvolvimento de técnicas experimentais tais como para o controle da qualidade em produtos como carne, peixes e leite.

No ano de 1999, houve a expansão da estrutura física da escola com a construção de novos laboratórios através de recursos oriundos do Ministério da Educação, o Ministério do Trabalho e o Banco Interamericano de Desenvolvimento (BID). Tal ampliação integrava o Programa de Expansão da Educação Profissional (PROEP), coordenado pela Secretaria de Ensino Médio e Tecnológico do Ministério da Educação (MEC). No ano de 2000 foi iniciado o projeto de construção do anexo I, do prédio da Escola Técnica de Comercio, e assim, o 3º pavimento do projeto destinado à construção dos laboratórios de Biotecnologia, salas e gabinetes de professores do curso.

No ano de 1999, foi realizada a primeira atividade de divulgação, voltada ao compartilhamento de experiências desenvolvidas no curso a qual foi intitulada “Mostra de Trabalhos dos Cursos de Química e Biotecnologia”. A ação foi realizada nos dias 6 e 7 de janeiro e, também, neste mesmo ano foi realizado o “Ciclo de Debates em Ciência e Tecnologia” que ocorreu em 13, 14 e 15 de outubro de 1999 e integrou os Cursos de Técnico em Biotecnologia, Técnico em Química e Técnico em Gerenciamento e Monitoramento Ambiental. No ano de 2000, ocorreu a II Mostra de Trabalhos de Iniciação Científica com o engajamento de mais cursos da escola, além da elaboração de um livro de resumos. Desde então, todos os anos tivemos a realização das apresentações, e, atualmente, estamos organizando a 20ª Mostra de Pesquisa, Ensino e Extensão do IFRS – Campus Porto Alegre que tradicionalmente ocorre no mês de outubro.

CURSO TÉCNICO EM BIOTECNOLOGIA: DA UFRGS AO IFRS – CAMPUS PORTO ALEGRE

A publicação da Lei nº. 11.892 em 29 de dezembro (BRASIL, 2008) cria 38 Institutos Federais - instituições de educação superior, básica e profissional, pluricurriculares e multicampi, especializados na oferta de educação profissional e tecnológica nas diferentes modalidades de ensino - entre eles, o IFRS, dessa forma, no ano 2009 a Escola Técnica da UFRGS passa por um grande processo de transformação, desvinculando-se da UFRGS, passando a denominar-se Campus - Porto Alegre do IFRS.

Em 2011, parte da estrutura do Campus Porto Alegre entra em funcionalidade na sua nova sede própria, localizada no Centro Histórico de Porto Alegre (Rua Cel. Vicente, 281, esquina Voluntários da Pátria). Na zona central da capital gaúcha, a nova estrutura, com 48.000 m², permite ao Campus ampliar ainda mais a oferta de vagas e o número de alunos, além de oferecer novos cursos. E em outubro de 2014 começa o processo de mudança do curso da antiga sede para a atual sede.

Hoje o Curso conta com 7 laboratórios, a saber: Laboratório de Microbiologia (61,13 m²), Laboratório de Bioquímica (76,72 m²), Laboratório de Microscopia (55,74 m²), Laboratório de Biologia Molecular (48,38 m²), Laboratório de Cultura de Células Animais (75,35 m²), Laboratório de Cultura de Células Vegetais (72,95 m²) e Laboratório de Histologia (54,07 m²). Nestes laboratórios há equipamentos essenciais para o desenvolvimento das competências constituintes de cada semestre do curso relacionadas à Biologia, tais como centrífugas de bancada, balanças analíticas, espectrofotômetros (sendo que uma deles permite leitura ultravioleta visível), agitadores magnéticos, estufas de secagem de materiais, micropipetas, destilador de água, geladeiras, potenciômetros, banho-maria, microscópios, câmera filmadora acoplada a microscópio, lupas, transiluminador de luz ultravioleta (UV) para visualização de géis, autoclaves, sistema de purificação de água, capela de fluxo laminar vertical, estufa de incubadora, microscópio invertido, forno de micro-ondas, capela de fluxo laminar horizontal, estufas bacteriológicas, freezer, contador de colônias digital, termociclador, microcentrífuga, cubas para eletroforese vertical e horizontal, processador de tecido automático, micrótomos rotativos, banho-maria histológico, parafinador, entre outros. Além destes laboratórios, também compõem esta estrutura uma sala de lavagem (32,87 m²), Almoarifado de materiais e produtos químicos (14,97 m²) e uma sala para o pessoal técnico (14,97 m²).

Neste processo ocorre à ampliação de vagas docentes e de técnicos de laboratório, hoje o curso conta com nove professores especializados e três técnicos de laboratórios.

Atualmente, o Curso Técnico em Biotecnologia articula os eixos do ensino, da pesquisa e da extensão consolidando o caráter interdisciplinar do currículo. Entre tais momentos, citamos o Encontro Acadêmico da Biotecnologia, cuja sétima edição ocorreu em junho de 2019 nas dependências do Campus, contando com a

participação de pesquisadores e profissionais da área que atuam em diversos contextos.

No que diz respeito à pesquisa, no ano de 2010, foi criado o grupo de pesquisa Biotecnologia Animal e Vegetal vinculado ao Diretório dos Grupos de Pesquisa no Brasil, hoje com o nome de Núcleo Interdisciplinar de Estudos em Biotecnologia (NIEB) que reúne os professores especializados, alunos e técnicos do curso nas seguintes linhas de pesquisa: análises de citotoxicidade e genotoxicidade; biossegurança; botânica aplicada; caracterização genética de populações por análises moleculares; educação e ciência; estudo e melhoramento genético vegetal com espécies brasileiras de Interesse econômico; inovação; microbiologia e propriedades anti-neoplásicas de biocompostos.

Todavia, convém destacar que apesar da biotecnologia enquanto ciência estar presente no cotidiano das pessoas, não raras vezes, a popularização de alguns termos acaba ocorrendo de forma superficial e/ou equivocada, atendendo a interesses econômicos (como no caso, de uso em terminologia de propagandas, etc.). Tais entendimentos foram evidenciados no levantamento realizado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (BRASIL, 2015), ao mapear as percepções dos brasileiros com relação à ciência e tecnologia. Os dados produzidos revelaram que uma das dificuldades na interpretação do instrumento de pesquisa foi à falta de compreensão dos entrevistados acerca do significado de alguns termos, entre os quais, cita a biotecnologia. Como consequência, apenas 7% (sete) por cento dos entrevistados apontou a área de biotecnologia como prioridade para os investimentos em ciência e tecnologia no país.

Diante do cenário acima, entendemos que um dos desafios postos ao curso é a ampliação de tais horizontes com relação à ciência e a tecnologia, em particular, no âmbito da Biotecnologia. Para tanto, compactuamos do entendimento de Demo (2010) que ao focar o conceito de educação científica enquanto estratégia para a promoção da produção, acesso e popularização da ciência, centrando as práticas educativas não restritamente na transmissão de conhecimentos, mas requer compreender que

[...] o conhecimento reproduzido é mera informação, e esta reprodução, se fosse o caso, é mais jeitosamente feita por estratégias virtuais. Vale ainda lembrar que conhecimento reproduzido é plágio. Em vez de acentuar a aula como referência

central de ensino e aprendizagem, é imprescindível valorizar pesquisa e elaboração, autoria e autonomia, atividades que naturalmente desembocam na “construção de conhecimento”. Ao mesmo tempo, é fundamental unir qualidade formal e política. De um lado, é essencial saber construir conhecimento metodologicamente adequado, discutir metodologia científica, construir textos formalmente corretos, aprender a fundamentar e a argumentar. De outro, é decisivo saber o que fazer com conhecimento, saber pensar e intervir, propor alternativas, fazer-se sujeito de história própria, individual e coletiva (DEMO, 2010, p.22).

No âmbito do Curso Técnico em Biotecnologia, tal entendimento nos desafia, cotidianamente, a intensificarmos as estratégias pedagógicas a fim de que, conforme preconizado por Demo (2010), os conhecimentos científicos possam acima de tudo contribuir para a qualidade de vida (saúde, alimentação, entre outros) auxiliando no desenvolvimento não meramente para atender demandas do cenário econômico. Para tanto, a proposta pedagógica tem como foco a formação de profissionais comprometidos com o contexto social e cultural no qual estão inseridos. Isso implica o desenvolvimento de atitudes éticas, com sólida formação no seu campo de atuação, o qual se caracteriza pela interdisciplinaridade que constitui a Biotecnologia desde as suas origens.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, G. A.; CARVALHO, I. H. **Escolas técnicas vinculadas às universidades federais - uma breve história**. In: MOOL, Jaqueline (org.). Educação profissional e tecnológica no Brasil contemporâneo: desafios, tensões e possibilidades. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.

BRASIL. Lei nº 5.692 de 11 de agosto de 1971. **Fixa diretrizes e bases para o ensino do 1º e 2º graus, e dá outras providências**. Brasília, 1971. Disponível em: <<https://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1970-1979/lei-5692-11-agosto-1971-357752-publicacaooriginal-1-pl.html>> Acesso em: 10 jun 2019.

BRASIL, Ministério da Educação. **Portaria nº 134 de 23 de outubro de 1997 autoriza o funcionamento do Curso Técnico em Biotecnologia a partir de 1998**. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 23 de out. 1997. p.

BRASIL. Decreto nº 2.208, de 17 de Abril de **1997 Regulamenta o § 2º do art. 36 e os arts. 39 a 42 da Lei nº 9.394, de 20 de dezembro de 1996**, que estabelece as diretrizes e bases da educação nacional. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1997/decreto-2208-17-abril-1997-445067-norma-pe.html>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

BRASIL. Resolução nº 04/1999 CNE/CEB. **Institui as Diretrizes Curriculares Nacionais para a Educação Profissional de Nível Técnico**. Disponível em: <http://portal.mec.gov.br/dmdocuments/rceb004_99.pdf>. Acesso em: 10 jun 2019.

BRASIL. Decreto nº 5.154 de 23 de julho de 2004, **Regulamenta o § 2º do art. 36 e os arts. 39 a 41 da Lei nº 9.394, de 20 de dezembro de 1996**, que estabelece as diretrizes e bases da educação nacional, e dá outras providências. Brasília, 2014. Disponível em: <http://www.educacaoprofissional.seduc.ce.gov.br/images/decretos/Decreto_5154-2004.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2019.

BRASIL. Lei nº 11.892, de 29 de dezembro de 2008. **Diário Oficial da União, Institui a Rede Federal de Educação Profissional, Científica e Tecnológica**, cria os Institutos Federais de Educação, Ciência e Tecnologia. Disponível em: <<http://www2.ifam.edu.br/instituicao/missao-e-visao/leidecriaodosinstitutosfederaisdeeducaocienciaetecnologia.pdf>>. Acesso em: 10 jun 2019.

BRASIL. **Percepção pública da ciência e da tecnologia**, 2015. Ciência e Tecnologia no olhar dos brasileiros. Brasília, 2015. Disponível em: <https://www.cgee.org.br/documents/10195/734063/percepcao_web.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2019.

CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. **Biotecnologia na Agricultura**. Estudos Avançados. vol.24 n.70, São Paulo. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142010000300010>. Acesso em: 10 jun. 2019.

DEMO, P. **Educação Científica**. Revista Educação Profissional, Rio de Janeiro, v. 36, n.1, jan./abr. 2010.

FALEIRO, F.; ANDRADE, S. R.; JÚNIOR, F. R. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/916213/1/LivroFaleiro01.pdf>>. Acesso em: 10 jun 2019.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL – *Campus Porto Alegre* - IFRS. **Projeto Pedagógico do Curso Técnico em Biotecnologia**, 2010. Disponível em: <http://www.poa.ifrs.edu.br/wp-content/uploads/2009/05/projeto_pedagogico_biotecnologia.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2018.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL - IFRS - CONSUP. **Resolução CONSUP nº 046**, 08/05/2015. Bento Gonçalves, RS, 08 mai. 2015. Disponível em: < https://ifrs.edu.br/wp-content/uploads/2017/10/Resolucao_086_17_Completa.pdf >. Acesso em: 10 jun 2019.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia 2011**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012. Disponível em: <https://bteduc.com/livros/Biotecnologia_2012.pdf>. Acesso em 15 set. 2017.

MOURA, D. **Ensino médio e educação profissional: dualidade histórica e possibilidade de integração**. In: MOOL, Jaqueline (org.). *Educação profissional e tecnológica no Brasil contemporâneo: desafios, tensões e possibilidades*. Porto Alegre: Editora Artmed 1ªed., 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS. **Projeto Pedagógico do Curso Técnico em Biotecnologia, 2002**. 50p.

Ferramentas metodológicas *in vitro* para o estudo do câncer e seleção de novas substâncias antitumorais

Jisette González

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(jise.glez@gmail.com)

Helana Ortiz Garcia

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(helana.garcia@poa.ifrs.edu.br)

Jordânia dos Santos Pinheiro

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(jordaniaspineiro@gmail.com)

Gustavo Luiz Padilha

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(gustavoluizpadilha@yahoo.com.br)

Vitória Garcia La Porta

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(vitorialaporta@gmail.com)

Gabriel Fernandes Silveira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(gabriel.silveira@poa.ifrs.edu.br)

Miriam Anders Apel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

(miriam.apel@ufrgs.br)

Alessandra Nejar Bruno

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) -

Campus Porto Alegre

(alessandra.bruno@poa.ifrs.edu.br)

Resumo: O câncer é a doença que mais causa mortes no mundo, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública. O século XX se destacou por um avanço na pesquisa de produtos naturais, especialmente oriundos de plantas utilizadas na terapêutica antineoplásica. Estudos *in vitro* podem ser realizados em culturas celulares, possibilitando a caracterização dos mecanismos de ação, eficácia e seletividade de substâncias provenientes de espécies vegetais. Neste trabalho demonstramos alguns resultados obtidos através do tratamento de células de uma linhagem humana de câncer cervical (SiHa) com diferentes preparações oriundas de espécies vegetais nativas (óleos essenciais e extrato bruto aquoso), usando metodologias de fácil execução e economicamente viáveis. Tais metodologias visam a avaliação de parâmetros importantes para o crescimento e estabelecimento de células tumorais, tais como adesão celular, migração, recuperação da viabilidade após a retirada do tratamento e formação de colônias. Nossos resultados demonstraram que tais tratamentos reduziram de forma significativa os parâmetros mencionados, exemplificando a importância das ferramentas metodológicas aqui descritas para a triagem e desenvolvimento de novas terapias antitumorais.

Palavras-chave: Câncer; Ativos vegetais; Culturas celulares.

***In vitro* methodological tools for the study of cancer and selection of new anticancer molecules**

Abstract: Cancer is the most deadly disease in the world, and is currently one of the most important public health problems in the world. The XX century was highlighted by an advance in the research of natural products, especially from plants used in antineoplastic therapy. *In vitro* studies can be performed in cell cultures, enabling the characterization of mechanisms of action, efficacy and selectivity of substances from plant species. In this work we show some results obtained by the treatment of human cervical cancer cells (SiHa) with different preparations from native plant species (essential oils and crude aqueous extract) using easy to use and economically viable methodologies. Such methodologies intend to evaluate important parameters for the growth and establishment of tumor cells, such as cell adhesion, migration, recovery of viability after treatment withdrawal and formation of colonies. Our results demonstrated that such treatments significantly reduced the mentioned parameters, exemplifying the importance of the methodological tools described herein for the screening and development of new antitumor therapies.

Keywords: Cancer; Plant actives; Cell cultures.

INTRODUÇÃO

O câncer é a doença que mais causa mortes no mundo, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial. É responsável por mais de 7,6 milhões de óbitos por ano, o que representa 13% de todas as causas de morte do mundo (GUERRA e GALLO, 2005).

Esta enfermidade é caracterizada pelo crescimento desordenado e descontrolado de algumas células que se tornam não responsivas aos sinais de controle de proliferação, morte e diferenciação celular, devido, entre outros fatores, a mutações que levam a alterações na expressão ou função de genes-chave importantes para estes processos (ALMEIDA *et al.*, 2005). O câncer também é caracterizado pela destruição do tecido adjacente, bem como pelo crescimento em outros sítios diferentes do tumor primário (metástase) (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Apesar dos inúmeros avanços científicos demonstrados na última década, o tratamento do câncer ainda apresenta uma série de limitações. A intervenção cirúrgica, além de invasiva, muitas vezes não exclui a possibilidade de recorrência do tumor. Além disso, a quimioterapia e radioterapia afetam células tumorais e não tumorais, acarretando em uma vasta gama de efeitos adversos e indesejáveis.

Desta forma, nos últimos anos, há um interesse crescente no desenvolvimento de terapias complementares e novas alternativas às drogas atualmente disponíveis no mercado. Neste contexto, os produtos naturais, especialmente os de origem vegetal, representam as maiores fontes de substâncias ativas com potencial utilização na terapêutica, e, talvez, a fonte mais antiga de medicamentos já utilizada pelos seres humanos. Entre os medicamentos disponibilizados no mercado, 28% destes possuem princípios ativos isolados de produtos naturais ou semissintéticos, ao passo que 24% são sintéticos com grupos farmacofóricos baseados em estruturas de produtos naturais (CHIN *et al.*, 2006; NEWMAN e CRAGG, 2016). Diferentes estudos realizados tanto *in vitro*, quanto em fase pré-clínica e clínica, têm gerado informações úteis sobre a eficácia e segurança de plantas de emprego tradicional.

Moléculas de origem natural têm sido utilizadas como base para o desenvolvimento de moléculas protótipo, possibilitando o delineamento e o

planejamento racional de novos fármacos com novas ações terapêuticas. Podemos mencionar medicamentos conhecidos de origem vegetal, tais como a morfina e a codeína, obtidas de *Papaver somniferum* (BARREIRO, 1990); a digoxina, obtida de espécies de *Digitalis* (FOGLIO *et al.*, 2006); o paclitaxel, obtido de espécies de *Taxus* (WANI, *et al.*, 1971); bem como a vincristina e a vimblastina, obtidas de *Catharanthus roseus* (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Neste cenário, destacamos que o Brasil é o país com maior biodiversidade do mundo, contando com 20% do número total de espécies do planeta, sendo que muitas dessas espécies são endêmicas (KATO, 2001).

O isolamento, a identificação e os testes das propriedades biológicas de compostos de origem natural para o desenvolvimento de novos medicamentos têm contado com metodologias recentes e cada vez mais modernas e eficientes. Neste sentido, a busca por novos medicamentos com atividade antitumoral tem sido considerada cada vez mais relevante e é dependente de técnicas e métodos que permitam o desenvolvimento de tratamentos que sejam (a) mais efetivos e que impeçam o avanço da doença; (b) seletivos; (c) economicamente viáveis e, portanto, acessíveis; (d) de fácil administração e (e) com poucos ou insignificantes efeitos colaterais.

Tais estudos envolvem um esforço multidisciplinar dos pesquisadores de diferentes áreas e iniciam com a identificação e coleta das espécies vegetais a serem testadas; a preparação das amostras das substâncias vegetais; a identificação química das mesmas e procede-se com os estudos *in vitro*. Tais estudos se caracterizam pela utilização de culturas celulares, possibilitando a caracterização da atividade citotóxica e eficácia destas amostras, a sua seletividade e verificação do seu mecanismo de ação. Testes com culturas celulares são viáveis e reprodutíveis e, portanto, podem ser utilizados com sucesso para a realização destes ensaios. Além disto, muitas linhagens de células tumorais de diferentes tecidos estão disponíveis para a realização de distintos ensaios biológicos. Os estudos com células tumorais mediante algum tratamento devem avaliar a viabilidade e morfologia destas células, além de parâmetros relevantes para a sobrevivência, estabelecimento das mesmas em um determinado ambiente. Os principais parâmetros celulares a serem analisados envolvem: (a) a capacidade de proliferação; (b) adesão celular; (c) migração celular; (d) capacidade de formação de

novos vasos sanguíneos (angiogênese); (e) análise dos mecanismos de morte celular; (f) capacidade de formação de colônias; (g) capacidade de recuperação (resistência).

A migração de células tumorais também tem sido extensivamente estudada devido à sua importância no processo de metástase (YAMAGUCHI *et al.*, 2005). Metástases são facilitadas por interações célula-célula entre as células tumorais e as células do endotélio que contribuem para a adesão de células tumorais, seu extravasamento, e, portanto, no estabelecimento de lesões metastáticas (BENDAS e BORSIG, 2012).

Também é importante considerar que, no ambiente tumoral, algumas células mantêm a capacidade de proliferação e de formação de novos tumores mesmo mediante tratamento (FIEBIG *et al.*, 2004), sendo, por isso, importante a verificação da capacidade de recuperação das células tumorais após a retirada de um tratamento como um indicativo acerca da probabilidade de recorrência de um determinado tumor. As células tumorais também possuem a capacidade de se proliferar formando colônias (capacidade clonogênica). Assim, a capacidade clonogênica das células tumorais é um parâmetro importante sobre a malignidade dessas células e, portanto, o acompanhamento de tal característica é uma ferramenta potencial para a avaliação dos possíveis efeitos antitumorais dos tratamentos a serem testados.

Desta forma, neste artigo demonstraremos alguns resultados obtidos através de ferramentas metodológicas *in vitro* envolvendo culturas de células tumorais que sejam de simples execução, economicamente viáveis e que tragam informações relevantes para o desenvolvimento de novas estratégias antitumorais. Para tanto, foi utilizada a linhagem celular neoplásica escamosa proveniente de carcinoma de cérvix uterino humano, denominada SiHa. O câncer de colo de útero constitui o quarto tipo de câncer mais comum em mulheres e o sétimo na classificação geral (PARKIN e BRAY, 2006), possuindo alta morbimortalidade, o que justifica a realização de estudos acerca de possíveis terapias alternativas às atuais. As células serão tratadas com dois óleos essenciais e um extrato aquoso bruto de duas espécies vegetais do Rio Grande do Sul.

METODOLOGIA

Materiais

Gentamicina, fungizona (Anfotericina B) e soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos de Gibco BRL (Grand Island, NY). O meio de cultura Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), tripsina/EDTA, o corante Azul de Tripán e o sal MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) foram adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Todos os demais reagentes e solventes utilizados foram de alto grau de pureza.

Linhagens celulares

A linhagem de origem neoplásica escamosa da cérvix uterina humana (SiHa) foi obtida da “American Type Culture Collection” (ATCC, USA). As células foram mantidas em meio de cultura Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%, e mantidas em estufa de CO₂ a 5% e 37°C.

Tratamentos

As células tumorais acima mencionadas foram plaqueadas para cada ensaio (como será descrito abaixo) e tratadas com um dos tratamentos a seguir: extrato bruto aquoso (EBA) e um óleo essencial (OE 1) de uma espécie vegetal da família *Myrtaceae* e dois óleos essenciais (OE 2 e OE 3) de uma espécie vegetal da família *Asteraceae*. Tais espécies vegetais não foram especificadas aqui por motivos de intenção de depósito de patente. Para utilização dos óleos essenciais, estes foram solubilizados no veículo propilenoglicol, sendo o OE 1 solubilizado na proporção de 1:10 e o OE 2 e OE 3 na proporção de 1:5. Em todos os ensaios foi utilizada a concentração inibitória média (IC 50) dos tratamentos, sendo de 7,1 mg/mL para o EBA, 2,1 µg/mL para o OE 1 e 72 ng/mL e 83 ng/mL para o OE 2 e OE 3, respectivamente. Poços controles (apenas meio de cultura DMEM) e poços controle veículo (meio de cultura DMEM e propilenoglicol na concentração correspondente) foram realizados em todos os experimentos.

Ensaio de adesão celular

Ensaio que permitam a análise do processo de adesão celular são de grande importância para a verificação do comportamento patológico de células tumorais, já que estas células diferem de células normais pela sua habilidade em alterar o comportamento, organização e distribuição de moléculas de adesão celular visando o favorecimento de processos como migração e invasão celular (ROSSETTI *et al.*, 2015).

Para verificar o efeito do tratamento com o óleo essencial (OE 3) sobre a capacidade de adesão celular, o mesmo foi adicionado na concentração de IC50 juntamente com o plaqueamento na densidade de 1×10^4 células por poço da linhagem tumoral SiHa. Posteriormente, a placa foi incubada em estufa de CO₂ a 5% e 37 °C por 4 horas. A seguir, o sobrenadante dos poços foi coletado, em duplicata, e a placa lavada duas vezes com tampão fosfato (PBS) à temperatura ambiente (TA), sempre transferindo a solução tampão para o respectivo tubo. Após, o conteúdo da coleta de todos os poços foi centrifugado a 1.200 rpm por 5 minutos e em seguida o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de células foi ressuscitado juntamente com o corante de exclusão Azul de Tripán e as células viáveis foram contadas em hemocítômetro.

Concomitantemente, foi realizado o ensaio de viabilidade celular com cristal violeta que, por sua vez, avalia as células viáveis que estão aderidas nos poços. Após coleta do sobrenadante, as células aderidas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos e a seguir, coradas com cristal violeta 0,5% (solubilizado em metanol) por 10 minutos. Para retirada do excesso de cristal, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x. Por último, o corante foi eluído em ácido acético 30% e quantificado em leitor de placa a 570 nm.

Ensaio de migração celular

O processo de migração celular está diretamente ligado à formação de metástase pelas células tumorais *in vivo*. A capacidade de migração celular pode ser avaliada através do ensaio de *Wound Healing* como descrito por Rodriguez *et al.* (2005) e baseia-se na observação de que, após a criação de uma 'ferida' sobre uma monocamada de células confluentes, as células sobre a borda desta ferida irão se

mover na direção da abertura até que novos contatos célula-célula sejam estabelecidos novamente (LIANG *et al.*, 2007).

Para a realização deste ensaio, células SiHa foram plaqueadas (3×10^4 células/ poço) em placa de 24 poços e incubadas em estufa de CO₂ até a formação de uma monocamada celular. Posteriormente, o meio de cultura foi retirado e foi realizada uma ruptura na monocamada com ponteira estéril, em cada poço. A seguir, as células foram lavadas com PBS e cada poço fotografado. O tratamento com EBA na concentração de IC50 foi, então, adicionado aos poços na concentração adequada e a placa incubada durante 24 horas. Após esse período, o tratamento foi retirado e as células foram lavadas com PBS e fotografadas novamente. Para quantificação foi utilizado o *software* ImageJ para a determinação da largura da ruptura na monocamada antes e depois do tratamento através do registro fotográfico.

Ensaio de avaliação da capacidade de formação de colônias

A capacidade de formação de colônias após tratamento de uma população tumoral está associada com a recorrência de um determinado tumor, e possivelmente com a resistência destas células ao tratamento utilizado. Dessa forma, o estudo deste parâmetro celular se torna tão importante e pode ser avaliado pelo chamado ensaio Clonogênico, o qual permite, de uma forma prática, detectar células que tenham mantido a capacidade de produzir unidades formadoras de colônia após a exposição a tratamentos específicos (BROWN e ATTARDI, 2005).

Para este ensaio as células foram plaqueadas na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/poço em placa de 24 poços. Após adesão das mesmas, realizou-se o tratamento com OE 1 na concentração de IC50 por 24 horas. Posteriormente, o tratamento foi retirado dos poços, as células foram lavadas com PBS 1x, tripsinizadas e contadas em hemocítômetro para replaqueamento em placa de 24 poços (300 células por poço) e incubadas por 7 dias em estufa de CO₂. Após esse tempo, foi realizada a marcação das colônias para contagem. Primeiramente as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos. Em seguida, o paraformaldeído foi descartado e cristal violeta 0,5% (solubilizado em metanol) foi adicionado à placa por 10 minutos. Para retirada do excesso de cristal violeta, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x. Para

quantificação do resultado, os poços foram fotografados, as colônias contadas e o resultado expresso como fração de sobrevivência (SF), obtida da seguinte forma: SF = número de colônias formadas × PE (*Plating efficiency*) / número de células semeadas. Onde PE = (número de colônias formadas/ Número de células semeadas) × 100% (FRANKEN *et al.*, 2006).

Ensaio de avaliação da capacidade de recuperação da viabilidade celular

A capacidade de recuperação da viabilidade celular após a retirada do tratamento foi avaliada através do ensaio *Washout*. Considerando que algumas das células de tecido tumoral possuem a capacidade de proliferar e formar novos tumores, a investigação da capacidade de recuperação da viabilidade celular após a retirada do tratamento é um importante indicativo da efetividade das estratégias terapêuticas estudadas. Para a realização deste ensaio, células SiHa foram plaqueadas na densidade de $2,8 \times 10^4$ por poço em uma placa de 24 poços e, após adesão, foram tratadas com OE 2 na concentração de IC50 por 24 horas. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS para retirada efetiva do tratamento, tripsinizadas, contadas e replaqueadas em placa de 96 poços na densidade de 2.800 células por poço. Após 4 dias o ensaio de MTT é realizado para análise da viabilidade celular. Neste ensaio o sal MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) é metabolizado no interior de mitocôndrias de células viáveis onde é reduzido até o produto formazan. MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado à placa durante 3,5 horas e os cristais formados solubilizados em DMSO para quantificação em leitor de placa a 545 e 630 nm. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle.

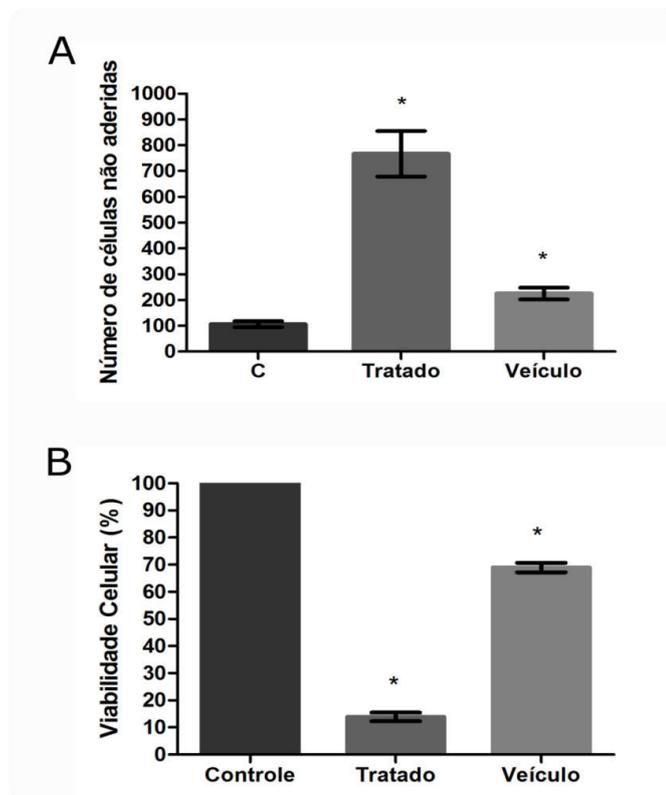
RESULTADOS

Efeito do tratamento sobre a capacidade de adesão das células tumorais

A capacidade de adesão de uma célula tumoral é essencial e determinante para sua sobrevivência e estabelecimento num ambiente. O óleo essencial aqui testado aumentou o número de células viáveis e não aderidas da linhagem SiHa em 719,1% em relação às células controle (Figura 1A). Além disso, o método de

viabilidade celular por cristal violeta, mostrou que apenas 13,87 % das células estavam aderidas após 4 horas de tratamento com OE 3 (Figura 1B).

Figura 1 - Óleo essencial da família Asteraceae diminui a capacidade de adesão das células tumorais. (A) Análise do número de células viáveis e não aderidas no sobrenadante após 4 horas de tratamento com OE 3 na concentração de IC50 de 82 ng/mL. (B) Quantificação das células aderidas, após tratamento, através de marcação com cristal violeta. Os dados mostram a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes realizado em duplicata. * P <0.05: estatisticamente significativo em relação ao controle (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey).

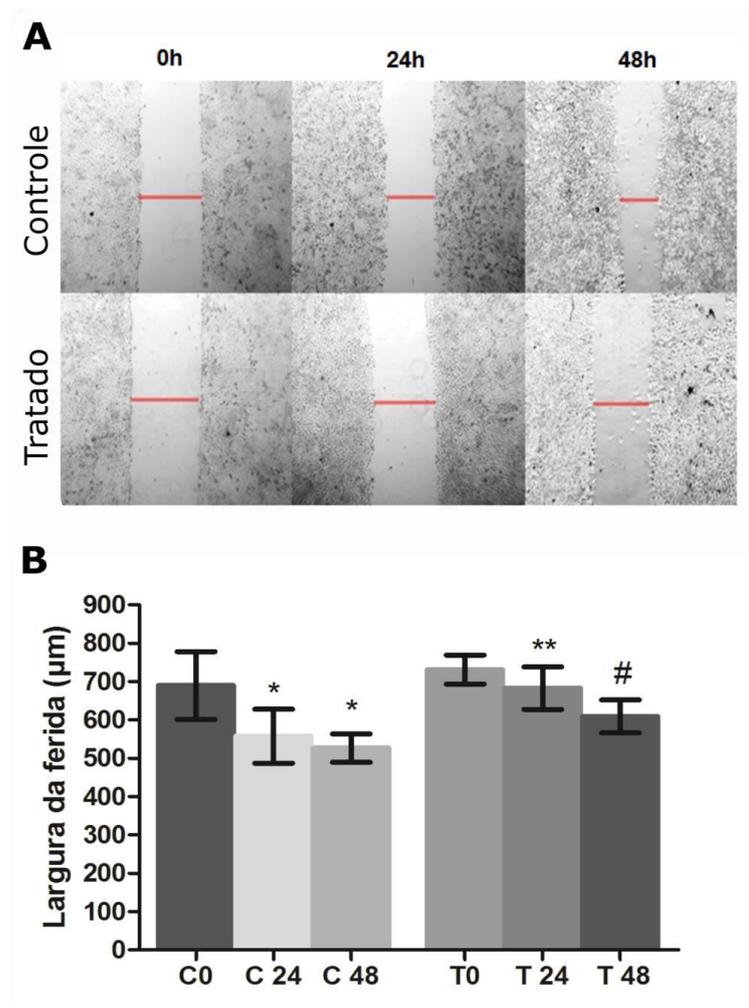


Efeito do tratamento sobre a capacidade de migração das células tumorais

O ensaio *Wound Healing* se baseia na capacidade das células de migrarem após a criação de uma separação física visando a necessidade de estabelecimento de novos contatos célula-célula. Neste experimento, foi realizada uma ferida na monocamada de células SiHa controle e tratadas com EBA por 24 e 48 horas utilizando a concentração de IC50 de cada tratamento. A largura da ferida foi monitorada antes, durante e após o tratamento.

Na Figura 2A podemos observar o registro fotográfico da ferida na monocamada durante o experimento, sendo evidente a diminuição na largura da ferida das células controle e uma maior manutenção da largura inicial nas células tratadas com EBA. Estes dados demonstraram uma diminuição significativa na migração das células tumorais em 63,4% após 24 horas e 24,5% após 48 horas em relação às células controle (Figura 2 B).

Figura 2 - Extrato bruto aquoso (EBA) da família *Myrtaceae* altera a capacidade de migração das células tumorais. (A) Figuras representativas e (B) medidas da largura da ferida da linhagem SiHa após 24 e 48 horas de tratamento com EBA na concentração de IC50 (7,8 mg/mL). Os dados mostram a média e o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. * P <0.05: estatisticamente significativo em relação ao controle antes do tratamento (C0), ** P <0.05: estatisticamente significativo em relação ao controle depois de 24 horas (C24), # P <0.05: estatisticamente significativo em relação ao controle do tratamento (CT) (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey).

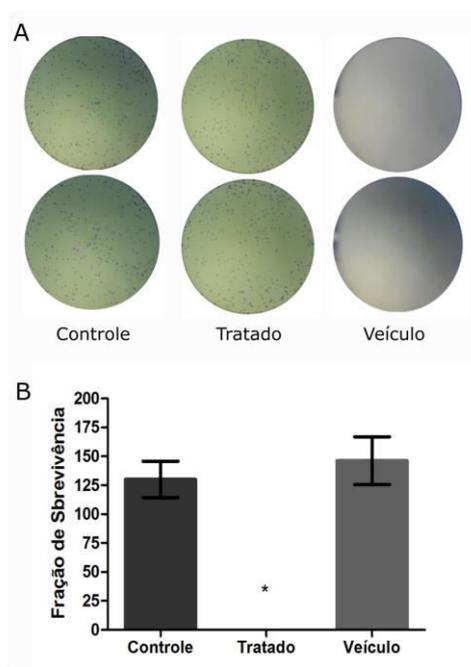


Efeito do tratamento sobre a capacidade de formação de colônias das células tumorais

Outro parâmetro importante para a sobrevivência de uma célula tumoral é a capacidade de formação de novas colônias de células. Neste ensaio as células submetidas ao tratamento na concentração de IC50 com o OE 1 por 24 horas, foram posteriormente replaqueadas em baixa densidade e incubadas em condições padrão durante 7 dias.

Foi possível observar que o tratamento com OE 1 foi capaz de inibir de forma significativa a capacidade de formação de colônias das células tumorais submetidas ao tratamento. Enquanto isso, as células controle e controle veículo apresentaram um SF de 130 e 146,2 respectivamente, demonstrando que o veículo utilizado não foi capaz de interferir na capacidade de formação de colônia da mesma forma que o tratamento (Figura 3).

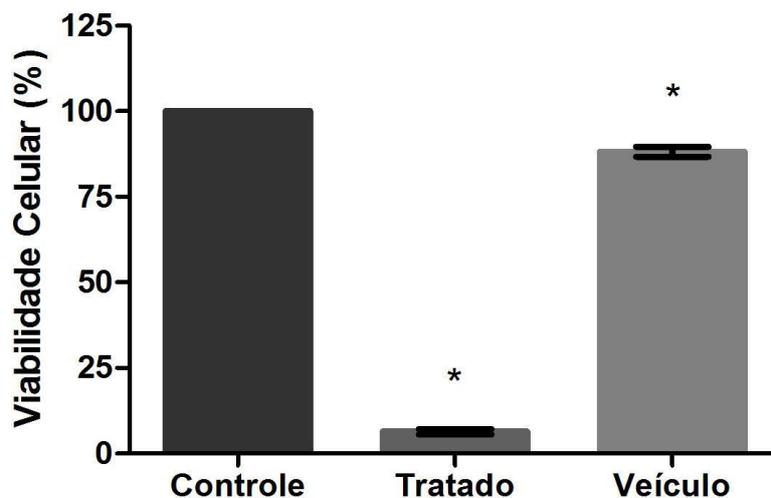
Figura 3 - Óleo essencial da família *Myrtaceae* inibe a capacidade de formação de colônias das células tumorais. (A) Figuras representativas e (B) quantificação dos efeitos do OE 1 na concentração de IC50 (2,1 ug/mL) sobre a capacidade clonogênica das células tumorais após 24 horas de tratamento. Os dados mostram a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes realizado em duplicata. * P <0.05: estatisticamente significativo em relação ao controle. (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey).



Efeito do tratamento sobre a capacidade de recuperação da viabilidade das células tumorais

A capacidade de recuperação da viabilidade das células tumorais após retirada do tratamento pode dar um indicativo acerca da probabilidade de recorrência de um determinado tumor. Assim, após a retirada do OE 2 na concentração de IC50, os dados demonstraram que apenas 6,36% das células recuperaram sua viabilidade em relação às células controle (Figura 4).

Figura 4 - Óleo essencial da família *Asteraceae* diminui a capacidade de recuperação da viabilidade das células tumorais após retirada do tratamento. Análise da viabilidade celular por MTT após realização do ensaio *Washout* com a concentração de IC50 (72 ng/mL) do OE 2 por 24 horas de tratamento. Os dados mostram a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicata. * P <0.05: estatisticamente significativo em relação ao controle. (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey).



DISCUSSÃO

Atualmente, o potencial extraordinário para a descoberta de novos fármacos antitumorais provenientes de fontes naturais tem sido reconhecido em função da existência de um grande número de espécies disponíveis para investigação. Até o momento, estima-se que menos de 2% dos vegetais superiores foram analisadas para detecção de constituintes com atividade antineoplásica (NEWMAN *et al.*, 2000).

A oncologia experimental procura estudar os mecanismos de desenvolvimento das neoplasias em modelos experimentais, assim como encontrar as possíveis formas de tratá-las. As estratégias para a descoberta de novos fármacos têm mudado ao longo dos anos. Atualmente, os programas de prospecção incluem uma etapa inicial de testes *in vitro* em linhagens tumorais humanas e para isso, um conjunto de ferramentas metodológicas, protocolos e experimentos específicos têm se mostrado indispensáveis para a determinação do potencial real de algum tratamento antineoplásico. Desta forma, este artigo descreve alguns resultados obtidos em nosso laboratório através de metodologias viáveis, confiáveis e de fácil execução para a análise de novos alvos terapêuticos potencialmente antitumorais. Os ensaios aqui descritos são de grande relevância para a análise de parâmetros-chave relacionados aos processos de proliferação, expansão e viabilidade de células tumorais submetidas a um determinado tratamento.

Como exemplo, podemos mencionar ensaios que permitem a análise do processo de adesão celular, já que se sabe que as células tumorais diferem de células normais pela sua habilidade em alterar o comportamento, organização e distribuição de moléculas de adesão celular, tais como selectinas, superfamília de imunoglobulinas, caderinas e integrinas. A alteração da expressão de proteínas de adesão pode também alterar processos como proliferação, invasão e metástase (ROSSETTI *et al.*, 2015). Assim, a análise da expressão destas proteínas é importante para determinar o potencial antineoplásico de alguma droga em teste. Entretanto, para tais análises é indispensável a utilização de anticorpos específicos que são de alto custo e necessitam de equipamentos adequados que nem sempre estão disponíveis em todos os laboratórios de pesquisa. Por este motivo, nós descrevemos aqui um ensaio capaz de trazer informações sobre o processo de adesão celular e por sua vez, determinar o comportamento de células tumorais em relação a este parâmetro durante um tratamento em estudo. Como podemos observar na Figura 1A, o processo de adesão das células tumorais foi reduzido de forma significativa após o tratamento com o OE 3. O ensaio com cristal violeta (Figura 1B), capaz de avaliar a viabilidade das células aderidas ao poço, corroborou o resultado demonstrado na Figura 1A, já que também demonstrou uma inibição significativa do processo de adesão induzido pelos tratamentos estudados. Desta forma, a capacidade de adesão celular pode ser estudada através destas técnicas

de forma eficiente e com baixo custo. O estudo deste parâmetro é de grande importância para a análise da capacidade de sobrevivência de células tumorais após a aplicação de um determinado tratamento, já que uma célula com comprometimento no processo de adesão é incapaz de se estabelecer em um determinado ambiente. Este dado é evidentemente importante no ambiente de um tumor sólido, como é o caso do câncer de colo de útero, onde o processo de adesão é capaz de assegurar a expansão e o crescimento deste tumor.

Considerando a contribuição dos processos de adesão e migração em metástases tumorais, também foi avaliada a capacidade de migração das células de linhagem tumoral após tratamento. O ensaio *Wound Healing*, proposto por Rodriguez *et al.* (2005), configura uma alternativa simples e economicamente viável para a avaliação deste importante parâmetro. Como demonstrado na Figura 2, o tratamento promoveu uma redução significativa na motilidade das células tumorais em relação ao controle. Estes resultados são de grande relevância, visto que a capacidade de migração das células tumorais está intimamente relacionada com a capacidade invasão destas células, e conseqüentemente, exibe um papel chave no processo metastático. A capacidade de migração celular também pode ser avaliada através do ensaio de Câmara de Boyden. Este ensaio consiste na aplicação de suspensões de células tratadas sobre uma membrana semipermeável e posterior quantificação daquelas capazes de atravessar a membrana até um compartimento inferior. Além de possuir custo mais elevado, esta técnica não permite o estudo da regulação do processo migratório por interações célula-célula e célula-matriz extracelular (LIANG *et al.*, 2007).

Outro parâmetro importante a ser considerado diz respeito ao fato de que após um tratamento com radioterapia ou quimioterapia, uma população celular sobrevivente pode recuperar a sua capacidade proliferativa e retomar o crescimento da massa tumoral. Esse grupo de células é predominantemente formado por células-tronco tumorais, que se caracterizam por sua capacidade de divisão ilimitada e por este motivo, constituem o alvo primário das terapias contra o câncer (FIEBIG *et al.*, 2004). A capacidade de formação de colônias, ou capacidade clonogênica, está estritamente associada com a recorrência de tumores na clínica, e por este motivo, o estudo deste parâmetro é de suma importância em ensaios *in vitro*. Como evidenciado na Figura 3A e B o tratamento com o óleo essencial da espécie da

família Myrtaceae foi capaz de induzir uma diminuição expressiva da capacidade de formação de colônias das células tumorais.

O ensaio *Washout* é também uma ferramenta importante na determinação da capacidade de recuperação celular após a retirada de um determinado tratamento, podendo demonstrar a presença de uma modulação crônica e prolongada do tratamento em teste. Este parâmetro está relacionado com a capacidade de recidiva de um determinado tumor após a suspensão ou redução da dose de um determinado tratamento. Na Figura 4 podemos observar que o tratamento foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade das células tumorais após a retirada do mesmo. Isso torna a estratégia terapêutica promissora no sentido de reduzir a probabilidade de recorrência do tumor em estudo.

Além dos ensaios aqui descritos, é possível lançar mão de outras ferramentas metodológicas para a avaliação do potencial antineoplásico de biocompostos, aqui não explicitadas por limitação de espaço, mas já padronizadas por nosso grupo de pesquisa. Essas ferramentas podem também fornecer informações relevantes acerca da influência de determinado tratamento em outros parâmetros, como a análise do mecanismo de morte celular induzido por um composto bioativo. Uma técnica amplamente utilizada visa a marcação das células tratadas com a proteína anexina V conjugada a um fluorocromo e posterior quantificação por citometria de fluxo. Esta técnica baseia-se na exposição do fosfolípido fosfatidilserina na superfície da membrana plasmática de células em processo de apoptose (FADOK *et al.*, 1998). A anexina V, por possuir alta afinidade por fosfatidilserina, adere-se à superfície das células em processo de apoptose inicial, antes do surgimento das características morfológicas inerentes a este processo. Para otimização da técnica, é comum a marcação concomitante com iodeto de propídio, um marcador fluorescente nuclear capaz de penetrar apenas em células com alteração na permeabilidade de membrana, como é o caso de células necróticas. Dessa forma, é possível distinguir as células viáveis, em apoptose inicial e em apoptose tardia ou necrose (HINGORANI *et al.*, 2011).

Para a análise do mecanismo de morte celular, também é possível utilizar outras metodologias que não requerem o uso de equipamentos sofisticados como o citômetro de fluxo, sendo, portanto, mais viáveis economicamente. Uma delas é a análise da morfologia nuclear através de corantes fluorescentes, como o corante

fluorescente Hoechst® 33258, onde, após o tratamento, as células são coradas e analisadas em microscópio de fluorescência para a verificação da condensação da cromatina, como indicativo de uma possível morte celular via apoptose (ONOZAWA *et al.*, 1998).

CONCLUSÃO

As metodologias aqui descritas possibilitaram a obtenção de resultados capazes de confirmar o potencial antineoplásico dos tratamentos testados através de técnicas simples, economicamente viáveis e de fácil execução. Estes resultados podem ser considerados promissores e enfatizam a importância de estudos adicionais envolvendo ativos vegetais como novas alternativas antineoplásicas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V. L. D.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A. **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução.** *Quim. Nova*, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- BARREIRO, E. J. **Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos.** *Quim. Nova*, v. 13, n. 1, p. 29–39, 1990.
- BENDAS, G.; BORSIG, L. **Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins.** *International Journal of Cell Biology*, v. 2012, n. 1, 2012.
- BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. **Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas.** *Quim. Nova*, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.
- BROWN, J.M.; ATTARDI, L.D. **The role of apoptosis in cancer development and treatment response.** *Nat. Rev. Cancer*, n. 5, p. 231–237, 2005.
- CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. **Drug discovery from natural sources.** *The AAPS J.* v. 8, n. 2, p. E239– 53, 2006.
- FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; FRASCH, S. C.; WARNER, M. L.; HENSON, P. M. **The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes.** *Cell Death and Differentiation*, v. 5, n. 7, p. 551–562, 1998.

FRANKEN, N.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. **Clonogenic assay of cells in vitro**. *Nature Protocols*, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

FIEBIG, H. H.; MAIER, A.; BURGER, A. M. **Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery**. *European Journal of Cancer*, v. 40, n. 6, p. 802–820, 2004.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, M. I. O.; RODRIGUES, R. A. F. **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar**. *Multiciências*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2006.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M. **Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes**. *Rev Bras Cancer*, v. 51, n. 3, p. 227–234, 2005.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The hallmarks of cancer**. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HINGORANI, R.; DENG, J.; ELIA, J.; MCINTYRE, C.; Mittar, D. **Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerser™ System**. San Jose: BD Biosciences, 2011, 12p.

KATO, M. J. **Global phytochemistry: the Brazilian approach**. *Phytochemistry*, v. 57, n. 5, p. 621–3, 2001.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. **In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro**. *Nature Protocols*, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014**. *J. Nat. Prod*, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M. **The influence of natural products upon drug discovery**. *Nat Prod Rep.*, v. 17, p. 215–234, 2000.

ONOZAWA, M.; FUKUDA, K.; OHTANI, M.; AKAZA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. **Effects of Soybean Isoflavones on Cell Growth and Apoptosis of the Human Prostatic Cancer Cell Line LNCaP**. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, v. 28, n. 6, p. 360–363, 1998.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. **Chapter 2: The burden of HPV-related cancers**. *Vaccine*, v. 24, n. 3, 2006.

RODRIGUEZ, L.G.; WU, X.; GUAN, J.L. **Wound-healing assay**. *Methods in Molecular Biology*, v. 294, p. 23–29, 2005.

ROSSETTI, C.; REIS, B.; DELGADO, P. O.; AZZALIS, L. A.; JUNQUEIRA, V. B. C.; FEDER, D.; FONSECA, F. **Adhesion molecules in breast carcinoma: a challenge to the pathologist.** *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 61, n. 1, 2015.

WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A. T. **Plant Antitumor Agents.VI.The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 93, n. 9, p. 2325–2327, 1971.

YAMAGUCHI, H; WYCKOFF, J; CONDEELIS, J. **Cell migration in tumors.** *Current Opinion in Cell Biology*, v. 17, n. 5, p. 559–64, 2005.

O efeito de plantas nativas sobre o câncer cervical

Gustavo Luiz Padilha

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(gustavoluizpadilha@yahoo.com.br)

Vitória Garcia La Porta

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(vitorialaporta@gmail.com)

Jisette González

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(jise.glez@gmail.com)

Jordânia dos Santos Pinheiro

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(jordaniaspineiro@gmail.com)

Gabriel Fernandes Silveira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(gabriel.silveira@poa.ifrs.edu.br)

Helana Ortiz Garcia

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(helana.garcia@poa.ifrs.edu.br)

Bianca Pfaffenseller

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

(bianca.pfaffenseller@gmail.com)

Miriam Anders Apel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

(miriam.apel@ufrgs.br)

Alessandra Nejar Bruno

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)

Campus Porto Alegre

(alessandra.bruno@poa.ifrs.edu.br)

Resumo: O potencial de espécies vegetais para a descoberta de novos fármacos antitumorais tem sido reconhecido devido ao uso delas na medicina popular. O câncer cervical possui alta incidência e morbidade, entretanto, os tratamentos convencionais apresentam uma série de limitações. Neste estudo, nós investigamos o efeito do extrato bruto aquoso obtido de folhas de uma espécie da família *Myrtaceae* (EBA), um óleo essencial das folhas desta mesma espécie (OE1) e óleo essencial extraído de flores de uma espécie da família *Asteraceae* (OE2) em células de uma linhagem humana de câncer cervical (SiHa) e em uma linhagem não tumoral de queratinócitos humanos (HaCaT). As células foram mantidas em condições padrão e tratadas por 24h com diferentes concentrações dos tratamentos e então submetidas ao ensaio de MTT (0,5 mg/ml). Os três tratamentos utilizados nas diferentes concentrações induziram inibição significativa na viabilidade das células tumorais a partir de concentrações baixas, entretanto, o IC50 de um tratamento que induziu um efeito pronunciado nas células tumorais, não causou tamanha inibição na viabilidade da linhagem não tumoral. O potencial terapêutico dos tratamentos utilizados enfatiza a importância de investimentos na continuidade destes estudos e projetos relacionados à investigação de espécies vegetais como aliados no combate ao câncer.

Palavras-chave: Plantas nativas; Câncer cervical; Viabilidade celular.

The effect of native plants on cervical cancer

Abstract: The potential of plant species for the discovery of new antitumor drugs has been recognized due to their use in folk medicine. Cervical cancer has high incidence and morbidity; however, conventional treatments have a number of limitations. In this study, we investigated the effect of the crude aqueous extract obtained from leaves of a species of the family *Myrtaceae* (EBA), an essential oil of leaves of this species (OE1) and essential oil from flowers of a species of the family *Asteraceae* (OE2) on human cervical cancer cells (SiHa line) and on a non-tumor human keratinocyte line (HaCaT). Cells were maintained under standard conditions and treated for 24 hours at different concentrations of the treatments and then submitted to the MTT assay (0.5 mg/mL). The three treatments used induced significant inhibition in the viability of tumor cells from low concentrations, however, the IC50 of a treatment that induced a pronounced effect on tumor cells did not cause such

inhibition in the viability of the non-tumor line. The therapeutic potential of the treatments used emphasizes the importance of investments for continuity of these studies and for other projects related to the investigation of plant species as allies in the fight against cancer.

Keywords: Native plants; Cervical cancer; Cell viability.

INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundial, constituindo a segunda causa de morte por enfermidades no Brasil. Nas últimas décadas, o número de novos casos no registro brasileiro de câncer tem crescido, ressaltando a importância da doença e seu impacto social e econômico (INCA, 2018). Era estimado para 2018, o surgimento de 18,1 milhões de novos casos de câncer (BRAY *et al.*, 2018), além de representar 13% de todas as causas de morte do mundo (GUERRA e GALLO, 2005).

Câncer é definido como um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento anormal, progressivo e desordenado de células (ALMEIDA *et al.*, 2005). Alterações nos processos normais de crescimento, proliferação e morte celular estão associadas à mutações que ocorrem preferencialmente em genes supressores de tumores e/ou de protooncogenes. Diferentes tipos de câncer também têm sido associados com alterações em genes associados ao reparo de DNA (TENEN, 2003).

Nosso grupo de pesquisa vem realizando ensaios biológicos utilizando culturas de células de tumores femininos, com foco, principalmente, no câncer de colo uterino humano. O câncer cervical permanece como uma doença de alta prevalência, incidência e mortalidade, sendo o quarto tipo de câncer mais comum em mulheres, e o sétimo na classificação geral (PARKIN e BRAY, 2006). Em países em desenvolvimento, esta patologia tem mantido altos níveis de incidência, sendo o terceiro tipo de câncer com maior estimativa de novos casos entre as mulheres no Brasil (INCA, 2018). Sabe-se que a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) associada a outros fatores de risco como o histórico de outras doenças sexualmente transmissíveis, tabagismo e uso de contraceptivo oral, representam um importante papel na progressão das lesões escamosas intra-epiteliais para a malignidade em mulheres (WALBOOMERS *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2000). Infelizmente alguns estudos revelaram recorrência de câncer de colo uterino após histerectomia radical em cerca de 20% dos pacientes (YUAN *et al.*, 1999), bem como uma alta taxa de

recorrência para o câncer cervical invasivo mesmo após o tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical (SOUTTER *et al.*, 2006). Além disso, tratamentos convencionais como a quimioterapia e a radioterapia, não atuam exclusivamente sobre as células tumorais. Esta toxicidade indiscriminada é a causa dos inúmeros efeitos adversos observados e a consequente influência na qualidade de vida dos pacientes.

Por estas razões, muitos estudos baseados em princípios ativos de plantas têm investigado a atividade antiproliferativa ou citotóxica em células tumorais visando a geração de novos agentes antineoplásicos. Neste contexto é importante destacar a biodiversidade brasileira como uma fonte extraordinária de espécies vegetais com diferentes moléculas ativas que possuem potenciais efeitos biológicos e terapêuticos para doenças como o câncer.

Substâncias orgânicas originadas de fontes naturais há muito tempo são utilizadas no tratamento de inúmeras doenças na chamada medicina popular. Grande parte destas substâncias, quando levadas ao laboratório, demonstraram propriedades químicas e biológicas promissoras e de grande interesse biotecnológico. A análise da origem dos fármacos encontrados no mercado revela a importância do desenvolvimento de novos medicamentos baseados em ativos vegetais, já que mais da metade dos novos medicamentos lançados a partir de 1981 são derivados de produtos naturais (CHIN *et al.*, 2006; NEWMAN e CRAGG, 2016).

Alguns exemplos de medicamentos de origem vegetal e com atividade anti-tumoral são a Vimblastina e a vincristina, isolados das folhas da espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (*Apocynaceae*), popularmente conhecida como vinca. Estas espécies vegetais eram originalmente utilizadas no tratamento de diabetes e posteriormente foram descritos com atividade antimitótica e aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como agentes anticancerígenos (NEWMAN *et al.*, 2000). Os quimioterápicos etoposídeo e o teniposídeo foram obtidos a partir das espécies *P. peltatum* e *P. emodii*, tradicionalmente utilizadas pelas populações nativas da América e da Ásia no tratamento do câncer de pele e verrugas (BRANDÃO *et al.*, 2010). Outros exemplos importantes incluem o paclitaxel (Taxol®), um diterpeno da família dos taxanos extraído a partir de extratos de casca da árvore de *Taxus brevifolia* Nutt. (*Taxaceae*) (ALTMANN e GERTSCH., 2007), bem como o irinotecan e o topotecano, obtidos a partir de uma árvore ornamental

chinesa conhecida como *Camptotheca acuminata Decne (Cornaceae)* (BRANDÃO *et al.*, 2010).

O nosso grupo de pesquisa tem demonstrado os efeitos significativos de diferentes preparações oriundas de plantas nativas sobre a viabilidade de células tumorais, bem como sua atividade em outros parâmetros biológicos importantes para a sobrevivência, crescimento e invasão das mesmas. Uma das espécies testadas é representante da família *Asteraceae*. Esta é a maior família de angiospermas, compreendendo 25.000 espécies pertencentes a 1.600 gêneros (BREMER, 1994). No Brasil, a família está representada por aproximadamente 196 gêneros e cerca de 1.900 espécies (BARROSO *et al.*, 1991). Membros desta família são amplamente utilizadas na medicina popular e estudadas devido a sua atividade biológica e composição química, com destaque a abundância de flavonóides e cientificamente descritas com atividades antibacteriana, antifúngica, larvicida, inseticida, antiparasitária, nematicida, anti-hiperglicêmica e antioxidante (ANDREOTTI *et al.*, 2013; ROMAGNOLI *et al.*, 2005; SCHIAVON *et al.*, 2015). A exemplo das propriedades dessa família, é reconhecido a *Helianthus annuus* L no efeito contra a Epilepsia; como calmante tem-se *Matricaria recutita* L; no combate a tosse e queilite angular é indicado a espécie *Sonchus oleraceus* L (SILVA e ANDRADE, 2013). Além disso, possuem alta disponibilidade já que apresentam alta taxa de germinação e produzem flores e sementes o ano inteiro (BARROSO *et al.*, 1991). Representantes desta família são conhecidamente produtoras de óleos essenciais com importância comercial já descrita (ANDREOTTI *et al.*, 2013). Óleos essenciais são compostos de baixo peso molecular oriundos do metabolismo secundário de plantas e de composição química caracterizada por atividades farmacológicas de grande interesse biotecnológico (ADAMS, 2009).

Outra família amplamente estudada em nosso laboratório, abrange membros pertencentes à família *Myrtaceae*. As mirtáceas destacam-se por suas propriedades medicinais, já que seus extratos apresentam efetivos antihipertensivos (*Eugenia uniflora*), hipoglicemiantes (*Eugenia jambola*), anti-bacteriana (*Calyptanthes lucida*), antifúngicos (*Pimenta dioica*), antioxidantes (*Eugenia involucrata*) e anti inflamatório (*Psidium cattleianum*), (CONSOLINI e SARUBBIO, 2002; LIMA *et al.*, 2002; BRUNETTI *et al.*, 2006; STEFANELLO *et al.*, 2011). Devido a estas propriedades,

membros desta família são conhecidos por seu potencial para a obtenção de fármacos (SILVA, 2006).

Considerando a importância de estudos que envolvam produtos naturais, a riqueza de substâncias ativas presentes em plantas nativas e o potencial destas substâncias como potenciais agentes antineoplásicos, este artigo descreve alguns resultados de nossa pesquisa, demonstrando a influência do tratamento com algumas preparações oriundas de espécies vegetais nativas sobre a viabilidade de células humanas de câncer de colo de útero. As espécies estudadas neste artigo não serão declaradas devido à intenção de patente.

METODOLOGIA

Linhagens celulares: As linhagens de origem neoplásica escamosa da cérvix uterina humana (SiHa) e a linhagem não tumoral imortalizada de queratinócitos humanos (Hacat) foram obtidas da “American Type Culture Collection” (ATCC, USA). As culturas foram mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com soro fetal bovino 10% e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂.

Extrato bruto aquoso: A coleta das folhas de uma espécie da família *Myrtaceae* foi realizada em abril de 2017, no Município de Porto Alegre-RS. As folhas foram lavadas e secas em estufa a 60°C por 4 dias. Posteriormente, estas foram trituradas e o pó obtido foi dissolvido em meio de cultura DMEM (não suplementado). A solução obtida (EBA) foi filtrada em membrana com poros de 0,22 µm.

Óleos essenciais: Após identificação taxonômica, folhas de uma espécie de *Myrtaceae* (OE1) e flores de uma espécie vegetal da família *Asteraceae* (OE2) foram coletadas em áreas de ocorrência natural no Rio Grande do Sul e submetidas ao processo de hidrodestilação, separadamente, em aparelho do tipo *Clevenger* durante 3 horas. A identificação química dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS) equipado com DB-5 ligado a uma coluna capilar de sílica (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm), sendo os componentes do óleo identificados por comparação entre seu índice de retenção e seus espectros de massa. Os dados de referência foram obtidos a partir da literatura

e base de dados NIST 62. Para a realização dos ensaios com as culturas celulares, preparou-se uma solução mãe pela solubilização dos óleos no veículo propilenoglicol em diferentes proporções - 1:5 para a espécie da família *Asteraceae* (OE2) e 1:10 para a espécie da família *Myrtaceae* (OE1).

Tratamentos: Para utilização dos óleos essenciais, é necessário a solubilização dos mesmos em veículos, levando em conta a análise qualitativa visual das soluções e o limite de toxicidade da substância veículo constatada na literatura. Ambos, OE1 e OE2, foram solubilizados no veículo propilenoglicol, sendo o OE1 solubilizado na proporção de 1:10 e o OE2 na proporção de 1:5. Em todos os ensaios, poços controles (apenas meio de cultura DMEM) e poços controle veículo (meio de cultura DMEM e propilenoglicol na concentração correspondente) foram realizados. Para o EBA foi realizado apenas o controle com meio DMEM, já que este não necessita solubilização em veículo.

Viabilidade celular: A viabilidade das células após os respectivos tratamentos foi verificada através do ensaio com MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio]}. Este consiste na absorção do sal MTT pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado Formazan. As células foram plaqueadas na densidade de $2,8 \times 10^3$ células por poço em uma placa de 96 poços. Após adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos óleos OE1 na faixa entre (0,5µg/mL até 30µg/mL), OE2 (de 0,01µg/mL até 30µg/mL) em triplicata e com o extrato bruto aquoso EBA (de 0,5mg/mL até 20 mg/mL) em duplicata durante 24 horas. Ao término do tratamento, o conteúdo dos poços foi descartado para adição de MTT (0,5 mg/mL). Após 3,5 horas de incubação, os cristais de formazona foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e foi realizada a leitura da absorbância a 545 nm e 630 nm em leitor de placas. Utilizando os resultados desse ensaio foi possível calcular a concentração inibitória média (IC50) através da construção dos gráficos no software GraphPad Prism 5 para a obtenção de uma linha de tendência linear e cálculo do IC50.

Após esses resultados, foi realizado um ensaio para verificar somente o efeito do tratamento OE2 durante 24, 48 e 72 horas de tratamento sobre as células da linhagem não tumoral Hacat. Para isso, foi utilizado apenas a concentração de IC50 deste óleo obtida na linhagem tumoral como tratamento, e a análise se deu

utilizando a mesma metodologia descrita para verificar o efeito dos tratamentos na viabilidade das células tumorais.

Análise Estatística: Com base nos resultados obtidos através de pelo menos três experimentos independentes, realizados em duplicata, calculou-se as médias e os desvios padrões das diferentes análises. Para a comparação entre os grupos, foi aplicada análise de variância de uma via (ANOVA) seguido de teste de *Tuckey* para comparações múltiplas. Foram analisadas as diferenças entre cada concentração e o controle de meio DMEM considerado significativas quando a análise estatística apresentar $p < 0,05$.

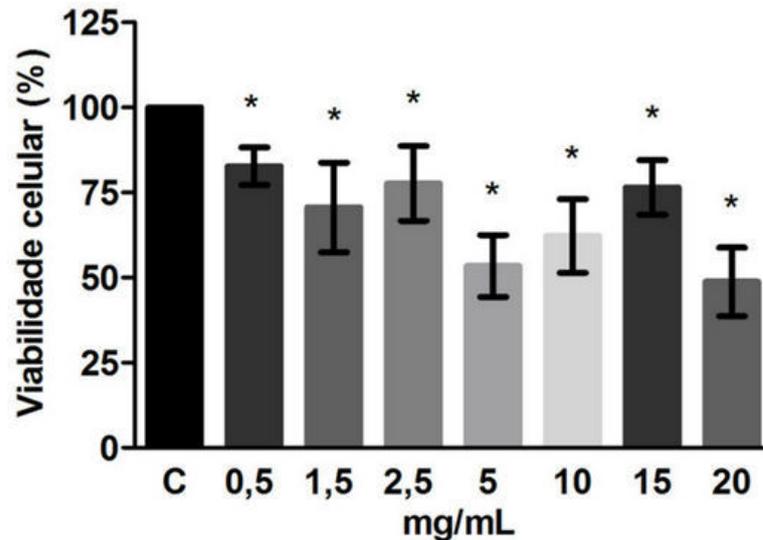
Questões Éticas e biossegurança: O trabalho com linhagens celulares exclui a necessidade de utilização de animais para a pesquisa e, portanto, exclui a possibilidade de questionamentos éticos. Além disto, todas as normas de biossegurança para armazenamento e utilização das mesmas, já foram implementadas em nosso laboratório e estão sendo rigorosamente cumpridas. O descarte dos resíduos químicos e biológicos gerados seguiu o procedimento padrão usual já estabelecido nos laboratórios do curso técnico de Biotecnologia do IFRS-POA.

RESULTADOS

Extrato Bruto aquoso (EBA)

O tratamento com o extrato bruto aquoso (EBA) obtido a partir de folhas de um representante da família *Myrtaceae*, foi capaz de inibir entre 18% e 52%, a viabilidade das células tumorais SiHa. A concentração capaz de promover uma maior inibição em relação do controle foi 20 mg/mL (Figura 1). A partir do teste com concentrações de 0,5 a 20 mg/mL foi possível estabelecer também o IC50 de 7,8 mg/mL nas células de SiHa após 24 horas de tratamento.

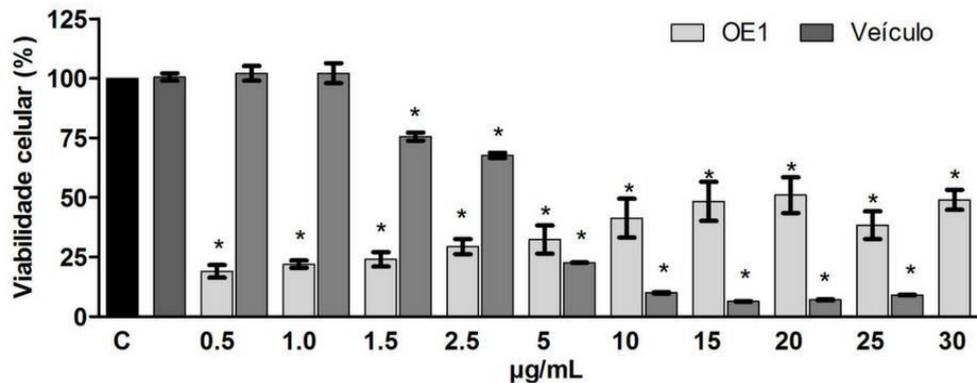
Figura 1 - Efeito de diferentes concentrações de EBA sobre a viabilidade da linhagem SiHa 24h. Os dados mostram a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicatas. *P<0,05 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).



Óleo essencial *Myrtaceae* (OE 1)

O tratamento com o óleo essencial extraído das folhas de uma planta nativa da família *Myrtaceae* (OE1) induziu um efeito significativo de diminuição da viabilidade das células tumorais testadas entre 49% e 81% (Figura 2). A concentração que apresentou um efeito inibitório maior em relação ao controle foi 0,5 µg/mL. Além disso, o veículo utilizado não induziu uma diminuição significativa na viabilidade das células testadas em concentrações menores que 1,5 µg/mL (Figura 2). A partir destes resultados foi possível encontrar um IC50 de 2,1 µg/mL para o OE1 nas células SiHa.

Figura 2 - Efeito de diferentes concentrações de OE1 sobre a viabilidade da linhagem SiHa 24h. Os dados mostram a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicatas. * $P < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).



Óleo essencial *Asteraceae* (OE2)

O tratamento com óleo essencial extraído das flores de uma espécie vegetal nativa da família *Asteraceae* (OE2) também foi capaz de inibir de forma significativa a viabilidade das células tumorais (30% até 94%) (Figura 3). Como podemos observar ainda na Figura 3, o efeito mais proeminente na inibição da viabilidade das células tumorais em relação do controle se deu na concentração 0,5 µg/mL. O cálculo do IC50 para OE2 nas células SiHa em 24 horas de tratamento revelou um valor de 0,072 µg/mL. Em adição, nós também testamos o IC50 de OE2 nas células não tumorais HaCaT durante 24, 48 e 72 horas. Este ensaio revelou que o tratamento com IC50 das células tumorais alterou a viabilidade das células não tumorais em 42% em 24 horas de tratamento, 19% em 48 horas e 21% em 72 horas de tratamento, demonstrando um efeito distinto de OE2 para células tumorais e não tumorais. Além disto, o veículo utilizado não apresentou efeito inibitório na viabilidade das células de HaCat, viabilizando a metodologia e portanto, os resultados com os óleos essenciais testados (Figura 4).

Figura 3 - Efeito de OE2 em diferentes concentrações sobre a viabilidade da linhagem SiHa durante 24h de tratamento. Os dados mostram a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata * P<0,05 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).

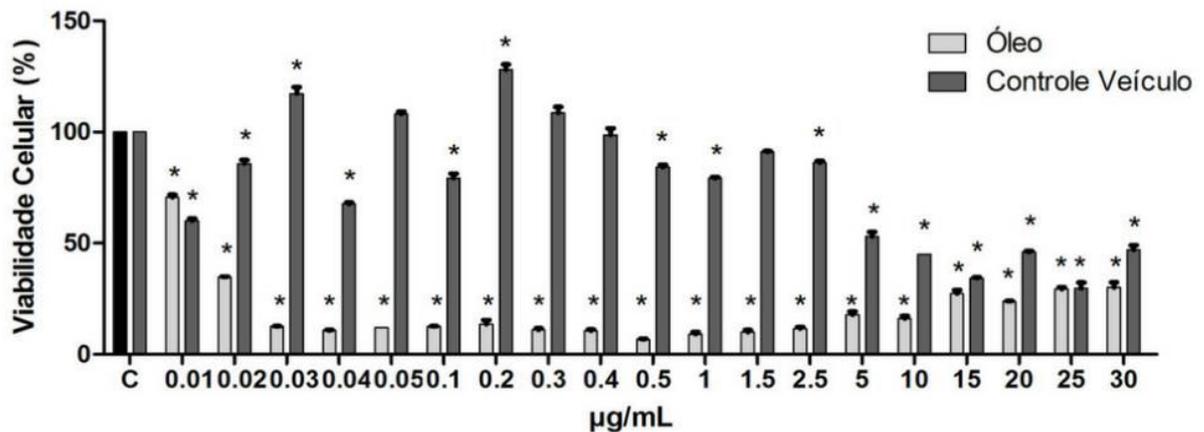
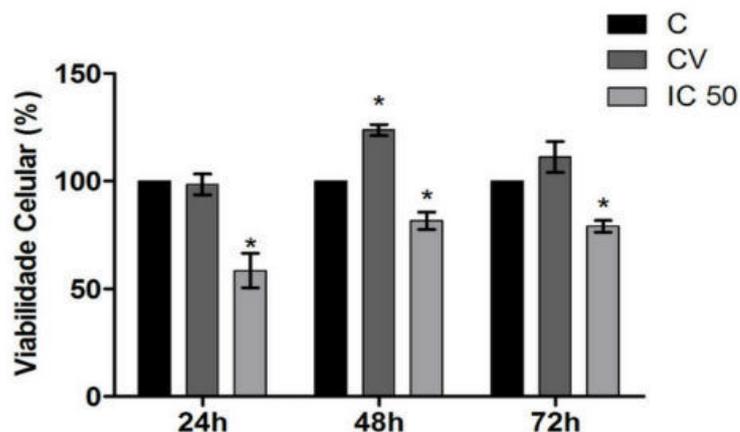


Figura 4 - Efeito de OE2 na concentração IC50 (0,072 µg/mL) sobre a viabilidade da linhagem HaCaT durante 24, 48 e 72 horas de tratamento. Os dados mostram a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata * P<0,05 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).



DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A história dos medicamentos está intimamente relacionada aos produtos naturais, sendo que mais de 60% dos medicamentos antitumorais disponíveis na

clínica apresentam origem relacionada a alguma fonte natural (NEWMAN e CRAGG, 2016). Apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico do câncer, muitos tumores ainda não dispõem de tratamento eficiente. Por outro lado, fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem substâncias de interesse terapêutico. Por estes motivos, nosso grupo de pesquisa tem focado esforços na obtenção, estudo e triagem de produtos de origem vegetal com atividades antitumorais promissoras.

Os resultados demonstrados neste artigo indicam um potencial efeito antineoplásico dos três tratamentos testados, já que as diferentes concentrações dos mesmos foram capazes de inibir de forma significativa a viabilidade das células tumorais utilizadas. Foi observado um efeito significativo de inibição da viabilidade celular com o IC50 do OE1 e OE2, respectivamente, nas concentrações de 2,1 µg/mL e 0,072 µg/mL com redução de células viáveis entre 40% e 88% para o OE1 e de 42% até 88% para o OE2. Estas concentrações são consideradas baixas quando comparadas ao valor encontrado para o fármaco padrão cisplatina, que por sua vez, é de 24.10 µg/mL (NG *et al.*, 2011). Neste sentido, é importante destacar que os valores de IC50 para drogas com atividade antitumoral situam-se entre 6 µM e 16 µM (RABELO *et al.*, 2002). Estes dados, enfatizam o potencial terapêutico dos tratamentos aqui descritos, já que drogas efetivas em concentrações baixas estão relacionadas com a indução de menos efeitos adversos.

Foi observado também, que em concentrações mais baixas, o tratamento com OE1 foi capaz de induzir uma maior inibição na viabilidade das células tumorais. Entretanto, nessas concentrações, o veículo utilizado também exerceu efeitos significativos na mesma, o que nos leva a focar em concentrações menores deste tratamento, já que são mais efetivas e sem influência do veículo. Muitas vezes concentrações maiores ou um maior tempo de exposição ao tratamento não refletem em efeitos mais pronunciados em parâmetros celulares analisados *in vitro*. Efeitos clássicos como o padrão de dose dependência podem não ocorrer, refletindo a indução de diferentes mecanismos referentes à sinalização celular e/ou de uma absorção menos eficiente, muitas vezes observada em estudos com óleos essenciais. Em relação ao tempo de exposição ao tratamento, o mecanismo de tolerância ou resistência a drogas, pode justificar o menor efeito de OE2 em 48 horas de tratamento em relação à exposição de 24 horas. Já foi demonstrado que os

tumores podem apresentar heterogeneidade molecular, o que lhes confere diferente sensibilidade e vias de resposta aos tratamentos. A resistência pode ocorrer por alterações nas células induzidas pelo tratamento (resistência extrínseca), ou pela seleção de subpopulações celulares com maiores limiares aos danos induzidos pelo tratamento (resistência intrínseca) (SANDERS *et al.*, 2012).

O investimento na busca de novos fármacos antineoplásicos é de grande relevância, já que os tratamentos convencionais atualmente disponíveis, afetam de forma indiscriminada as células normais, provocando efeitos adversos, o que pode ser observado, por exemplo na terapia com as antraciclinas provocando efeitos como estomatite, náuseas, alopecia entre outros (HORTOBÁGYI, 1997). No caso do câncer cervical, a intervenção cirúrgica, além de invasiva, não exclui a possibilidade de recorrência do tumor (SOUTTER *et al.*, 2006). A capacidade terapêutica da radioterapia no caso de câncer de colo do útero localmente avançado é limitada pelo tamanho do tumor, uma vez que as doses necessárias para tratar grandes tumores excedem o limite de toxicidade em tecido normal (FLETCHER, 1973). Em relação à quimioradioterapia convencional, também foi demonstrado um prognóstico limitado, com taxas de sobrevivência de 5 anos em aproximadamente 60% dos casos (MORRIS *et al.*, 1999; EIFEL *et al.*, 2004). Além disso, a natureza não seletiva da quimioterapia e da radioterapia leva a efeitos secundários graves em células normais com um elevado índice de proliferação. A cisplatina é um potente agente quimioterápico amplamente utilizado no tratamento do câncer, entretanto, é frequentemente associada à nefrotoxicidade e ototoxicidade, entre outros efeitos adversos (JONES e CHESNEY, 1995; HYPOLITO *et al.*, 2005). Estes efeitos limitam assim a dose eficaz de fármaco anticancerígeno que pode ser administrada e os efeitos adversos induzidos têm um impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes (EIFEL *et al.*, 2004). Estes dados justificam o interesse crescente no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos e estratégias alternativas contra o câncer. Em nosso estudo, nós verificamos que um dos tratamentos (OE2) que induziu um efeito de grande proporção na viabilidade das células tumorais, não foi capaz de induzir o mesmo efeito nas células não tumorais (Figura 4) durante 24 horas de tratamento, demonstrando um efeito distinto em células tumorais e não tumorais. O efeito aqui descrito se manteve quando as células não tumorais foram submetidas a este tratamento também nos tempos de 48 e 72 horas.

Além disso, para a pesquisa envolvendo produtos naturais, a parte utilizada da planta, bem como a forma no qual as soluções são preparadas, são fatores diferenciais para a extração das moléculas de interesse. Sabe-se que entre as pesquisas envolvendo extratos e óleos essenciais de plantas, se destacam a presença de compostos polifenólicos, fenólicos e terpênicos, como responsáveis potenciais por diferentes efeitos biológicos (BAKKALLI *et al.*, 2008; VICTORIA, 2013). Desta forma, em nosso laboratório, temos estudado as propriedades biológicas de diferentes plantas nativas em suas diferentes apresentações. Estudos dos aspectos fitoquímicos e farmacológicos de espécies de plantas nativas demonstram a presença de moléculas, como esteróis e triterpenos, conhecidos por seus efeitos antioxidantes, antiinflamatórios, analgésicos e antimicrobianos (PARENTE *et al.*, 2002). Um resultado normalmente requerido em estudos envolvendo espécies vegetais, é a identificação química e isolamento dos compostos majoritários presentes nos tratamentos testados, visando a análise da contribuição isolada de cada composto para indução dos efeitos observados. Entretanto, no presente estudo, não podemos descartar a possibilidade de uma ação sinérgica das moléculas constituintes de tais espécies vegetais para a contribuição dos efeitos aqui demonstrados.

Os estudos de viabilidade celular em culturas celulares utilizando diferentes concentrações de uma droga em teste e a obtenção do IC50, como demonstrado neste estudo, são de grande relevância para a triagem das drogas com real potencial terapêutico. Entretanto, dada a confirmação de efeitos inibitórios sobre a viabilidade de células tumorais, é importante assegurar a continuidade de testes que analisem o potencial antineoplásicos das drogas testadas através de outras metodologias. Um dos parâmetros importantes e que também realizados em nosso laboratório, é a investigação dos mecanismos de morte celular induzido por um determinado tratamento, caso seja observado um efeito de citotoxicidade. Alterações na coordenação dos diferentes tipos de morte celular (apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência) estão intimamente relacionadas à formação de tumores, assim como, aos efeitos adversos induzidos por diferentes drogas citotóxicas. A demonstração de que a apoptose é um modo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular, tornou a investigação dos mecanismos de morte celular uma

prática importante na busca por novos tratamentos antitumorais quando estes demonstram efeitos promissores nos estudos de triagem de viabilidade celular (GRIVICICH *et al.*, 2007).

Em conclusão, os resultados descritos através deste artigo são promissores como passos iniciais na busca por novas alternativas terapêuticas para o câncer do colo do útero. Entretanto, são necessários estudos adicionais para determinar quais as moléculas estão de fato contribuindo para os efeitos observados, assim como a investigação de outros parâmetros biológicos relevantes para a manutenção e expansão de células tumorais, tais como processos de migração, adesão celular, capacidade de formação de colônias, entre outros processos já padronizados por nosso grupo de pesquisa. De qualquer forma, os resultados aqui demonstrados são exemplos que evidenciam a relevância de investimentos em pesquisas abrangendo diferentes preparações com ativos vegetais para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o câncer.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 16, n. 11, p. 1902– 1903, 2009.
- ALMEIDA, V. L., LEITÃO, A., REINA, L.C. B., MONTANARI, C.A., DONNICI, C.L., LOPEZ, M.T.P. **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução**. *Química Nova*. v. 28, n. 1, p. 118– 129, 2005.
- ALTMANN, K. H., GERTSCH, J. **Anticancer drugs from nature - natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents**. *Natural Product Reports*. v. 24, n. 2, p. 327– 357, 2007.
- ANDREOTTI, R., GARCIA, M. V., CUNHA, R. C., BARROS, J. C. **Protective action of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil in the control of *Rhipicephalus microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) in a cattle pen trial**. *Veterinary Parasitology*, v. 197, p. 341– 345, 2013.
- BAKKALLI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. **Biological effects of essential oils: a review**. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446 – 475, 2008.

BARROSO, G. M., PEIXOTO, A. L., ICHASO, C. L. F., COSTA, C. G., GUIMARÃES, E. F., LIMA, H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, v. 3, p. 237-314, 1991.

BRANDÃO, H.N., DAVID, J.P., COUTO, R.D., NASCIMENTO, J. A. P., DAVID, J.M. **Chemistry and pharmacology of antineoplastic chemoterapeutical derivatives from plants**. *Química Nova*, São Paulo, vol.33, n. 6, 2010.

BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A., JEMAL, A. **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**. American Cancer Society. *Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n.6, p. 394-424, 2018.

BREMER, K. Asteraceae: **Cladistics and classification**. Portland: Timber Press, p. 429, 1994.

BRUNETTI, I., VENDRAMINI, R., JANÚARIO, A. **Effects and Toxicity of Eugenia punicifolia extracts in Streptozotocin-Diabetic Rats**. *Pharmaceutical*, v. 44, n. 1, p. 35–43, 2006.

CHIN, Y. W., BALUNAS, M. J., CHAI, H. B., KINGHORN, A. D. **Drug discovery from natural sources**. *The AAPS J.* v. 8, n. 2, p. E239– 53, 2006.

CONSOLINI, A., SARUBBIO, M. **Pharmacological effects of Eugenia uniflora (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 8, n. 1, p. 57–63, 2002.

EIFEL, P. J., WINTER, K., MORRIS, M., LEVENBACK, C., GRIGSBY, P. W., COOPER, J., ROTMAN, M., GERSHENSON, D., MUTCH, D. G. **Pelvic irradiation with concurrent chemotherapy versus pelvic and para-aortic irradiation for high-risk cervical cancer: An update of Radiation Therapy Oncology Group Trial (RTOG) 90-01**, v. 22, n. 5, p. 872-880, 2004.

FLETCHER, G. **Textbook of Radiotherapy**. 2ª ed. Philadelphia: Lea and Febiger, p. 816, 1973.

GRIVICICH, I., REGNER, A., ROCHA, A. B. **Morte Celular por Apoptose**. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n. 5, p. 335–343, 2007.

GUERRA, M. R., GALLO, C. V. M. **Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes**. *Revista brasileira*, v. 51, n. 3, p. 227–234, 2005.

HORTOBÁGYI, G.N. **Antraciclina no Tratamento do Câncer**. *Drugs*, v. 54, n. 4, p. 1-7, 1997.

HYPPOLITO, M. A., OLIVEIRA, J. A. A., LESSA, R. M., ROSSATO, M. **Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina: estudo em cobaias albinas por emissões otoacústicas produtos de distorção e microscopia eletrônica de**

varredura. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v.71, n. 3, p. 268-73, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, p.1-129, 2017.

JONES, D., CHESNEY, R. **Renal toxicity of cancer chemotherapeutic agents in children: ifosfamide and cisplatin**. *Current opinion in pediatrics*, v. 7, p. 208–213, 1995.

LIMA, V.L.A.G., MÉLO, E.A., LIMA, D.E.S. **Fenólicos e carotenóides totais em pitanga**. *Scientia Agricola*, v. 59, n. 3, p. 447-450, 2002.

LIU, Y., MCKALIP, A., HERMAN B. **Human papillomavirus type 16 E6 and HPV-16 E6/E7 sensitize human keratinocytes to apoptosis induced by chemotherapeutic agents: roles of p53 and caspase activation**. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 78, p. 334–49, 2000.

MORRIS, M., EIFEL, P., LU, J., GRIGSBY, P. **Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer**. *The new England Journal of Medicine*, v. 340, p. 1137–1143, 1999.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014**. *J. Journal of Natural Products*, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M. **The influence of natural products upon drug discovery**. *Journal of Natural Products*; v. 17, p. 215–234, 2000.

NG, W. K., YAZAN, L.S., MAZNAH, I. **Thymoquinone from *Nigella sativa* was more potent than cisplatin in eliminating of SiHa cells via apoptosis with down-regulation of Bcl-2 protein**. *Toxicology in Vitro*, v. 25, n. 7, p. 1392-1398, 2011.

PARENTE, L. M., PAULA, J. R., COSTA, E. A., SILVEIRA, N. A. **Calendula Officinalis: características, propriedades, químicas e terapêuticas**. *Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar*, v. 6, n. 2, 2002.

PARKIN, D.M., BRAY, F. **The burden of HPV-related cancers**. *Vaccine*. v. 24, n. 3, p. S11–S25, 2006.

RABELO, A.M.S., BRETAS, M.L., GUILLO, L.A. **Ensaio da citotoxicidade de curcumina**. Universidade Federal de Goiás. Departamento de Ciências Fisiológicas - Instituto de Ciências Biológicas, Goiânia, 2002.

ROMAGNOLI, C., BRUNI, R., ANDREOTTI, E., RAI, M. K. **Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L.** *Protoplasma*, v. 255, n. 1, p. 57-65, 2005.

SANDERS, N. A., SIMPSON, F., THOMPSON, E. W., HILL, M. M., ENDO-MUNOS, L., LEGGATT, G., GUMINSKI, A. **Role of intratumoural heterogeneity in cancer drug resistance: molecular and clinical perspectives**. *EMBO molecular medicine*, v. 4, n. 8, p. 675-684, 2012.

- SCHIAVON, D. A. B., SCHUCH, L. F. D., FACCIN, A., GONÇALVES, C. L., VIEIRA, V. S. C., GONÇALVES, H. P. **Revisão sistemática de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae): uso popular, composição química e atividade biológica.** *Science and Animal Health*, v. 3, p. 192-208, 2015.
- SILVA, S. M. Pitanga. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, 2006.
- SILVA, A. A., ANDRADE, L. H. C. **Utilização de espécies de Asteraceae por comunidades rurais do nordeste do Brasil: relatos em Camocim de São Félix, Pernambuco.** *Biotemas*, v. 26, n.2, p. 93-104, 2013.
- SOUTTER, W. P., SASIENI, P., PANOSKALTSIS, T. **Long-term risk of invasive cervical cancer after treatment of squamous cervical intraepithelial neoplasia.** *International Journal of Cancer*, v. 118, n. 8, p. 2048–2055, 2006.
- STEFANELLO, M. É. A., PASCOAL, A. C. R. F., SALVADOR, M. J. **Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties.** *Chemistry e Biodiversity*, v. 8, n. 1, p. 73 - 94, 2011.
- TENEN, D.G. **Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way.** *Nature Reviews*, v. 3, p. 89–101, 2003.
- VICTORIA, F.N. **Estudo do potencial farmacológico do óleo essencial das folhas da *Eugenia uniflora* L. Tese de doutorado.** PPG em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, 2013.
- WALBOOMERS, J. M., JACOBS, M. V., MANOS, M. M., BOSCH, F. X., KUMMERS, J. A., SHAH, K. V., SNIJDERS, P. J., PETO, J., MEIJER, C. J., MUNOZ, N. **Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.** *The Journal of Pathology*, v.189, n. 1, p. 12–19, 1999.
- YUAN, C., WANG, P., LAI, C., TSU, E., YEN, M., NG, H. **Recurrence and survival analyses of 1,115 cervical cancer patients treated with radical hysterectomy.** *Gynecologic and Obstetric Investigation*, v. 47, n. 2, p.127–132,1999.

Temperatura ideal de germinação para sementes de citrumeleiro 'swingle'

Paulo Artur Konzen Xavier de Mello Silva

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)

Campus Porto Alegre

(paulo.xavier@poa.ifrs.edu.br)

Resumo: O Citrumeleiro 'Swingle' é um híbrido obtido do cruzamento de pomelo 'Duncan' (*Citrus paradisi* Macf.) com limão bravo (*Poncirus trifoliata* L.). Para a produção de porta-enxertos de plantas cítricas é utilizada a propagação por sementes. Quando se considera o custo de produção de mudas cítricas em ambiente protegido, o tempo de formação da muda é muito importante, por isso é relevante o estudo dos fatores que contribuem para a rápida germinação das sementes. E a temperatura é um dos principais fatores que influenciam na germinação das sementes. Logo, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar a germinação das sementes do porta-enxerto Citrumeleiro 'Swingle' em diferentes temperaturas (constantes e alternada) tais como: 20°C, 25°C e 30°C e 20-30°C. Os resultados indicam que a temperatura ideal para a germinação das sementes de Citrumeleiro cv Swingle é de 30°C constante superando os demais tratamentos térmicos com relação à velocidade de germinação.

Palavras-chave: Citrus; Análise de sementes, Teste de germinação.

Ideal germination temperature for 'swingle' citrus seeds

Abstract: The Citrumeleiro 'Swingle' is a hybrid obtained by crossing pomelo 'Duncan' (*Citrus paradisi* Macf.) with trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L.). Seed propagation is used for the production of rootstocks of citrus plants. When considering the cost of production of citrus seedlings in protected environment, the time of seedling formation is very important, so it is relevant to study the factors that contribute to the rapid germination of the seeds. And temperature is one of the main factors that influence seed germination. Therefore, the objective of this research was to evaluate the germination of the Citrumeleiro 'Swingle' rootstock at different temperatures (constants and alternating) such as: 20°C, 25°C and 30°C and 20-30°C. The results indicate that the ideal temperature for the germination of Citrumeleiro cv Swingle seeds is 30°C constant, surpassing other heat treatments in relation to the germination speed.

Keywords: Citrus; seed analysis; Germination test.

INTRODUÇÃO

O Citrumeleiro 'Swingle' é um híbrido obtido na Florida em 1907 pelo cientista Walter Tennyson Swingle, que polinizou flores de pomelo 'Duncan' (*Citrus paradisi* Macf.) com pólen de flores de limoeiro bravo (*Poncirus trifoliata* L.). O objetivo inicial

era transferir a resistência a geadas do limão para os pomelos, muito suscetíveis ao frio da Florida (SANTOS, 2015). A principal característica do híbrido criado batizado com o nome de seu criador, "Swingle", é a sua resistência à Gomose (*Phytophthora spp*), ao Nematóide dos citros (*Tylenchulus semipenetrans* Cobb.) e ao frio que é igual ou superior a dos porta-enxertos tradicionalmente utilizados na citricultura. Além disso, o Swingle tem mostrado, até o momento, uma tolerância superior a uma anomalia vascular recorrente denominada "Declínio dos citros" (ARAÚJO *et al.*, 2007).

No Brasil, segundo Oliveira *et al.* (2008), 100% da produção de porta-enxertos cítricos, de uso comercial, são obtidos a partir de sementes. Quando se considera o custo de produção de citros em ambiente protegido, o tempo de formação da muda é muito importante, pois, diminuindo o tempo de permanência da muda no viveiro, se aumenta o número de ciclos de produção de mudas, durante a vida útil da estrutura física, desta forma, otimizando a mão-de-obra e reduzindo os gastos com defensivos agrícolas e fertilizantes (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

O valor das sementes e da estrutura do sistema de produção de mudas em ambiente protegido é alto e requer grande uniformidade na germinação das sementes e na emergência das plântulas. Uma vez que a variabilidade da germinação acarreta posterior desuniformidade das plantas ao longo do processo de produção de mudas. Para a obtenção de porta-enxertos vigorosos e uniformes, necessita-se utilizar sementes com boa qualidade genético-sanitária e condições favoráveis à germinação e ao desenvolvimento das plântulas. Neste sentido, faz-se necessário testar tratamentos que proporcionem uniformidade na germinação de sementes das diversas cultivares de porta-enxertos de citros (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

A temperatura em que ocorre a germinação de sementes é um fator muito importante, tanto no aspecto de germinação total como na velocidade de germinação, pois a temperatura influencia a velocidade de absorção de água e as reações bioquímicas que ocorrem durante o processo (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). As variações da temperatura afetam a velocidade, a porcentagem e a uniformidade da germinação (MARCOS FILHO, 2005). As sementes apresentam comportamento variável frente a esse fator, não havendo uma temperatura ótima e uniforme para todas as espécies; a faixa de 20°C a 30°C tem sido adequada para grande número de espécies subtropicais e tropicais (BORGES e RENA, 1993).

Os citros têm sua origem na Ásia tropical e subtropical, região com temperatura média mais elevada e grande umidade. Provavelmente, as condições ambientais benéficas para os indivíduos adultos, também proporcionam as melhores condições para a germinação das sementes de citros. Segundo Oliveira e Scivittaro (2007), o desenvolvimento dos porta-enxertos é otimizado em temperaturas de 26 a 28°C.

Diversos trabalhos realizados com espécies arbóreas nativas do Brasil mostraram que, em temperatura constante, entre 20 e 30°C, as sementes germinam bem, mas apresentam um melhor desempenho germinativo em temperatura alternada (SANTOS e AGUIAR, 2005). A alternância da temperatura corresponde a uma adaptação das espécies às flutuações naturais do ambiente (BORGES e RENA, 1993), principalmente às flutuações diárias (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1982). Flutuações da temperatura geralmente promovem a germinação das sementes, provavelmente pela mudança das propriedades físicas do tegumento e na ativação das diferentes etapas metabólicas da germinação (CARDOSO, 1992).

Devido a importância comercial da produção de porta-enxertos e a carência de informação quanto a temperatura adequada para germinação de sementes de Citrumeleiro 'Swingle', esse trabalho de pesquisa visa comparar diversos tratamentos térmicos na germinação de sementes para recomendar a temperatura que promove maior velocidade de germinação.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), em Piracicaba, SP.

As sementes utilizadas foram extraídas de frutos maduros colhidos de dezenas de árvores do pomar da ESALQ em Piracicaba, SP. As sementes foram processadas manualmente, submergindo-as em água e esfregando em peneira para a retirada da mucilagem externa, expostas em temperatura ambiente sobre papel por 48h para secar e, em seguida, acondicionadas em saco de papel e mantidas armazenadas em ambiente refrigerado à 4°C, por 10 dias. Para determinação do teor de água das sementes foi utilizado o método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Para o teste de germinação o experimento foi conduzido com quatro repetições de 25 sementes em cada tratamento acondicionadas em caixas plásticas de 21 x 14 x 6,5 cm, com tampa, em germinadores de câmara com temperatura constante. Antes da sementeira, com ajuda de uma pinça, foi removido o tegumento externo das sementes para evitar a desuniformidade de germinação observada por Oliveira e Scivittaro (2007). Como substrato foi utilizado areia autoclavada a 120°C por 60 minutos, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) e a sementeira efetuada sobre o substrato umedecido com água destilada. A quantidade de água adicionada foi calculada segundo a granulometria da areia e sua capacidade de retenção (BRASIL, 2009).

Foram feitas análises periódicas para avaliar o número de sementes germinadas (percentual de germinação), considerando o critério botânico de germinação (protusão radicular). Além disso, houve avaliação da manifestação de poliembrionia nas sementes nos diversos tratamentos.

No experimento de germinação foram testadas as temperaturas constantes de 20, 25 e 30°C e alternada de 20-30°C. Na temperatura alternada foi adotado o período de 8h à 30°C e 16h à 20°C, nestas condições as caixas eram trocadas manualmente de germinadores.

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados (4 repetições X 4 tratamentos) e com a comparação das médias pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Os parâmetros analisados no experimento foram: germinação da semente, semente germinada com comprimento de raiz com mais de 1 cm, semente germinada com duas raízes e emergência do epicótilo. As observações foram realizadas em 7, 13, 20 e 26 dias após a instalação do experimento. Além disso, houve a contagem final do teste de germinação aos 50 dias após a sementeira, onde foram analisados o número de plantas normais (PN), o número de plantas anormais (PA) e as sementes não germinadas (SNG) nos quatro diferentes tratamentos (temperaturas de germinação).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No momento da instalação do experimento as sementes de Citrumelo 'Swingle' apresentavam teor de água em torno de 22%. A retirada do tegumento

para análise do grau de umidade não afetou os resultados. Os valores encontrados são semelhantes aos relatados por Siqueira *et al.* (2002) que observaram grau de umidade de 21,42% para sementes de porta-enxertos 'Swingle' armazenados sob refrigeração.

Na Tabela 1 podemos observar que a germinação das sementes de Citrumeleiro 'Swingle' foi mais rápida no tratamento à 30°C em relação aos outros tratamentos. Resultado semelhante foi também encontrado por Figliolia *et al.* (2009) e Araújo Neto e Aguiar (2000), trabalhando com arbóreas brasileiras. Na análise aos 7 dias, podemos observar que o tratamento à 25°C constante e o de temperatura alternada (20-30°C) não diferiram estatisticamente. Entretanto, se observarmos o critério de sementes germinadas com 1 cm de raiz nas duas análises posteriores (13 e 20 dias) houve diferença estatisticamente significativa, colocando o tratamento à 25°C em segundo lugar e o de temperatura alternada (20-30°C) em terceiro na ordem de velocidade de germinação.

Na análise realizada aos 26 dias, quando a germinação das sementes não permite encontrarmos diferença estatística entre os tratamentos, ainda podemos elencar o tratamento à 30°C como o melhor, pois apresenta diferença significativa na emergência do epicótilo (Tabela 1).

No experimento para verificar a influência da temperatura na emergência dos porta-enxertos cítricos, Wiltbank *et al.* (1995) observou-se que o *Poncirus trifoliata* L. levou 80 dias para iniciar a emergência a temperaturas de 15-20°C, mas, quando a faixa de temperatura oscilou de 30-35°C, reduziu o tempo de germinação para 14 a 30 dias.

Levando em consideração o critério adotado para avaliar a poliembrionia (sementes germinadas com duas raízes) podemos observar que os tratamentos térmicos diferenciais não provocaram diferença estatisticamente significativa, confirmando que esta característica possui um forte componente genético e que não se altera com a mudança desse fator ambiental. Este dado é importante, visto que um maior número de embriões por semente aumenta a proporção de embriões menores que, ao emergirem, têm um crescimento inicial menor, aumentando o período de formação da muda (SCHÄFER *et al.*, 2005).

Temperatura ideal de germinação para sementes de citrumeleiro 'swingle'

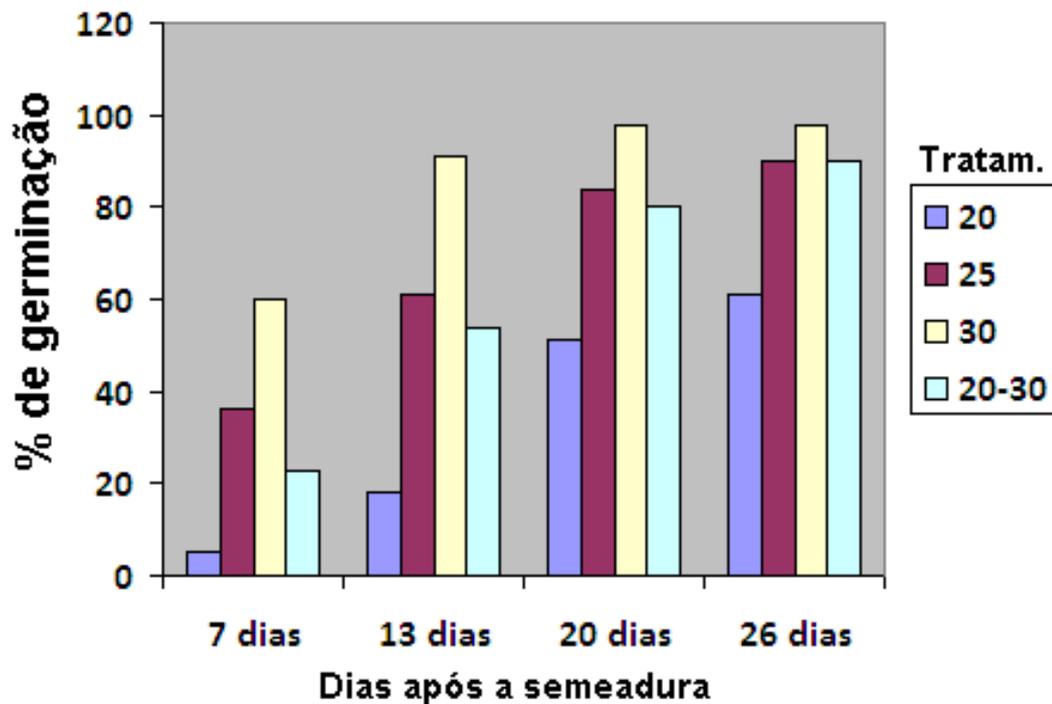
Tabela 1 - Médias das quatro análises realizadas (7, 13, 20 e 26 dias) para os parâmetros de germinação da semente, semente germinada com comprimento de raiz com mais de 1 cm, semente germinada com duas raízes e emergência do epicótilo em sementes de Citrumeleiro 'Swingle' tratadas com quatro diferentes temperaturas de germinação (20°C; 25°C; 30°C; 20-30°C)*.

Tratamento	Germinação	Raiz (1 cm)	Raiz dupla	Epicótilo
Análise com 7 dias				
20	1,25 c	0,00 c	0,00 a	0,00 a
25	9,00 b	6,50 b	2,25 a	0,00 a
30	15,00 a	10,75 a	2,25 a	0,00 a
20-30	5,75 bc	2,25 c	1,50 a	0,00 a
Análise com 13 dias				
20	4,50 c	1,25 c	1,00 a	0,00 c
25	15,25 b	14,00 b	5,75 a	3,00 b
30	22,75 a	21,25 a	5,25 a	11,75 a
20-30	13,50 b	11,25 b	5,00 a	0,00 c
Análise com 20 dias				
20	12,75 c	10,50 c	4,50 a	0,00 d
25	21,00 b	18,00 b	5,25 a	11,75 b
30	24,50 a	23,75 a	7,50 a	19,25 a
20-30	20,00 b	17,25 b	6,25 a	6,25 c
Análise com 26 dias				
20	15,25 b	14,25 b	5,25 a	2,00 c
25	22,50 a	22,00 a	6,50 a	16,25 b
30	24,50 a	24,25 a	8,75 a	23,00 a
20-30	22,50 a	22,25 a	6,50 a	15,50 b

*Em cada coluna, para cada parâmetro, dentro de cada análise realizada, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

O gráfico das avaliações do percentual germinativo das sementes nos diversos tratamentos (Figura 1) demonstra a velocidade germinativa e o rápido alcance de grande percentual germinativo no tratamento a 30°C em comparação com os outros tratamentos.

Figura 1- Percentual de germinação das sementes nas quatro avaliações realizadas.



Com exceção do tratamento a 20°C, os outros tratamentos não apresentam diferença estatisticamente significativa no alcance do potencial máximo de germinação aos 26 dias após a sementeira. O resultado sugere recomendar temperatura de germinação mais alta que 20°C para as sementes de Citrumeleiro 'Swingle'.

Na contagem final do teste de germinação, aos 50 dias após a sementeira (Tabela 2), observamos que não houve diferença estatisticamente significativa na emergência de plantas normais e no surgimento de plantas anormais. O que significa que apesar dos tratamentos germinativos com temperaturas diferentes apresentarem variação na velocidade de germinação das sementes, não diferiram no resultado estatístico final em relação ao número de plantas emergidas. O resultado é semelhante para plantas anormais nos diferentes tratamentos, provavelmente, indicando que a característica está determinada geneticamente. Houve um número maior de sementes não germinadas, estatisticamente significativa, no tratamento a 20°C, provavelmente pela demora na germinação e eventual contaminação das sementes.

Temperatura ideal de germinação para sementes de citrumeleiro 'swingle'

Tabela 2 - Resultado da contagem final do teste de germinação aos 50 dias após a semeadura, apresentando as médias de plantas normais (PN), plantas anormais (PA) e sementes não germinadas (SNG) nos quatro diferentes tratamentos (temperaturas de germinação: 20°C; 25°C; 30°C; 20-30°C) em sementes de Citrumeleiro 'Swingle'.

Tratamento	PN*	PA*	SNG**
20	21,00 a	0,25 a	3,75 a
25	22,00 a	1,25 a	1,75 ab
30	23,00 a	1,25 a	0,75 b
20-30	23,25 a	1,00 a	0,75 b

*Em cada coluna, para cada parâmetro, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

**No parâmetro SNG, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

CONCLUSÕES

1. A velocidade de germinação das sementes e a emergência das plântulas de Citrumeleiro 'Swingle' são maiores em temperatura constante de 30°C.
2. A manifestação poliembriogênica nas sementes de Citrumeleiro 'Swingle' independe da temperatura de germinação, bem como o número de plântulas anormais.
3. A qualidade das sementes de Citrumeleiro 'Swingle' não é alterada pela temperatura de germinação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Dra. Ana Dionísia da Luz Coelho Novembre pelos ensinamentos e pela concessão de espaço no laboratório de análise de sementes ESALQ/USP para realizar os meus experimentos.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, P.O.L.C.; GONÇALVES, F.C.; RAMOS, J.D.; CHALFUN, N.N.J.; CARVALHO, G.J. **Crescimento e percentual de emergência de plântulas de**

citrumeleiro 'Swingle' em função dos substratos e das doses de corretivo à base de *Lithothamnium*, após cem dias da sementeira. *Ciência Agrotécnica*. v.31, n.4, Lavras, Jul/Ago, 2007.

ARAÚJO NETO, J. C.; AGUIAR, I. B. **Germinative pretreatments to dormancy break in *Guazuma ulmifolia* Lam. seeds.** *Scientia Forestalis*, Piracicaba, n. 58, p. 15-24, 2000.

BORGES, E.E.L.; RENA, A.B. **Germinação de sementes.** In: AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. *Sementes florestais tropicais*. Brasília: ABRATES, p. 83-135. 1993.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf > Acesso em: 22/01/2020.

CARDOSO, V.J.M. **Temperature dependence on seed germination of a weed (*Sidaglaziovii*– Malvaceae).** *Naturalia*, São Paulo, v.17, p.89-97, 1992.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Germinação de sementes.** In: CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, p.128-166. 2000.

FIGLIOLIA, M. B.; AGUIAR, I. B. de. SILVA, A. da. **Germinação de sementes de três espécies arbóreas brasileiras.** *Rev. Inst. Flor.*, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 107-115, jun. 2009.

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S. M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade das sementes.** Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **Factors affecting germination.** In: MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. *The germination of seeds*. 3 ed. Oxford: Pergamon Press, 1982. p.22-49.

OLIVEIRA, R.P.; SCIVITTARO, W.B. **Formação do porta-enxerto Trifoliata: época de sementeira e tegumento na emergência de plântulas.** *Ciência Rural*, Santa Maria v.37, n. 1, p. 281-283, 2007.

OLIVEIRA, R.P.; SOARES FILHO, W.S.; PASSOS, O.S.; SCIVITTARO, W.B.; ROCHA, P.S.G. **Produção de porta-enxertos de citros.** In: OLIVEIRA, R.P.; SOARES FILHO, W.S.; PASSOS, O.S.; SCIVITTARO, W.B.; ROCHA, P.S.G. *Porta-enxertos para citros*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 226).

SANTOS, P.C.M. **Phytophthora nicotianae: ação de meios de cultura e da qualidade da luz no crescimento e esporulação e aspectos fisiológicos e bioquímicos da interação com porta-enxertos cítricos.** 2015. Tese (Doutorado

em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

SANTOS, S.R.G.; AGUIAR, I. B. **Efeito da temperatura na germinação de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs separadas pela coloração do tegumento.** *Scientia Forestalis*, n. 69, p.77-83, dez., 2005.

SCHÄFER, G.; SOUZA, P.V.D.; DAUTD, R.H.S.; DORNELLES, A.L.C. **Substratos na emergência de plântulas e expressão da poliembrionia em porta-enxertos de citros.** *Ciência Rural*, v.35, n.2, mar-abr, 2005.

SIQUEIRA, VASCONCELLOS, J.F.F.; DIAS, D.C.F.S.; PEREIRA, W.E. **Germinação de sementes de porta-enxertos de citros após o armazenamento em ambiente refrigerado,** *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 2, p. 317-322, ago.; 2002.

TEIXEIRA, P.T.L.; SCHAFFER, G.; SOUZA, P.V.D.; TODESCHINI, A. **A escarificação química e o desenvolvimento inicial de porta-enxertos cítricos.** *Revista Brasileira de Fruticultura*. v.31, n.3, Jaboticabal, set., 2009.

WILTBANK, W.J.; ROUSE, R.E.; KHOI, L.N. **Influence of temperature on citrus rootstock seed emergence.** *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, v.108, p.137-139, 1995.

**Análises de extrações de DNA: ponto de partida para aplicações
biotecnológicas na área da biologia molecular**

Diego Hepp

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(diego.hepp@poa.ifrs.edu.br)

Jordânia Santos Pinheiro

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(jordaniaspineiro@gmail.com)

Milena Flor

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(milenaflor62@hotmail.com)

Bruna Bernar Dias

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(bruna_bernar_dias@hotmail.com)

Rudá Ferreira Morais

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(udaferreiramorais_9@hotmail.com)

Gabriela Ribeiro Borges

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(gabibiborges@gmail.com)

Jair Renato Silva da Silva Junior

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) -

Campus Porto Alegre

(junior_cmpa@hotmail.com)

Juliana Schmitt de Nonohay

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) -

Campus Porto Alegre

(juliana.nonohay@poa.ifrs.edu.br)

Resumo: A Biologia Molecular constitui importante área da Biotecnologia relacionada com variadas análises da informação genética contida nas moléculas de DNA e RNA. A disciplina de Biologia Molecular do Curso Técnico em Biotecnologia, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - Campus Porto Alegre (IFRS-POA), aborda o estudo de processos, análises e técnicas moleculares e, entre as técnicas, a extração de DNA, que também têm sido objeto de pesquisa de projetos desenvolvidos no IFRS-POA. Este artigo visa relatar estas pesquisas, que analisaram diferentes variáveis das extrações de DNA, incluindo: análise do melhor protocolo para tecidos vegetais (folhas); quantidade de tecido e volume de soluções utilizadas para extração de DNA de tecido animal (músculo bovino) e formas de conservação das amostras de tecido bovino até o momento da extração. O desenvolvimento destes projetos de pesquisa resultou em dados importantes, quanto ao rendimento e qualidade de extrações de DNA de tecidos vegetais e animais, e que poderão contribuir no apuramento de métodos subsequentes de análises moleculares.

Palavras-chave: Biotecnologia; Biologia Molecular; Extração de DNA.

Analysis of DNA extractions: starting point for biotechnological applications in the area of molecular biology

Abstract: The molecular biology is an important field of Biotechnology focused on different analyses of the genetic information held in the DNA and RNA molecules. The Molecular Biology course is part of the Technical Biotechnology Program, of the Federal Institute of Education, Science, and Technology of Rio Grande do Sul — Porto Alegre Campus (IFRS-POA), and includes studies on processes, analyses, and molecular techniques. The studied techniques include the extraction, quantification, and analysis of biological DNA samples that have been studied in researches developed in the Campus. This article aims to report the objectives, methods, and main results of these researches. Several DNA extraction parameters were analyzed, such as the evaluation of the best protocol for vegetal tissues, the number of animal tissue and solutions, the degradation rate, and forms of animal sample conservation until the extraction moment. The results showed the importance of such evaluations to improve the quality and efficiency of DNA extractions, hence improving the subsequent methods of molecular analysis.

Keywords: Biotechnology; Molecular Biology; DNA Extraction.

INTRODUÇÃO

A área das Ciências Biológicas, denominada Biologia Molecular, emergiu a partir da dedução da estrutura da molécula de DNA, o ácido desoxirribonucléico. O DNA é de fundamental importância na existência da vida, por ser a molécula que armazena as informações genéticas dos indivíduos, passadas de geração em geração, e por determinar a produção das moléculas de RNA (ácidos ribonucléico) e proteínas nas células. As proteínas, juntamente com os glicídios, lipídios, vitaminas, sais minerais e RNAs, determinam o fenótipo, ou seja, a morfologia, fisiologia e mesmo o comportamento dos indivíduos de todas as espécies.

A Biologia Molecular constitui destacado campo da Biotecnologia, relacionada a clonagens de indivíduos e genes, obtenção de organismos transgênicos, sequenciamento de genes e genomas, identificação de indivíduos, diagnóstico molecular de doenças, entre inúmeros exemplos. Desta forma é importante que cursos de Biotecnologia, em seus diferentes níveis de formação, tenham Biologia Molecular entre as disciplinas ofertadas, tal como ocorre no Curso Técnico em Biotecnologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - *Campus* Porto Alegre (IFRS-POA).

Na disciplina de Biologia Molecular, do Curso Técnico em Biotecnologia do IFRS-POA, as aulas práticas são focadas nas técnicas básicas e principais para o funcionamento de um laboratório da área, tais como: extração de DNA, análise do DNA extraído pelas técnicas de espectrofotometria e eletroforese em gel, amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise dos resultados dos testes de DNA por eletroforese. Entre estas técnicas, a extração de DNA, além de ser trabalhada nas aulas práticas e teóricas do Curso Técnico em Biotecnologia, tem sido objeto de estudo de linha de pesquisa do grupo de pesquisa “Núcleo Interdisciplinar de Estudos em Biotecnologia (NIEB)”, do *Campus* Porto Alegre do IFRS.

A extração de DNA se destaca por constituir o ponto de partida para as demais técnicas de Biologia Molecular, como PCR, sequenciamento de DNA, clonagem de genes, realizadas nas diferentes análises moleculares. Nesse sentido, este artigo visa apresentar quatro projetos de pesquisa desenvolvidos por grupo de pesquisa do NIEB, que objetivaram aprimorar e alargar o entendimento sobre os diferentes aspectos de extrações de DNA.

As pesquisas foram desenvolvidas de forma subsequente, sendo os principais resultados obtidos aplicados no projeto seguinte. O primeiro projeto analisou o melhor protocolo de extração de DNA, entre três, para tecidos vegetais (folhas). O segundo projeto avaliou a quantidade inicial de tecido animal (músculo bovino) e volumes de solução de extração e do sobrenadante retirado na etapa de purificação, em dois protocolos de extração de DNA. E os dois últimos projetos analisaram formas de conservação de amostras de tecido bovino, até o momento da extração de DNA, utilizando diferentes temperaturas e conservantes.

O trabalho está organizado de forma que, inicialmente, está descrita a metodologia geral, comum aos quatro projetos, e, após, informações específicas de cada pesquisa.

DESCRIÇÃO DOS PROJETOS DE PESQUISA

METODOLOGIA GERAL

Os quatro projetos de pesquisa empregaram pelo menos um de três protocolos de extração de DNA: (1) protocolo desenvolvido para vegetais por Doyle e Doyle (1990), com pequenas modificações como a maceração das amostras diretamente na solução tampão de extração, caracterizado pelo uso do detergente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB); (2) protocolo que utiliza alta concentração salina (“*salting out*”), de Miller *et al.* (1988) e (3) protocolo que utiliza partículas de sílica (*kit* comercial; BOOM *et al.* 1990). Os protocolos foram respectivamente denominados de “CTAB”, “*salting out*” e “sílica”.

As soluções utilizadas nos três protocolos, em cada uma das cinco principais etapas da técnica de extração de DNA, estão apresentadas na Tabela 1. Observa-se que as diferenças entre os três protocolos ocorrem nas etapas iniciais, de lise celular e purificação das extrações (Tabela 1). No protocolo “CTAB” há o uso do detergente CTAB e do antioxidante β -mercaptoetanol na lise celular e de clorofórmio na purificação. No protocolo “*salting out*”, o reagente β -mercaptoetanol, também foi utilizado, mas o detergente é o dodecil sulfato de sódio (SDS) e a purificação das amostras foi realizada com cloreto de sódio (NaCl). No *kit* comercial, o detergente foi o Triton, o sal utilizado foi o tiocianato de guanidina e partículas de sílica são utilizadas para isolar as moléculas de DNA.

Tabela 1 - Soluções utilizadas nas cinco principais etapas de extração de DNA nos protocolos “CTAB”, “salting out” e “sílica”.

ETAPAS EXTRAÇÃO DE DNA	PROTOCOLOS		
	“CTAB”	“Salting out”	“Sílica”
1. Lise celular	Tampão de lise (CTAB 2%, Tris 0,1M, EDTA 0,02M e NaCl 1,4M) + β -mercaptoetanol 1%	Tampão de lise (SDS 2%, Tris 0,1M, EDTA 0,02M e NaCl 1M) e β -mercaptoetanol 0,2%	Tampão de lise (tiocianato de guanidina 3M, Tris 0,1M e Triton 1%) + suspensão de sílica
2. Purificação	Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1)	NaCl 5M	Tiocianato de guanidina 3M e Tris 1M
3. Precipitação	Álcool etílico absoluto	Álcool etílico absoluto	Álcool etílico absoluto
4. Lavagem	Etanol 70%	Etanol 70%	Etanol 70%
5. Ressuspensão	Tampão TE (Tris 0,1M e EDTA 0,5M)	Tampão TE (Tris 0,1M e EDTA 0,5M)	Tampão TE (Tris 0,1M e EDTA 0,5M)

Fonte: Os autores com base nos trabalhos de MILLER *et al.* (1988); BOOM *et al.* (1990); DOYLE e DOYLE, (1990).

Nas extrações, as amostras de tecido vegetal ou animal foram pesadas em balança, com auxílio de pinças e tesouras previamente limpas com etanol e flambadas, a fim de evitar contaminação. As amostras foram submetidas imediatamente a extração ou conservadas em tubos de microcentrífuga (com ou sem conservantes) até o momento da extração.

Nos quatro projetos, na avaliação do resultado das extrações, a quantidade de DNA obtido foi determinada pelo método de espectrofotometria. Neste método, a quantidade de luz absorvida (absorbância) pela solução com DNA, no comprimento de onda de 260 nm, apresenta correlação positiva com a concentração de DNA na amostra (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Após a obtenção do valor da absorbância (A) da amostra, aplica-se a fórmula $[DNA (ng/\mu L) = A_{260nm} \times FD \times 50]$ para a

determinação da concentração de DNA, considerando-se também o fator de diluição (FD) e o valor padrão de $A=1$, que corresponde a uma concentração de 50 ng de DNA por microlitro (μL).

A determinação da qualidade das amostras foi igualmente realizada por espectrofotometria, com mediação adicional de absorbância das amostras a 280 nm de comprimento de onda. Nesta avaliação, a proporção das absorbâncias medidas nos dois comprimentos de onda (260nm/280nm) indica o índice adequado de pureza das amostras de DNA, que deve estar entre 1,6 e 2,0. Valores abaixo ou acima podem significar a presença de proteínas, RNAs ou outros contaminantes nas extrações.

DESCRIÇÃO ESPECÍFICA DE CADA PROJETO DE PESQUISA

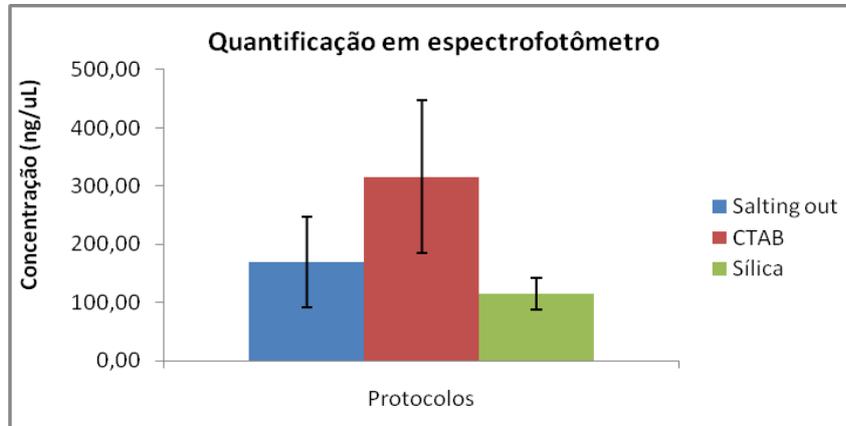
Os objetivos, material e métodos específicos e os principais resultados de cada projeto de pesquisa estão a seguir descritos.

1. Avaliação da eficiência de três protocolos de extração de DNA para pitanga (*Eugenia uniflora* L.)

Este estudo avaliou os três protocolos de extração de DNA (“CTAB”, “*Salting out*” e “sílica”) para tecidos vegetais, no caso folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). As extrações de DNA foram a partir de 50 mg de folhas jovens de 16 plantas para cada um dos três protocolos, em um total de 48 amostras.

As extrações de DNA foram quantificadas por espectrofotometria e os resultados obtidos para cada protocolo foram: (1) “CTAB” - concentração média de 315,94 ng/ μL (desvio padrão de 131,11 ng/ μL) e média do índice de pureza das amostras de 1,90 (+/- 0,26); (2) “*Salting out*” concentração média de 169,38 ng/ μL (+/- 78,05 ng/ μL) e média do índice de pureza das amostras de 1,23 (+/- 0,24); (3) “Sílica” - concentração média foi 115,63 ng/ μL (+/- 27,58 ng/ μL), e índice de pureza de 1,06 (+/-0,06), conforme representado na Figura 1.

Figura 1 - Resultado das quantificações das extrações de DNA de folhas de pitanga nos três protocolos.



Fonte: os autores.

Na avaliação dos resultados, o protocolo “CTAB” mostrou-se como o mais adequado para extração de DNA de folhas, apresentando maior concentração de ácidos nucleicos e menor interferência de outras moléculas, especialmente proteínas, que os demais protocolos. Estes resultados foram confirmados em análise de qualidade e quantificação por eletroforese em gel adicionalmente realizada (dados não apresentados).

2. Modificação em variáveis de dois protocolos de extração de DNA a partir de tecido animal (músculo bovino)

O objetivo do segundo projeto foi avaliar modificações nos protocolos “CTAB” e “*Salting out*”, visando a melhoria das variáveis de concentração, rendimento e pureza do DNA obtido. As modificações avaliadas nos protocolos foram quanto a: quantidade de tecido inicial (tratamento A), volume da solução tampão de extração (tratamento B) e volume de sobrenadante (fase aquosa com DNA) transferido durante a etapa de purificação (tratamento C). No delineamento experimental foram determinadas seis repetições amostrais para cada protocolo, por tratamento. Os melhores valores obtidos nos tratamentos foram adotados para uso no tratamento seguinte.

A Tabela 2 expressa as médias dos resultados obtidos no tratamento A, quanto as variáveis de concentração de DNA, rendimento das extrações, índice de

pureza das amostras e coeficiente de variação entre as amostras em relação às quantidades iniciais de tecido bovino, para os protocolos “CTAB” e “Salting out”.

Tabela 2 - Média dos resultados obtidos (6 repetições) nos dois protocolos.

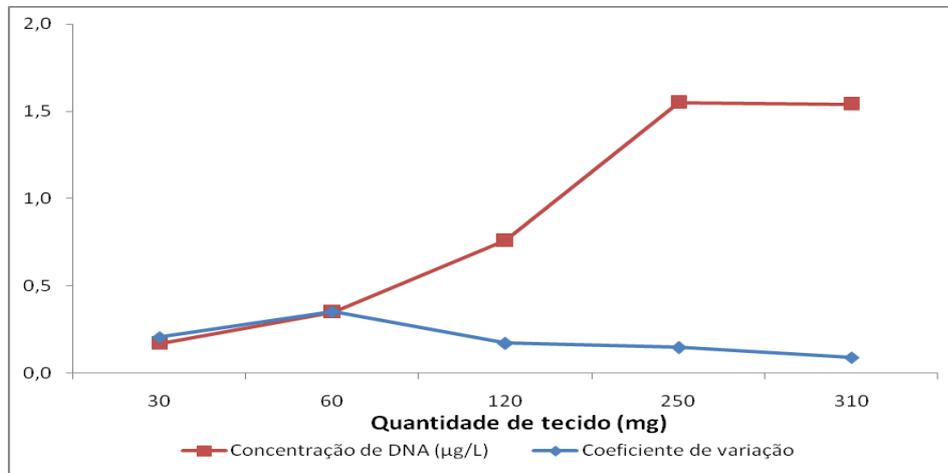
Protocolo	Quantidade de tecido (mg)	Concentração de DNA ($\mu\text{g/L}$)	Rendimento ($\mu\text{g/mg}$)	Pureza	Coeficiente de variação (%)
“CTAB”	30	0,17	0,58	1,97	20,84
	60	0,35	0,57	1,97	35,22
	120	0,76	0,64	1,81	17,22
	250	1,55	0,61	1,89	14,79
	310	1,54	0,49	1,96	9
“Salting out”	30	0,22	0,74	1,87	32,33
	60	0,41	0,68	1,62	15,97
	120	0,76	0,63	1,83	14,29
	250	0,94	0,37	1,90	14,88
	310	1,26	0,4	1,94	20,86

Fonte: os autores.

No tratamento A observou-se que o aumento da quantidade de tecido inicial resultou em maior concentração média de DNA obtido, conforme o esperado. Entretanto, o rendimento das extrações, ou seja, a relação entre a quantidade de DNA obtido e a quantidade inicial de tecido, não aumentou proporcionalmente. Houve um decréscimo de rendimento para as quantidades iniciais de tecido de 250 mg e 310 mg, em ambos protocolos.

Com base nesta avaliação, a quantidade de 120 mg de tecido bovino foi considerada como a mais adequada para extração de DNA, em ambos protocolos. Esta avaliação foi corroborada pelos valores médios intermediários dos coeficientes de variação, observados para a quantidade inicial de tecido de 120 mg (Tabela 2). Os resultados obtidos para o protocolo “CTAB” podem também ser observados na Figura 2. O coeficiente de variação se refere a variabilidade nos resultados dentro de cada grupo. Quanto ao índice de pureza das amostras, todos os valores médios ficaram dentro do intervalo de 1,6 a 2,0, indicando boa qualidade de todas as amostras.

Figura 2 - Efeito de 5 diferentes quantidades iniciais de tecido bovino (mg) em relação a concentração média e coeficiente de variação ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) das extrações de DNA no protocolo “CTAB”.



Fonte: os autores.

A partir dos resultados do tratamento A, a quantidade de 120 mg de tecido bovino foi utilizada nas extrações de DNA por “CTAB” e “*Salting out*” na realização do tratamento B.

Os dados obtidos na realização do tratamento B estão apresentados na Tabela 3. Pode-se observar que houve pouca variação entre as variáveis concentração de DNA e rendimento das amostras, sendo os maiores valores médios para o volume de 300 μL de solução tampão de extração no protocolo “CTAB” e valores intermediários para este volume no protocolo “*Salting out*”. O coeficiente de variação apresentou valor mais baixo e intermediário, respectivamente para o protocolo “CTAB” e “*Salting out*”, para 300 μL de tampão. E as médias do índice de pureza ficaram no intervalo de 1,4 a 2,0, indicando boa qualidade de todas as amostras.

Desta forma, o volume de 300 μL de solução tampão de extração foi considerado o mais adequado para ser utilizado em ambos os protocolos, considerando-se também a questão do consumo desta solução por ser este o menor volume entre os testados.

Tabela 3 - Média dos resultados obtidos (6 repetições) no tratamento B, nos dois protocolos.

Protocolo	Quantidade tampão (µL)	Concentração DNA (µg/ µL)	Rendimento (µg/mg)	Pureza	Coefficiente variação (%)
"CTAB"	300	1,06	0,88	1,76	6,68
	500	0,91	0,75	1,79	10,39
	700	0,92	0,77	1,51	12,30
"Salting out"	300	0,89	0,74	1,86	12,18
	500	0,95	0,76	1,79	11,00
	700	0,72	0,60	1,80	24,33

No tratamento C, a partir dos resultados dos tratamentos A e B, utilizou-se 120 mg de tecido animal e 300 µL de solução tampão de extração. A avaliação dos resultados indicou que a padronização da quantidade de sobrenadante retirado na etapa de purificação do DNA (tratamento C) não diferiu muito do estabelecido nos protocolos (padrão), para as variáveis avaliadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Média dos resultados obtidos (6 repetições) no tratamento C utilizando o os dois protocolos.

Protocolo	Tratamento	Concentração DNA (µg/ µL)	Rendimento (µg/mg)	Pureza	Coefficiente variação (%)
"CTAB"	C	0,75	0,61	2,00	21,90
	Padrão	0,88	0,72	1,77	20,39
"Salting out"	C	0,73	0,51	1,77	12,66
	Padrão	0,86	0,70	2,09	23,16

Através deste projeto de pesquisa foi possível estabelecer algumas modificações nos dois protocolos de extração de DNA utilizados. Os valores de 120 mg de tecido (tratamento A) e 300 µL de solução tampão de extração (tratamento B) foram adotados para a prática do laboratório, enquanto o volume de sobrenadante (fase aquosa com DNA) transferido durante a etapa de purificação (tratamento C) não foi alterado com relação ao recomendado nos protocolos iniciais.

3. Efeito da temperatura na conservação de DNA extraído de tecido animal

O terceiro projeto visou avaliar a taxa de degradação de amostras de DNA extraídas de músculo bovino, submetidas a diferentes temperaturas de conservação. As amostras foram analisadas quanto a concentração e qualidade do DNA extraído.

A primeira etapa envolveu a comparação de extrações de DNA mantidas em baixas temperaturas com amostras à temperatura ambiente. Neste projeto amostras de 200 mg de tecido muscular bovino foram submetidas a quatro tratamentos: temperatura ambiente, geladeira (4°C), freezer (-20°C) e ultrafreezer (-80°C). O DNA foi extraído no primeiro dia e após 30, 60 e 90 dias, com seis repetições em cada, utilizando os protocolos "CTAB" e "Salting out".

Na análise dos resultados, foram observadas correlações negativas significativas ($p < 0,05$) entre a concentração do DNA e o tempo de conservação. Os valores para o protocolo "CTAB" foram: temperatura ambiente ($r = -0,685$), 4°C ($r = -0,635$), -20°C ($r = -0,508$) e -80°C ($r = -0,491$). No protocolo "Salting out": temperatura ambiente ($r = -0,607$), 4°C ($r = -0,551$), -20°C ($r = -0,805$) e -80°C ($r = -0,545$).

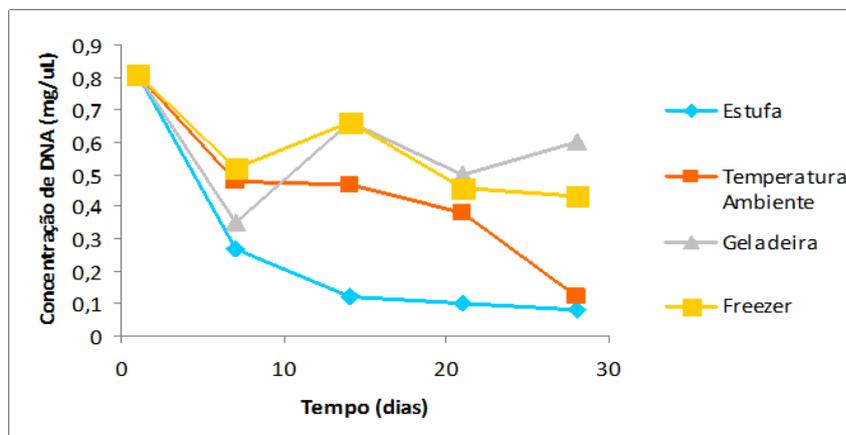
Após 30 dias, a diminuição na concentração do DNA das amostras mantidas a temperatura ambiente foi de 86% no protocolo "CTAB" e 71% no protocolo "Salting out", a 4°C de 21% no "CTAB" e 15% no "Salting out", a -20°C de 56% no "CTAB" e 58% no "Salting out" e a -80°C de 50% no "CTAB" e 57% no "Salting out". Após 90 dias, a redução da concentração de DNA foi de 90% no "CTAB" e 61% no "Salting out", nas amostras à temperatura ambiente, enquanto que a 4°C, -20°C e -80°C a redução foi, respectivamente, de 71%, 53% e 44% no "CTAB" e de 80%, 72% e 61% no "Salting out". As diferenças na concentração de DNA obtidas entre os 30 e 90 dias não foram significativas ($p > 0,05$), provavelmente devido à alta variação nos resultados dentro dos tratamentos.

Os resultados demonstraram que a degradação do DNA pode ser reduzida através da utilização de baixas temperaturas, sendo a conservação das amostras a -80°C a que alcançou o melhor resultado. No maior período em conservação, 90 dias, a redução da concentração de DNA foi de 56% em extrações realizadas com o uso do protocolo "CTAB" e 40% como o uso do protocolo "Salting out". Com relação aos índices de pureza, o protocolo "CTAB" apresentou os maiores valores em comparação ao protocolo "Salting out", indicando a sua melhor adequação aos tratamentos avaliados.

Na segunda etapa comparou-se a degradação de amostras mantidas sob refrigeração e em temperatura elevada. Amostras de 200 mg de tecido muscular bovino foram submetidas a quatro tratamentos, temperatura ambiente, estufa (45°C), geladeira (4°C) e freezer (-20°C). O DNA foi extraído no primeiro dia e após 7, 14, 21 e 28 dias, com seis repetições cada, utilizando-se somente o protocolo “CTAB”.

Os resultados desta etapa podem ser observados na Figura 3. Na análise dos dados obtidos, observou-se uma correlação negativa significativa ($p < 0,05$) entre o dia da extração e a concentração do DNA nas amostras a temperatura ambiente ($r = -0,734$), 45°C ($r = -0,728$) e -20°C ($r = -0,49$), enquanto que, para as amostras mantidas a 4°C, a correlação não foi significativa ($r = -0,108$). Avaliando as extrações realizadas aos 28 dias (maior tempo de conservação), a redução da concentração de DNA foi significativamente diferente entre os tratamentos ($H = 13,42$, $p < 0,05$), alcançando 85% de degradação nas amostras a temperatura ambiente, 90% das amostras a 45°C, 26% a 4°C e 47% a -20°C.

Figura 3 - Variação na concentração de DNA extraído de amostras mantidas em diferentes temperaturas.



Os resultados demonstram que embora as baixas temperaturas tenham reduzido a degradação do DNA em relação às amostras mantidas na estufa e à temperatura ambiente, esta estratégia não foi totalmente eficaz para a conservação das amostras.

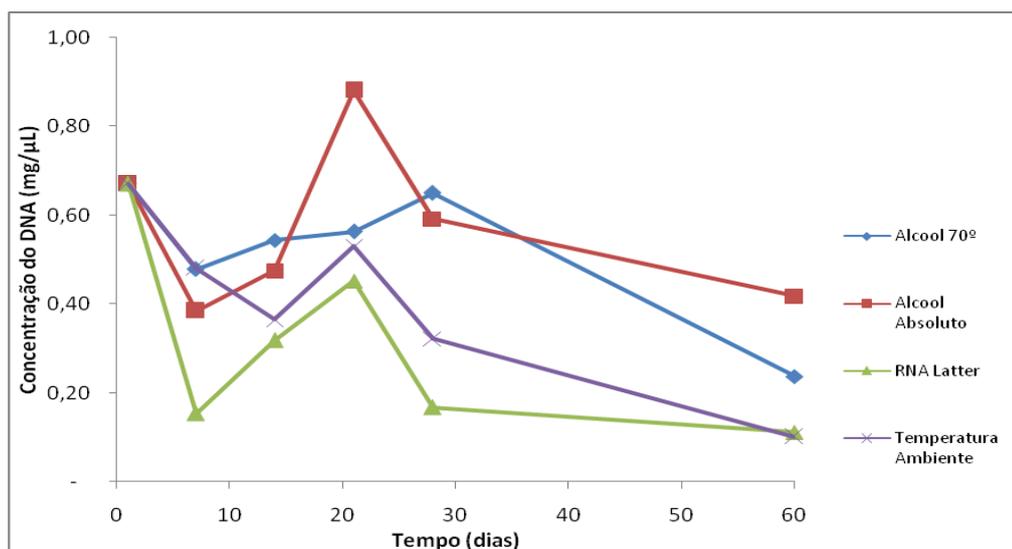
4. Efeito de diferentes conservantes na taxa de degradação do DNA extraído de tecido animal

O objetivo do quarto projeto de pesquisa foi analisar o efeito, ao longo do tempo, de diferentes conservantes sobre a degradação do DNA extraído de amostras de tecido animal, utilizando o protocolo “CTAB”.

Amostras de 200 mg de tecido muscular bovino foram submetidas a quatro tratamentos de conservação: sem conservantes à temperatura ambiente (A) e etanol 70% (B), etanol absoluto (C) e conservante *RNAIatter* (*Ambion*, D), mantidos em geladeira (4°C). O DNA foi extraído no primeiro dia e após 7, 14, 21, 28 e 60 dias de conservação, com 6 repetições por dia para cada um dos 4 tratamentos.

Neste trabalho, observou-se redução da concentração de DNA ao longo do tempo nas amostras sem conservantes e mantidas à temperatura ambiente (A), sendo que após 60 dias, maior tempo em conservação, a redução foi de 85% em relação à concentração de DNA inicial (Figura 4). Aos 60 dias, nos tratamentos com conservantes, a redução foi de 37% nas amostras conservadas em etanol absoluto, 65% nas amostras em etanol 70% e 83% nas amostras em “*RNAIatter*” (Figura 4).

Figura 4 - Concentração de DNA extraído de tecido bovino, no primeiro dia e após 7, 14, 21, 28 e 60 dias mantidos sem conservantes e em temperatura ambiente e em etanol absoluto, etanol 70% e “*RNAIatter*”, a 4°C.



Comparando-se os valores médios de concentração de DNA nas extrações e o tempo de conservação, as amostras mantidas sem conservantes e a temperatura

ambiente, apresentaram correlação negativa significativa ($r: -0,594$, $p < 0,05$). Igualmente, uma correlação negativa significativa ($p > 0,05$) foi observada nas amostras em etanol 70% ($r: -0,514$) e em “*RNAIatter*” ($r: -0,418$). Entretanto, a correlação não foi significativa quando utilizado etanol absoluto ($r: -0,162$, $p > 0,05$).

De um modo geral, os melhores resultados foram obtidos de extrações realizadas a partir de amostras mantidas em etanol absoluto, sendo esta considerada a melhor estratégia de preservação de tecido bovino por um maior tempo de conservação.

CONCLUSÕES

As diversas aplicações da Biotecnologia enfatizam a necessidade de se obter DNA, por protocolos de extração, em concentrações adequadas, íntegro e com bom índice de pureza. Entretanto, as extrações podem ser afetadas por diferentes fatores relativos a realização da técnica, tal como, o protocolo utilizado, o tipo e a quantidade de amostra inicial e mesmo a forma de conservação das amostras antes das extrações, incluindo a temperatura e conservantes em que as amostras biológicas são mantidas, caso necessário (SEUTIN *et al.* 1991; BAREA *et al.*, 2004; SOLLÉRO *et al.* 2004; SIMONATO *et al.*, 2007; ZIMMERMANN *et al.* 2008; SCORSATO e TELLES, 2011).

Os quatro projetos desenvolvidos pela linha de pesquisa, descritos neste artigo, alcançaram os objetivos propostos, de avaliar variáveis relevantes relativas à técnica de extração de DNA. Adicionalmente, propiciaram aprendizado ao grupo, especialmente contribuindo com a formação técnica dos envolvidos na sua realização.

No desenvolvimento do primeiro projeto de pesquisa, o uso do protocolo “CTAB” (modificado) resultou em extrações de DNA com maior concentração e qualidade. Este resultado é devido, especialmente, pelo fato deste protocolo ter sido desenvolvido (DOYLE e DOYLE, 1987) e ser utilizado principalmente para tecidos vegetais, tal como citado por Molinari e Crochemore (2001) e Santos e Araújo (2017). As extrações apresentaram menor degradação e oxidação de DNA, face a adição do reagente β -mercaptoetanol (anti-oxidante) na solução de lise no momento da extração, e menor contaminação por proteínas, devido ao uso de clorofórmio, um desnaturante proteico forte. O protocolo “*Salting out*”, por sua vez, foi desenvolvido e

é eficaz para fluidos, como sangue, mas não apresentou tão bons resultados para folhas. As extrações apresentaram rendimento intermediário e contaminação por proteínas em algumas amostras, sendo que neste protocolo a eliminação das proteínas se dá por alta concentração salina. Adicionalmente, as amostras de DNA exibiram um pouco de degradação, talvez pelo fato do reagente β -mercaptoetanol já estar na solução tampão de extração. O protocolo "Sílica" corresponde a um *kit* comercial desenvolvido por empresa gaúcha de análises em biologia molecular, especialmente para fluidos (plasma). Este *kit* não resultou em boas extrações de DNA a partir de folhas. A hipótese é que as moléculas de DNA não tenham sido liberadas totalmente das partículas de sílica devido a dificuldades físicas, como compostos de sustentação das plantas. A análise em espectrofotômetro indicou concentração muito pequena e com índice de pureza inadequado, em grande parte das amostras.

No projeto 2, a opção foi utilizar os protocolos "CTAB" e "Salting out" e avaliar a quantidade de tecido inicial, o volume da solução tampão de extração e o volume da fase aquosa com DNA (sobrenadante), recuperada durante a etapa de purificação, para extração de DNA a partir de tecido animal (músculo bovino). Ao analisar a quantidade de amostra inicial, observou-se que, apesar do aumento na concentração de DNA obtido, o excesso de tecido pode afetar o rendimento e aumentar a variação nos resultados. Desta forma, os melhores resultados foram para a quantidade inicial de 120 mg de músculo bovino, em ambos protocolos, entretanto o intervalo entre 120 e 250 mg pode ser utilizado com bons valores de extração. Na avaliação do volume da solução tampão de extração, o aumento desta em relação a quantidade de tecido inicial não resultou em melhores resultados nas amostras de DNA obtidas, sendo o menor volume, 300 μ L, considerado o mais adequado para ser utilizado nos dois protocolos, levando-se também em conta a questão do consumo desta solução. Quanto a quantidade de sobrenadante recuperada na etapa de purificação do DNA indica-se o uso do volume padrão descrito nos dois protocolos, por não ter sido observado diferença considerável nos resultados.

Os projetos 3 e 4 envolveram a análise da conservação das amostras de tecido animal, músculo bovino, até o momento da extração. O projeto 3 avaliou temperaturas de conservação das amostras e o projeto 4, o uso de conservantes. Estes projetos basearam-se no fato de que diversos fatores resultam na degradação

dos tecidos biológicos, seja pela demora entre a coleta e o processamento das amostras no laboratório ou também devido ao tempo transcorrido após a morte do indivíduo, no caso de análises forenses em cadáveres em avançada decomposição (SALEHI e NAJAFI, 2014). Desta forma, quanto maior o tempo transcorrido entre a obtenção das amostras de tecidos e o seu processamento, maior a possibilidade de que os ácidos nucléicos presentes nestes sejam degradados, resultando na impossibilidade da obtenção de DNA adequado para as análises moleculares (FORAN, 2006). Após a coleta, a degradação das amostras ao longo do tempo resulta em perdas no rendimento e na pureza do DNA, constituindo um fator limitante para a o sucesso das análises (ITANI *et al.*, 2011; MICHAUD e FORAN, 2011; KARNI *et al.* 2013).

Assim, a conservação das amostras biológicas é, portanto, um fator essencial para a realização das análises moleculares de maneira eficiente, existindo diferentes processos empregados para este fim, incluindo além da redução da temperatura das amostras, o emprego de fixadores e de conservantes que impedem a degradação específica dos ácidos nucléicos (SCORSATO e TELLES, 2011). Destaca-se ainda que, embora o DNA seja uma molécula reconhecida como estável (KARNI *et al.* 2013), sendo possível sua detecção em amostras arqueológicas de elevada idade (HAGELBERG *et al.* 2015), Foran (2006) já havia observado a elevada degradação do DNA em tecidos animais mantidos sob alta temperatura por uma semana, indicando o congelamento como controle. Naia (2014), ao analisar a concentração do DNA em amostras de tecidos humanos, concluiu que existe uma relação entre o intervalo *post mortem*, com aumento da degradação com o passar do tempo, mas com influência de fatores como temperatura, umidade e o tamanho da amostra.

A redução da temperatura é uma estratégia muito utilizada para a diminuição da degradação de materiais biológicos, sendo recomendada para a manutenção de amostras biológicas entre a coleta e a análise (MELO *et al.* 2010). Os dados obtidos no projeto 4 demonstraram que, embora uma redução na taxa de conservação de músculo bovino tenha sido obtida para temperaturas de 4°C (geladeira), a eficácia da redução da temperatura na conservação das dos tecidos animais não é total. Após 30 dias, observou-se perda de até 57% de DNA, em amostras mantidas a -80°C (ultrafreezer). O mesmo foi relatado por ALMEIDA *et al.* (2009), que verificaram a ocorrência de degradação do DNA em amostras mantidas a baixas temperaturas, tendo sido indicada a possibilidade da quebra do DNA mantido em freezer, o que

está de acordo com as recomendações de manuais de conservação de amostras (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2005).

Quanto ao uso de conservantes, salienta-se que é preciso verificar a aplicabilidade destes em diferentes amostras e avaliar a sua vantagem técnica e financeira sobre os demais procedimentos (MUTTER *et al.*, 2004; GELBART *et al.*, 2012). Os resultados do projeto 4 indicaram considerável redução na taxa de degradação de DNA nas amostras mantidas em álcool etílico 70% e absoluto, com melhores resultados para o último. Os resultados observados com o uso do conservante “*RNAIatter*” não foram melhores dos obtidos de amostras a temperatura ambiente e sem uso de conservantes.

Em resumo, os projetos sobre extração de DNA desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do NIEB do IFRS-POA indicaram que: entre os protocolos comparados para extração o mais adequado foi o “CTAB” (DOYLE e DOYLE, 1987), especialmente para vegetais; as quantidades de 120 mg de tecido e 300 µL de solução tampão de extração são bons valores para serem utilizados nos protocolos “CTAB” e “*salting out*” para extração de DNA de músculo bovino; as baixas temperaturas (4°C) ou etanol absoluto são as melhores estratégias, entre as testadas, para a conservação de amostras de músculo bovino até o momento da extração.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G.C.; MONTAGNER, F.; ENDO, M.S.; GOMES, B.P.F.A. **Detecção da degradação do DNA genômico extraído através da espectrofotometria e da reação de PCR**. 11º Seminário de Extensão UNIMEP, Piracicaba. 2009.

BAREA, J.A.; PARDINI, M.I.M.C.; GUSHIKEN, T. **Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR)**. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 26 (4): 274-281. 2004.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E.; VAN DER NOORDAA, J. **Rapid and simple method for purification of nucleic acids**. *Journal Clinical Microbiology*, 28: 495–503. 1990.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **MM13-A—Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline**. CLSI document MM13-A. 2005.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** *Phytochemical Bulletin*, 9 (1): 11 – 15. 1987.

FORAN, D.R. (2006) **Relative Degradation of Nuclear and Mitochondrial DNA: An Experimental Approach.** *Journal of Forensic Science* 51 (4): 766-770.

GELBART, T.; GAO, N.; MONDALA, T.S.; KURIAN, S.M.; OLTHOFF, K.M.; ABECASSIS, M.; SALOMON, D.R. **Comparison of RNA, DNA, small RNA (including miRNA) and protein yields from liver biopsy samples using two commercially available tissue preservation reagents: RNALater and AllProtect.** 2012. <http://transplant-genomics.genetics.ucla.edu/files/RNALatervsAllProtectComparison.pdf>.

HAGELBERG, E.; HOFREITER, M.; KEYSER, C. **Ancient DNA: the first three decades.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B.*, 370: 20130371. 2013.

ITANI, M.; YAMAMOTO, Y.; DOI, Y.; MIYAISHI, S. **Quantitative Analysis of DNA Degradation in the Dead Body.** *Acta Medica Okayama*, 65 (5): 299-306. 2011.

KARNI, M.; ZIDON, D.; POLAK, P.; ZALEVSKY, Z.; SHEFI, O. **Thermal Degradation of DNA.** *DNA and Cell Biology*, 32 (6): 298-301. 2013.

MELO, M.R.; MARTINS, A.R.; BARBOSA, I.V.; ROMANO, P.; SHCOLNIK, W. **Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 46 (5): 375-381. 2010

MICHAUD, C.L.; FORAN, D.R. **Simplified Field Preservation of Tissues for Subsequent DNA Analyses.** *Journal of Forensic Science*, 56 (4): 846-852. 2011.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** *Nucleic Acid Research*. 16: 1215. 1988.

MOLINARI, H.B.; CROCHEMORE, M.L. **Extração de DNA genômico de *Passiflora* spp. para análises PCR-RAPD.** *Revista Brasileira Fruticultura*, 23, n.2, 447-450. 2001.

MUTTER, G.L.; ZAHRIEH, D.; LIU, C.; NEUBERG, D.; FINKELSTEIN, D.; *et al.* **Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays.** *BMC Genomics* 5: 88. 2004.

NAIA, M.J.T. **Determinação do Intervalo *Postmortem* através do decréscimo de citrato e DNA em ossos: Influência das condições tropicais.** Dissertação de mestrado em medicina legal. Universidade Católica de Petrópolis. 2014.

SALEHI, Z.; NAJAFI, M. **RNA Preservation and Stabilization.** *Biochemistry and Physiology* 3: 126. 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular cloning. **A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Press, New York. 2001.

SANTOS, E.M.; ARAUJO, R.R. **Testes de comparação de protocolos de extração de DNA e de maceração de tecido de *Platonia insignis* Mart.** (Clusiaceae). *Revista Brasileira Biociências*, Porto Alegre, v. 15, n.4, p. 199-202, out./dez. 2017.

SCORSATO, A.P.; TELLES, J.E.Q. **Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.*, 47 (5): 541-548. 2011.

SEUTIN, G.; WHITE, B.N.; BOAG, P.T. **Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses.** *Canadian Journal of Zoology*, 69 (1): 82-90. 1991.

SIMONATO, L.E.; GARCIA, J.F.; NUNES C.M.; MIYAHARA, G.I. **Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 43 (2): 121-127. 2007.

SOLLÉRO, B.P.; DE FARIA, D.A.; PAIVA, S.R.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; PAIXÃO, D.M. **Método Rápido de Extração de DNA Utilizando CTAB em tecidos musculares de Suínos.** **ZOOTEC2004**, Brasília, DF. 2004.

ZIMMERMANN, J.; HAJIBABAEI, M.; BLACKBURN, D.C.; HANKEN, J.; CANTIN, E.; POSFAI, J.; EVANS JR, T.C. **DNA damage in preserved specimens and tissue samples: a molecular assessment.** *Frontiers in Zoology*, 5: 18. 2008.

Monitoramento terapêutico de antibióticos utilizando dbs – dried blood spots (mancha de sangue seco em papel): uma facilidade na prática clínica

Letícia Vale Scribel

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(leticia.scribel@poa.ifrs.edu.br)

Nadine Bordin Andrigueti

Universidade Feevale – Novo Hamburgo
(nadineba@live.com)

Rafael Linden

Universidade Feevale – Novo Hamburgo
(rafael.linden@feevale.br)

Alexandre Zavascki

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
(azavascki@hcpa.edu.br)

Resumo: A maior preocupação atual relacionada aos antimicrobianos é a resistência bacteriana. Enquanto não surgem novos antibióticos no mercado, o monitoramento terapêutico (MT) é essencial para individualização da terapia antibacteriana e prevenção do surgimento de cepas resistentes. O MT depende do acompanhamento da concentração sanguínea do medicamento, que pode ser obtida através de sangue venoso ou sangue capilar. A coleta de sangue capilar obtida por punção digital é chamada de DBS (do inglês *Dried Blood Spots*, ou mancha de sangue seco em papel) e apresenta vantagens em relação à coleta usual por punção venosa: é menos invasiva, mais estável e requer menor volume de sangue. Assim, permite a realização do MT em pacientes de difícil acesso venoso como idosos, neonatos, bebês e crianças, facilita a rotina de coleta da equipe assistencial e permite a auto coleta. Por fornecer pequenas quantidades de sangue (aproximadamente 50 µL), amostras em DBS são analisadas por métodos altamente sensíveis e precisos como Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em “tandem” (LC-MS/MS).

Palavras-chave: Monitoramento terapêutico; Antibióticos; *Dried Blood Spots*; Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas.

Therapeutic monitoring of antibiotics using dried blood spots: a facility in clinical practice

Abstract: The major current concern regarding antimicrobials is bacterial resistance. While no new antibiotics are on the market, therapeutic monitoring (TM) is essential for antibacterial therapy individualization and prevention of emergence of resistant strains. The TM depends on drug blood concentration monitoring, which can be obtained through venous blood or capillary blood. Capillary blood collection by digital puncture is called DBS (Dried Blood Spots) and has advantages over the usual collection by venipuncture: it is less invasive, more stable and requires less volume of blood. Thus, it allows the accomplishment of TM in patients with difficult venous access such as the elderly, neonates, infants and children, facilitates the care staff routine of collection and allows self-collection. As DBS provides small amounts of blood (approximately 50 μ L), DBS samples are analyzed by the Liquid Chromatography method coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS / MS), which provides results with sensitivity and precision.

Keywords: Therapeutic drug monitoring; Antibiotics; Dried Blood Spots; Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.

INTRODUÇÃO

A resistência microbiana é um dos principais destaques da OMS (Organização Mundial da Saúde). Segundo a OMS, a resistência aos antibióticos é uma das maiores ameaças à saúde global. Pode afetar qualquer pessoa, de qualquer idade em qualquer lugar. Ocorre naturalmente, mas o uso irracional dos antibióticos em humanos e animais está acelerando o processo. Diversas infecções estão se tornando difíceis de tratar, como pneumonia, tuberculose e gonorreia, pois os antibióticos usados estão se tornando menos efetivos. A resistência bacteriana leva ao aumento no tempo de internação, elevação nos custos do tratamento e aumento da mortalidade (OMS, 2018).

O Monitoramento Terapêutico (MT) é uma especialidade clínica multidisciplinar utilizada para otimizar e individualizar a terapia medicamentosa na população em geral ou em populações especiais (MILOSHESKA *et al.*, 2015). Especificamente para os antimicrobianos, o MT tem papel importante na redução ou prevenção de resistência microbiana, bem como na otimização da dosagem de antibióticos já existentes, considerando a falta de alternativa terapêutica em casos de infecções por microrganismos multirresistentes. Para alguns medicamentos, o objetivo é alcançado ao minimizar efeitos adversos ou está relacionado à toxicidade, enquanto que para outros os benefícios são alcançados ao atingir efeitos

terapêuticos desejados especialmente em doses não usuais (PAGE-SHARP *et al.*, 2015; BARLAM *et al.*, 2016).

A individualização da terapia é baseada no perfil farmacocinético (PK) e farmacodinâmico (PD) do paciente, que depende do conhecimento da concentração sanguínea do medicamento após sua administração (RYBAK *et al.*, 2009; KATO *et al.*, 2017). A dosagem do nível sérico dos medicamentos pode ser realizada utilizando sangue venoso ou capilar. A coleta de sangue capilar é realizada por DBS (do inglês *Dried Blood Spots*, ou mancha de sangue seco em papel) e apresenta vantagens em relação à coleta usual por punção venosa por ser menos invasiva, mais estável e por requerer menor volume de sangue. Assim, permite a realização do MT em pacientes especiais, como neonatos, bebês e crianças, facilita a rotina de coleta da equipe assistencial e permite a auto coleta. Uma vez que oferece menor quantidade de amostra, é necessária análise laboratorial mais sensível, facilmente obtida através do método de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em “tandem” (LC-MS/MS) (KEEVIL, 2011; ANTUNES *et al.*, 2016; MAHMOUDI *et al.*, 2014).

Esta revisão da literatura visa apresentar conceitos relacionados ao MT de antibióticos, ao uso da coleta de sangue capilar por DBS e aos métodos utilizados para dosagem das concentrações sanguíneas.

MÉTODOS

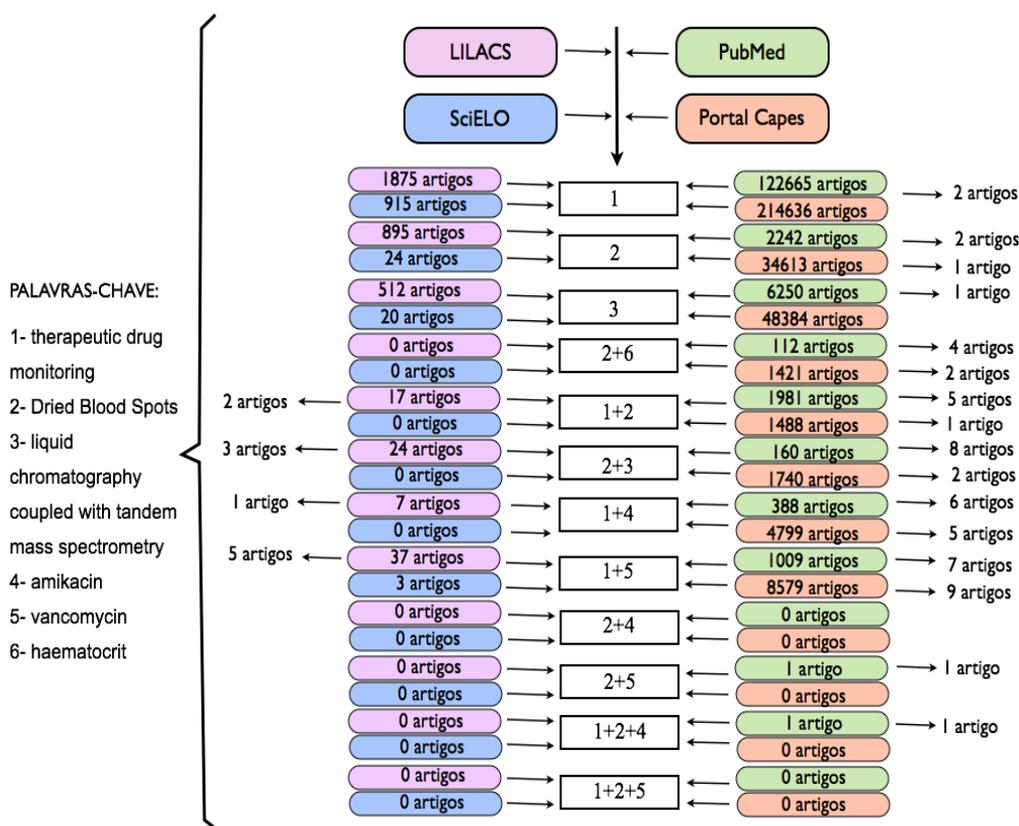
Foi realizada uma revisão narrativa da literatura. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS, SciELO, PubMed e banco de teses da CAPES, priorizando as referências mais recentes. Foram realizadas buscas através dos termos “therapeutic drug monitoring”, “DBS”, “Dried Blood Spots”, “liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry”, “LC-MS/MS”, “haematocrit” e suas combinações. Foram consultadas, também, algumas referências citadas nos artigos encontrados através da busca nas bases de dados relacionadas.

RESULTADOS

A quantidade de publicações encontradas e utilizadas nesta revisão está relacionada de acordo com as bases de dados consultadas conforme a Figura 1.

Figura 1 - Estratégia de busca de referências bibliográficas que contemplam os temas deste estudo e os resultados em número de artigos obtidos. A coluna central indica as palavras-chave e suas combinações, representadas pelos números de 1 a 6 conforme a legenda. As colunas coloridas indicam a quantidade de artigos obtidos de acordo com o site consultado.

As colunas mais externas indicam os artigos consultados nesta revisão.



DISCUSSÃO

Monitoramento Terapêutico

O objetivo principal do MT é a otimização da terapia individualizada. Para alguns medicamentos, este objetivo é alcançado ao minimizar a efeitos adversos ou estão relacionados à toxicidade, enquanto que para outros os benefícios são alcançados ao atingir efeitos terapêuticos desejados especialmente em doses não

usuais. Aqueles que frequentemente produzem toxicidade em doses próximas às indicadas são usualmente monitorados. Sendo o intervalo da concentração sérica alvo estreito, há necessidade da seleção precisa da dosagem do medicamento, bem como seu intervalo de administração. O intervalo terapêutico é a faixa da concentração onde a probabilidade da resposta clínica desejada é relativamente alta e a probabilidade de apresentar toxicidade é relativamente baixa (BURTON *et al.*, 2006).

Estudos recentes sugerem que as doses usuais de antibióticos não atingem os melhores resultados em pacientes críticos devido à sua variabilidade farmacocinética e sua farmacodinâmica alterada. A adaptação da dose é desafiadora devido à imprevisível relação dose-exposição. Conseqüentemente, defende-se a individualização da dosagem do antibiótico. As doses convencionais de muitos antibióticos frequentemente resultam em exposição abaixo ou acima da terapêutica desejada. A otimização da dosagem baseada em princípios PK/PD podem efetivamente melhorar a exposição ao antibiótico. Assim, o MT é a abordagem mais indicada a fim de otimizar e individualizar sua dosagem (PARKER *et al.*, 2015).

Princípios farmacocinéticos e farmacodinâmicos

O MT é baseado em princípios farmacocinéticos e farmacodinâmicos - PK/PD, fazendo-se necessário monitorar a concentração sérica do medicamento em questão (BURTON *et al.*, 2006). O perfil farmacocinético refere-se à concentração de um medicamento no sangue ou nos tecidos relacionada ao tempo, refletindo sua absorção, distribuição, biotransformação e eliminação, ou seja, o caminho que ele faz no organismo. O perfil farmacodinâmico diz respeito às ações farmacológicas e aos mecanismos pelos quais os fármacos atuam, ou seja, os efeitos que os fármacos provocam no organismo. A abordagem PK/PD explora a relação triangular entre a concentração sanguínea do antimicrobiano, a sensibilidade do microrganismo ao antibiótico (medida pela Concentração Inibitória Mínima – CIM) e desfechos clínicos pré-definidos (KATO *et al.*, 2017; PAGE-SHARP *et al.*, 2015; RYBAK *et al.*, 2009).

O perfil farmacocinético é importante para calcular a dose apropriada e a frequência de administração, para ajustar doses nos pacientes e para fazer

comparações entre os vários fármacos. Assim, faz-se necessário monitorar a concentração sanguínea do medicamento em questão. Por questões de factibilidade – custo, disponibilidade de pessoal treinado, adesão da equipe assistencial e do paciente -, não são todos os medicamentos que são monitorados na rotina hospitalar através do perfil farmacocinético individualizado. Assim, são selecionados aqueles que frequentemente produzem toxicidade em doses próximas às indicadas, por exemplo (BURTON *et al.*, 2006). Neste caso, sendo o intervalo da concentração sérica alvo estreito, há necessidade do cálculo mais preciso da dosagem do medicamento, bem como seu intervalo de administração. O intervalo terapêutico é a faixa da concentração onde a probabilidade da resposta clínica desejada é relativamente alta e a probabilidade de apresentar toxicidade é relativamente baixa (BURTON *et al.*, 2006).

Estudos recentes (PARKER *et al.*, 2015) sugerem que as doses usuais de antibióticos não atingem os melhores resultados em pacientes críticos devido à sua variabilidade farmacocinética e sua farmacodinâmica alterada. A adaptação da dose é desafiadora devido à imprevisível relação dose-exposição. Conseqüentemente, defende-se individualizar a dosagem do antibiótico. As doses convencionais de muitos antibióticos frequentemente resultam em exposição abaixo ou acima da terapêutica desejada. A otimização da dosagem baseada em princípios PK/PD podem efetivamente melhorar a exposição ao antibiótico (PARKER *et al.*, 2015).

Métodos de Coleta de Sangue

A análise de medicamentos é normalmente realizada em amostras de soro ou plasma, obtidos por punção venosa. Entretanto, há um crescente interesse em sangue capilar obtido por punção digital utilizando-se uma lanceta automática, colhido em uma matriz de papel filtro, chamada de DBS. Comparada com a coleta convencional de sangue venoso, a coleta em DBS é simples e conveniente proporcionando melhor conforto para o paciente (WILHELM *et al.*, 2014). Além disso, a dosagem da concentração sanguínea de medicamentos depende da disponibilidade de metodologias laboratoriais sofisticadas, disponíveis apenas em centros especializados, com acesso limitado à maioria dos pacientes. Neste contexto, o interesse no uso de DBS vem aumentando, permitindo uma logística simples, estável e barata (ANTUNES *et al.*, 2016).

As vantagens potenciais do uso de sangue capilar são a facilidade de coleta, que eventualmente poderá ser realizada pelo próprio paciente e que poderá ser feita fora do ambiente hospitalar, ou facilitada na ausência de acesso venoso em pacientes internados. Por ser um processo menos invasivo e menos doloroso, é mais aceitável principalmente por crianças e também torna mais rápida e efetiva a coleta da amostra (KEEVIL, 2011; ANTUNES *et al.*, 2016). Outras vantagens do uso de DBS são a facilidade no transporte, o armazenamento e a maior estabilidade, permitindo a obtenção de amostras em situações onde a coleta de sangue ou plasma não está disponível (PAGE-SHARP *et al.*, 2015).

Amostras de sangue capilar em DBS têm sido utilizadas no diagnóstico de erros inatos do metabolismo e na detecção e quantificação de HIV, vírus da hepatite B e plasmódios em ambientes de pesquisa. A dosagem da concentração de medicamentos em DBS representa um novo método de superar dificuldades como a necessidade de múltiplas coletas de sangue em neonatos e crianças, onde a coleta de grandes volumes de sangue poderá resultar em efeitos hemodinâmicos adversos (PAGE-SHARP *et al.*, 2015).

Pequenos volumes de sangue (10 a 20 μ L) puncionados da ponta do dedo ou do calcanhar podem ser coletados em série e impregnados em papel filtro, armazenados com um agente dessecante, sem necessidade de centrifugar o sangue total e de congelar as respectivas frações do sangue (PAGE-SHARP *et al.*, 2015).

Apesar das vantagens citadas acima, poucos estudos têm demonstrado validação experimental detalhada em humanos que permita o uso de DBS para dosagem da concentração sanguínea de medicamentos (PAGE-SHARP *et al.*, 2015).

Apesar das inúmeras vantagens da coleta por DBS em relação à punção venosa, algumas desvantagens no uso de DBS devem ser consideradas: a auto coleta não está livre de contaminação, e o uso de dados a partir de DBS no MT requer extensa validação clínica, uma vez que o sangue capilar pode apresentar diferentes concentrações em relação ao sangue venoso. Observa-se, ainda, que a variação do hematócrito - Hct - afeta o volume de sangue fixado no papel filtro (ANTUNES *et al.*, 2016). A Tabela 1 resume as principais vantagens e desvantagens da coleta de DBS.

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens da coleta de DBS comparado à coleta de sangue venoso.

Vantagens	Desvantagens
- coleta fácil e minimamente invasiva: o paciente pode fazer a coleta em casa, sem necessidade de coletador profissional. Por ser mais conveniente, facilita para cálculo da área sob a curva de concentração x tempo.	- a concentração capilar pode ser diferente da concentração venosa: o sangue em DBS consiste de células sanguíneas, plasma e fluido intersticial, e o sangue venoso é centrifugado e tem as células sanguíneas separadas do soro/plasma.
- é requerido pequeno volume de sangue: ideal para crianças e neonatos.	- não há amostra reserva.
- a maioria dos analitos são mais estáveis em DBS quando comparados com amostras congeladas.	- se não houver treinamento, a coleta pode não ser bem-sucedida.
- transporte e armazenamento convenientes: seguro em relação à contaminação de quem o manipula, pode ser enviado por sistemas postais tradicionais sem tratamentos especiais; todas as proteínas, patógenos e enzimas são inativadas no papel e o crescimento bacteriano é prevenido.	- é necessária extensa validação: avaliar o impacto da variação do hematócrito no tamanho da mancha e na homogeneidade da amostra. Avaliar o tipo de papel bem como diferentes fabricantes.
- menos dolorosa: mais conveniente para neonatos e crianças, bem como pacientes com flebite.	- por oferecer menor volume de sangue, requer técnica analítica mais sensível.
- reduz o número de passos pré-analíticos: não requer refrigeração nem centrifugação	

Fonte: WILHELM *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2014; ENDERLE *et al.*, 2016.

A análise de amostras por DBS, quando comparada com amostras de sangue e plasma, é relativamente nova e há pouca informação disponível na validação do método (WILHELM *et al.*, 2014). Em revisão publicada em 2014 por Wilhelm e col., apenas os antimicrobianos ertapenem, linezolida, metronidazol e moxifloxacina foram testados para o método de DBS.

Garantia da Qualidade em amostras de DBS

Para garantir resultados significativos, é essencial um controle de qualidade adequado em testes para o MT. Diversas variáveis pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas influenciam a análise e devem ser consideradas ao desenvolver e validar novas técnicas de DBS (ANTUNES *et al.*, 2016).

A escolha da matriz é importante pois influencia na recuperação da amostra, na interação da matriz com o sangue, na estabilidade do analito, na análise cromatográfica, na influência do Hct e no volume de sangue absorvido. Os papéis se diferenciam em sua composição, espessura e resistência ao espalhamento do sangue. A matriz mais comum em análises por DBS é o papel de celulose. Existem dois tipos de cartões de papel disponíveis comercialmente: os quimicamente tratados e os não tratados (ANTUNES *et al.*, 2016; SHARMA *et al.*, 2014; WILHELM *et al.*, 2014).

Os cartões não tratados quimicamente mais comumente utilizados são Whartman 903® e Ahlstrom 226®, ambos registrados no FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001). Os cartões que passam por tratamento químico visam a lise celular, a inativação de patógenos e a desnaturação de enzimas e outras proteínas. Os mais utilizados são Whartman FTA®, FTA Elute®, FTA DMPK-A®, e FTA DMPK-B® (ANTUNES *et al.*, 2016; Shama, 2014; WILHELM *et al.*, 2014). Encontra-se disponível uma matriz de papel cuja base não é celulose, e não é tratada quimicamente. Wilhelm e col. e Antunes e col. citam essa matriz como alternativa aos cartões de celulose pois sofre menos influência do Hct e menor interferência na análise por LC-MS/MS por não conter celulose.

A fim de obter manchas de sangue em papel filtro reprodutíveis, o Forum Europeu de Bioanálises (European Bioanalysis Forum - EBF) estabeleceu, em 2011, as Boas Práticas de Coleta de Mancha de Sangue (Good Blood-Spotting Practices - GBSP) (TIMMERMAN *et al.*, 2011), com atualização em 2013 (TIMMERMAN *et al.*, 2013). As orientações visam padronizar os procedimentos pré-analíticos a fim de evitar potenciais fontes de erro como sobreposição de manchas ou borrões, pouco volume de sangue, aplicação de múltiplas gotas, e contaminação resultante de anestésico tópico, desinfetantes ou manipulação do medicamento antes da coleta (ANTUNES *et al.*, 2016). As recomendações para o procedimento de coleta estão listadas no Quadro 1 e sua ilustração está representada pela Figura 2.

Quadro 1 - Recomendações para o procedimento de coleta de sangue capilar em manchas de papel (ANTUNES *et al.*, 2016; SHARMA *et al.*, 2014).

1. Evitar qualquer contato com a área de coleta da matriz de papel.
2. Se as mãos do paciente estiverem frias, massagear ou aquecer o sítio da coleta a fim de estimular o fluxo sanguíneo local.
3. Higienizar o sítio da punção com álcool isopropílico 70%.
4. Utilizar lanceta estéril e descartável para puncionar o centro da ponta do dedo médio ou anelar.
5. Descartar a primeira gota de sangue pois contém maior quantidade de fluido tecidual.
6. Posicionar cuidadosamente o papel embaixo do dedo e permitir que a gota caia por gravidade. O dedo do paciente nunca deve encostar no papel.
7. Coletar até 5 gotas (média de 50 μ L). Para estimular o fluxo sanguíneo, ordenhar gentilmente a mão a partir do punho até a base do dedo, evitando apertar o dedo. Não sobreponha as gotas para evitar concentração da amostra.
8. Deixar a mancha de sangue secar por 3 a 4 horas em posição horizontal, permitindo que os dois lados da matriz esteja em contato com o ar. Evitar tocar a mancha de sangue e impedir que a mesma entre em contato com superfícies enquanto ainda estiver úmida. Evitar exposição ao sol, poeira, ou insetos pois podem comprometer sua integridade.
9. Armazenar a matriz em sacos plásticos contendo dessecante, a temperatura ambiente, refrigerado ou congelado, dependendo da estabilidade do analito.

Figura 2 - Ilustração do procedimento de coleta de sangue capilar em manchas de papel. A) Punção digital com lanceta estéril. B) Permitir que a gota de sangue caia sobre o papel, sem encostar o dedo.



A)



B)

Influência do Hematócrito em amostras de DBS

Entre os fatores que influenciam na difusão do sangue no papel filtro, o Hct é identificado como o parâmetro mais importante, podendo impactar na validação dos resultados gerados pelo método de DBS. A variação do Hct pode afetar a formação da mancha, o tamanho da mancha, o tempo de secagem, a homogeneidade, a recuperação do analito, a robustez e reprodutibilidade das análises. Existem algumas estratégias a fim de evitar ou minimizar a influência do hematócrito no método de DBS, como analisar a mancha de sangue inteira, eliminando as variações de espalhamento e homogeneidade, e a estratégia mais promissora: medir os níveis de potássio, cujas concentrações estão relacionadas diretamente com o Hct, permitindo a consequente correção dos resultados analíticos (ANTUNES *et al.*, 2016; WILHELM *et al.*, 2014; den BURGER *et al.*, 2015; VU *et al.*, 2011).

Métodos Utilizados para Dosagem de Fármacos em Amostras de DBS

No laboratório, um disco de diâmetro conhecido é cortado da mancha de sangue do papel, representando um volume fixo do sangue absorvido. Depois da extração, o analito é mensurado com técnica analítica (ENDERLE *et al.*, 2016; WILHELM *et al.*, 2014).

Apesar das vantagens descritas, o uso de DBS é um desafio analítico em função da pequena quantidade de sangue (5 - 50 μL) e da complexidade que amostras de DBS representam. Por isso, a análise de amostras de DBS requer técnicas analíticas sensíveis e caras (ENDERLE *et al.*, 2016; ANTUNES *et al.*, 2016). O custo inicialmente mais elevado em relação às técnicas usualmente utilizadas – como o imunoensaio – torna-se vantajoso no balanço financeiro, pois a otimização da terapia microbiana a partir da coleta por DBS reflete em economia, considerando a redução do tempo de tratamento e antecipação da alta hospitalar.

Devido a sua alta sensibilidade e seletividade, métodos de Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry* - MS) associados à separação cromatográfica têm sido a ferramenta analítica predominante em análises de DBS (ANTUNES *et al.*, 2016; KEEVIL, 2011). Há aproximadamente 20 anos, a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em “tandem” (LC-MS/MS) começou a ser utilizada na dosagem de analitos a partir de sangue capilar coletado através de gota de sangue seco em papel, ou DBS - Dried Blood Spots. A introdução da LC-MS/MS permitiu o

desenvolvimento de metodologias de dosagem usando microquantidades de sangue com excelente sensibilidade e precisão (KEEVIL, 2011).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC ou CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE) é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis. Está entre as principais técnicas de separação, especialmente em análise de substâncias presentes em matrizes complexas como fluidos biológicos. Apesar de ser excelente quando o objetivo é a separação de compostos, necessita de outra técnica confirmatória quando há necessidade da confirmação da identidade química do analito. Assim, a espectrometria de massas (MS) é a técnica que melhor informa as características estruturais necessárias para sua identificação. O acoplamento entre HPLC e MS combina as vantagens da cromatografia, como a alta seletividade e a eficiência de separação, com as vantagens da espectrometria de massas, como a obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade. Assim, obtém-se uma ferramenta analítica versátil e de grande potencial para análises qualitativas e quantitativas: a LC/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (CHIARADIA *et al.*, 2008; LANÇAS, 2009).

Espectrometria de Massas - *Mass Spectrometry* - MS

A MS é baseada na medida de átomos e moléculas para determinar suas massas moleculares. Para isso, aplica-se carga nas moléculas de interesse e então se mede como a trajetória dos íons resultantes respondem, sob vácuo, a várias combinações de campos elétricos e magnéticos (LANÇAS, 2009).

No espectrômetro de massa (EM), a amostra é introduzida em um “inlet” (dispositivo para introdução da amostra) e direcionada para uma fonte de ionização. No caso do acoplamento da MS com a HPLC, é usado um cromatógrafo líquido como fonte de introdução da amostra no EM. Assim, os picos cromatográficos gerados pela HPLC são individualmente introduzidos na fonte de ionização do EM gerando íons a serem posteriormente separados no analisador e direcionados para a detecção e quantificação. Um software acoplado ao analisador efetua os cálculos e gera os espectros de massas (LANÇAS, 2009).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência associada à Espectrometria de Massas – LC/MS

O acoplamento entre as técnicas de HPLC e MS - LC/MS - traz benefícios especialmente devido às novas exigências de melhora na sensibilidade dos métodos e à exigência de maiores critérios para identificação de compostos de interesse na área ambiental, saúde, forense, alimentos e outras (LANÇAS , 2009; MCMASTER, 2005).

A Espectrometria de Massas em “tandem” (MS/MS), ou seja, em sequência, é uma técnica espectrométrica que, ao invés de utilizar apenas um analisador de massas para separar os íons gerados na fonte de ionização, utiliza dois estágios de espectrometria de massas, no qual um deles é usado para isolar o íon de interesse e o outro é usado para estabelecer uma relação entre este íon de interesse isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida. Acoplada à cromatografia líquida, a MS/MS, ou seja, a LC-MS/MS é amplamente empregada na detecção de microquantidades de compostos em matrizes complexas, uma vez que possibilita um aumento na detectabilidade e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz, além de fornecer maior quantidade de informação estrutural (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Validação da técnica de coleta de sangue por DBS

Conforme as diretrizes publicadas pelo FDA e pela Agência Europeia de Medicamentos (EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMA), a validação de qualquer método bioanalítico de quantificação de analitos inclui seletividade, acurácia, precisão, recuperação (eficiência da extração), calibração, sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade (FDA, 2013; EMA, 2011). Entretanto, conforme a recomendação do European Bioanalysis Forum (EBF) (TIMMERMAN *et al.*, 2011), a validação do método de DBS requer a análise de parâmetros específicos como a influência do hematócrito, da hemólise e do uso de anticoagulante - se for o caso -, a homogeneidade da amostra, o preparo de amostras de calibração e de controle de qualidade, diluição das amostras e o efeito do tipo de matriz (papel filtro). Segundo o EBF, também devem ser consideradas as Boas Práticas de Coleta, o volume da mancha de sangue e o tamanho do ponto perfurado da mancha de sangue utilizada

na análise, homogeneidade da mancha de sangue e o uso de múltiplas amostras da mesma mancha (TIMMERMAN *et al.*, 2011).

A validação clínica do método de DBS é essencial para sua implementação, e deve ser realizada comparando seus resultados com as concentrações medidas a partir de amostras de plasma (ENDERLE *et al.*, 2016). As diretrizes publicadas pelo EMA e pelo Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2002), bem como o artigo publicado por Linnet recomenda o uso de pelo menos 40 pares de amostras como base para a análise estatística para comparação de dois métodos, sendo a análise feita por regressão linear (EMA, 2011, CLSI, 2002, LINNET, 1999).

CONCLUSÕES

Segundo a Organização Mundial da Saúde OMS, a resistência aos antimicrobianos é um problema de saúde pública que ultrapassa fronteiras. A falta de alternativas aos antibióticos comercializados atualmente requer a otimização da terapia, obtida a partir de estudos PK/PD. O MT é realizado a partir da dosagem dos níveis sanguíneos do antimicrobiano em questão, e o procedimento de coleta de sangue do paciente é determinante para que o MT seja viável. Assim, um método que facilite a rotina assistencial e que proporcione maior conforto para o paciente favorece de forma inquestionável a individualização da terapia medicamentosa através do MT. A partir do conhecimento dos níveis séricos do antibiótico, é possível otimizar a dose, visando diminuir o tempo de tratamento e conseqüentemente o custo da internação hospitalar, reduzir o risco do surgimento de cepas resistentes, bem como proporcionar maior conforto para o paciente.

REFERÊNCIAS

ANTUNES MV, CHARÃO MF, LINDEN R. **Dried blood spots analysis with mass spectrometry**: Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring. *Clinical Biochemistry*. 2016 Sep;49(13-14):1035-46.

BARLAM TF, COSGROVE SE, ABBO LM, MACDOUGALL C, SCHUETZ AN, SEPTIMUS EJ, SRINIVASAN A, DELLIT TH, FALCK-YTTER YT, FISHMAN NO, HAMILTON CW, JENKINS TC, LIPSETT PA, MALANI PN, MAY LS, MORAN GJ, NEUHAUSER MM, NEWLAND JG, OHL CA, SAMORE MH, SEO SK, TRIVEDI KK. **Executive Summary:** Implementing an Antibiotic Stewardship Program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Clinical Infectious Disease*. 2016 May 15;62(10):1197-202.

BURTON ME, SHAW LM, SCHENTAG JJ, EVANS WE, eds. **Applied Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**. Fourth edn. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2006.

CHIARADIA MC, COLLINS CH, JARDIM ICSF. **O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos**. *Química Nova*. 2008; 31(3): 623-636.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples: Approved Guideline, 2° ed., 2002**.

den BURGER JC, WILHELM AJ, CHAHBOUNI AC, VOS RM, SINJEWEL A, SWART EL. **Haematocrit corrected analysis of creatinine in dried blood spots through potassium measurement**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015 Jan; 407(2):621-7.

ENDERLE Y, FOERSTER K, BURHENNE J. **Clinical feasibility of dried blood spots: Analytics, validation, and applications**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016 Oct 25; 130:231-243.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Guideline on bioanalytical method validation**. 2011. Último acesso em 29/10/2017:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), U.S. **Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001**. Último acesso em 29/10/2017:
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>

KATO H, HAGIHARA M, HIRAI J, SAKANASHI D, SUEMATSU H, NISHIYAMA N, KOIZUMI Y, YAMAGISHI Y, MATSUURA K, MIKAMO H. **Evaluation of Amikacin Pharmacokinetics and Pharmacodynamics for Optimal Initial Dosing Regimen**. *Drugs in R&D*. 2017 Jan 6.

KEEVIL BG. **The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry**. *Clinical Biochemistry*. 2011 Jan;44(1):110-8.

LANÇAS F. **A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”?** *Scientia Chromatographica*. 2013; 5(1):27-46.

LINNET K. **Necessary Sample Size for Method Comparison Studies Based on Regression Analysis**. *Clin Chem*. 1999 Jun;45(6 Pt 1):882-94.

MAHMOUDI L, MOHAMMADPOUR AH, NIKNAM R, AHMADI A, MOJTAHEDZDEH M. **Limited sampling strategy for estimation of amikacin optimal sampling time in critically ill adults**. *Anaesthesia and Intensive Care*. 2014 Mar;42(2):228-33.

MCMASTER M. **LC/MS: A Practical User's Guide**. *Wiley-Interscience*, 2005.

MILOSHESKA D, GRABNAR I, VOVK T. **Dried blood spots for monitoring and individualization of antiepileptic drug treatment**. *European Journal Pharmacological Science*. 2015 Jul 30; 75:25-39. Epub 2015 Apr 17.

PAGE-SHARP M, NUNN T, SALMAN S, MOORE BR, BATTY KT, DAVIS TM, MANNING L. **Validation and Application of a Dried Blood Spot Ceftriaxone Assay**. *Antimicrobials Agents Chemotherapy*. 2015 Oct 5;60(1):14-23.

PARKER SL, SIME FB, ROBERTS JA. **Optimizing dosing of antibiotics in critically ill patients**. *Current Opinion in Infectious Disease*. 2015 Dec;28(6):497-504.

RYBAK M, LOMAESTRO B, ROTSCHAFFER JC, MOELLER R JR, CRAIG W, BILLETER M, DALOVISIO JR, LEVINE DP. **Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists**. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2009 Jan 1;66(1):82-98.

SHARMA A, JAISWAL S, SHUKLA M, LAL J. **Dried blood spots: concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis**. *Drug Test Anal*. 2014 May;6(5):399-414.

TIMMERMAN P, STEVE WHITE S, GLOBIG S *ET AL*. **EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots**. *Bioanalysis*. 2011; 3(14), 1567–1575.

TIMMERMAN P, WHITE S, COBB Z, DE VRIES R, THOMAS E, van BAAR B; **European Bioanalysis Forum**. Update of the EBF recommendation for the use of DBS in regulated bioanalysis integrating the conclusions from the EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis*. 2013 Sep;5(17):2129-36.

VU DH, KOSTER RA, ALFFENAAR JW, BROUWERS JR, UGES DR. **Determination of moxifloxacin in dried blood spots using LC-MS/MS and the impact of the hematocrit and blood volume**. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2011 May 1;879(15-16):1063-70.

WILHELM AJ, DEN BURGER JC, SWART EL. **Therapeutic drug monitoring by dried blood spot: progress to date and future directions.** *Clinical Pharmacokinetics*. 2014 Nov;53(11):961-73.

**Estudo da superexpressão da enzima β -galactosidase recombinante de
kluveromyces sp. Em diferentes Cepas de *escherichia coli***

Bruna Coelho de Andrade

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)
(bruna.andrade.001@acad.pucrs.br)

Victória Furtado Migliavacca

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS)
(victoria-migliavacca@uergs.edu.br)

Vanessa Yuki Grafulin

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
(vanessa.grafulin@ufrgs.br)

Claucia Fernanda Volken de Souza

Centro Universitário UNIVATES
(claucia@univates.br)

Jocelei Maria Chies

Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento
(direcao@quatrogpd.com.br)

Gaby Renard

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)
(gaby.renard@pucrs.br)

Giandra Volpato

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(giandra.volpato@poa.ifrs.edu.br)

Resumo: A enzima β -galactosidase hidrolisa a lactose em glicose e galactose. É utilizada para produção de alimentos com baixo teor deste açúcar. A obtenção dessa enzima recombinante poderá permitir sua produção em maiores quantidades com um menor custo. O objetivo deste trabalho foi estudar a superexpressão da enzima β -galactosidase recombinante de *Kluyveromyces* sp. em diferentes cepas de *E. coli*. O gene da β -galactosidase foi amplificado e ligado a um vetor de clonagem e subclonado em vetor de expressão. Para os testes de expressão, foram testadas diferentes cepas eletrocompetentes de *E. coli*: BL21 (DE3), Rosetta (DE3), Rosetta-gami 2 (DE3), C41 (DE3) e C43 (DE3); diferentes meios de cultura: LB, TB e M9; temperaturas de cultivo: 30°C e 37°C; e concentrações do indutor isopropil-tiogalactosídeo (IPTG): 0,05 mM e 1 mM. Foram realizadas coletas nos tempos 3 h, 6 h, 9 h, 24 h e 27 h após a indução. A expressão da enzima foi analisada por SDS-PAGE, quantificada pelo método de Bradford e sua atividade enzimática foi determinada usando o-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato. A cepa BL21 (DE3) obteve a maior atividade enzimática específica, aproximadamente 250 U/mg_{proteína}, em LB, à 30°C, após 9 horas de indução com 0,05 mM de IPTG.

Palavras-chave: Bioprocessos; IPTG; Superexpressão.

Study of overexpression of the recombinant β -galactosidase enzyme of *kluyveromyces* sp. In different strains of *escherichia coli*

Abstract: The β -galactosidase enzyme hydrolyses lactose in glucose and galactose. It is used in the production of food with low levels of this sugar. The obtention of this recombinant enzyme will allow its production in larger quantities with a lower cost. The aim of this work was to study the *Kluyveromyces* sp. recombinant β -galactosidase superexpression in different *E. coli* strains. The β -galactosidase gene was amplified and ligated to a cloning vector, and then subcloned into an expression vector. For the expression tests, different conditions were tested: electrocompetent *E. coli* cells BL21 (DE3), Rosetta (DE3), Rosetta-gami 2 (DE3), C41 (DE3) and C43 (DE3); culture medium LB, TB and M9; cultivation temperatures of 30°C and 37°C; and inductor (Isopropyl- β -D-thiogalactoside - IPTG) concentrations of 0.05 mM and 1 mM. Samples were taken at 3, 6, 9, 24 and 27 hours after induction. The enzyme expression was analyzed by SDS-PAGE, its concentration was determined by Bradford method and its activity was determined using ortho-Nitrophenyl- β -galactoside (ONPG) as substrate. The enzyme expressed by BL21 (DE3) strain showed the highest specific activity, approximately 250 U/mg_{protein}, in LB medium at 30°C, after 9 hours induction with 0.05 mM IPTG.

Keywords: Bioprocess; IPTG; Overexpression.

INTRODUÇÃO

A enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23), comumente conhecida como lactase, é uma das principais enzimas utilizadas no processamento de alimentos, por hidrolisar a lactose em seus monossacarídeos constituintes, glicose e galactose (PANESAR *et al.*, 2010). Sua principal aplicação tem sido a preparação de leite e derivados lácteos com baixo teor de lactose, além de suplementos alimentares utilizados por indivíduos intolerantes a lactose (PEREIRA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012; BELÉM e LEE, 1998).

A intolerância a lactose, ou má absorção da lactose, é um problema comum. Atualmente se estima que aproximadamente 70% da população mundial apresenta deficiência primária da lactase. Na Europa, a deficiência da lactase pode variar entre 4% (Dinamarca e Irlanda) e 56% (Itália). Foi reportado que na América do Sul, África e Ásia, mais de 50% da população tem deficiência primária da lactase podendo chegar a 100% na população asiática. No Brasil a prevalência aproxima-se a 80% na população com idade entre 38 e 49 anos (LULE *et al.*, 2016). Na maioria dos adultos a atividade da β -galactosidase diminui na parede intestinal após o período de amamentação, caracterizando a hipolactasia primária, o que provoca sintomas de intolerância à lactose (MATTAR e MAZO, 2010; MISSELWITZ *et al.*, 2013). Esses sintomas resultam da secreção de fragmentos catabólicos provenientes da fermentação bacteriana da lactose no cólon, quando esse açúcar não é absorvido corretamente (HUSAIN, 2010).

A intolerância a lactose pode ser causada por quatro tipos de deficiências da enzima β -galactosidase: primária, secundária, no desenvolvimento e congênita. A deficiência da β -galactosidase primária é o tipo mais comum, onde a produção da enzima diminui ao longo do tempo. A deficiência secundária resulta de lesões no intestino delgado, bem como infecções, doenças ou outros problemas que afetam o intestino. A deficiência da β -galactosidase no desenvolvimento ocorre em lactantes prematuros. Na rara deficiência da β -galactosidase congênita, o intestino delgado produz pouca ou nenhuma enzima desde o nascimento (SILANIKOVE *et al.*, 2015; SUCHY *et al.*, 2010).

O interesse em utilizar a β -galactosidase na indústria de laticínios surgiu inicialmente para realizar o prévio tratamento do leite empregado na fabricação de doces e iogurtes, por exemplo. Esta aplicação melhora as propriedades sensoriais do produto final, devido às características tecnológicas mais interessantes dos monossacarídeos resultantes, glicose e galactose, como o aumento do gosto doce, maior solubilidade, menor poder de cristalização (KLEIN *et al.*, 2010; VASILEVA *et al.*, 2012).

Atualmente, a β -galactosidase vem ganhando destaque no mercado de leites e derivados, principalmente no desenvolvimento de produtos alimentícios com baixo teor de lactose, ou livre de lactose, que tem aumentado significativamente em função, principalmente, do aumento de indivíduos diagnosticados com a hipolactasia primária do adulto.

Embora tem-se observado um crescimento na aplicação de enzimas como catalisadores em processos industriais, este emprego ainda representa um aumento no custo de produção, que se reflete no valor do produto final. Novas metodologias estão sendo estudadas para melhorar a eficiência do processo, ou buscando alternativas para diminuir o custo de aplicação industrial de enzimas (RABERT *et al.*, 2013). Essas alternativas envolvem o aumento da atividade enzimática, que pode ser obtido através da enzima recombinante e otimização do bioprocessamento (ANSARI e SATAR, 2012). O uso de técnicas de engenharia genética pode possibilitar o aumento da produção da β -galactosidase por meio da modificação ou da introdução de genes que promovem características como maior produção da enzima ou aumento da atividade enzimática (ZOU, 2014).

A tecnologia do DNA recombinante tem sido utilizada em processos de aplicação industrial para aumentar a produtividade enzimática e melhorar a estabilidade da enzima, onde a maioria das proteínas utilizadas são produzidas em hospedeiros de expressão heteróloga (GUO *et al.*, 2017). A funcionalidade das enzimas, velocidade de produção e o rendimento, são os fatores mais importantes a serem considerados quando é feita a escolha do sistema de expressão para a produção de enzimas recombinantes (ADRIO e DEMAIN, 2010). Entre os diferentes sistemas disponíveis, a produção de proteínas recombinantes em sistemas microbianos mostra-se eficiente (ROSANO e CECCARELLI, 2014). A bactéria *Escherichia coli* é um dos sistemas mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes, apresentando expressão e crescimento rápidos e alto rendimento de produto (SU *et al.*, 2017).

As β -galactosidases atualmente utilizadas para aplicação em alimentos são de fontes microbianas como, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis* (FREITAS *et al.*, 2011). As β -galactosidases de leveduras são fermentadoras da lactose, produzem β -galactosidases intracelularmente e são boas fontes dessa enzima, sendo as de *Kluyveromyces* importantes fontes comerciais, pois estão presentes naturalmente em produtos lácteos (HUSAIN, 2010).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi estudar a superexpressão da enzima β -galactosidase recombinante de *Kluyveromyces* sp. em diferentes cepas de *E. coli*.

METODOLOGIA

Crescimento da cepa de *Kluyveromyces* sp.

A cepa de *Kluyveromyces* sp. (ATCC-12424) foi mantida em ágar YEPD (20 g/L de glicose, 20 g/L de peptona, 10 g/L de extrato de levedura e 16 g/L de ágar) à 4°C e recuperada pelo cultivo de uma colônia em meio líquido YEPD. Após o crescimento, foi preparado um inóculo no mesmo meio de cultura, mantido sob agitação orbital de 150 rpm, 37°C, por aproximadamente 18 h, onde obteve-se a quantidade necessária de microrganismos para realizar a extração do seu DNA genômico.

Extração do DNA e amplificação do gene de interesse

Para a extração do DNA genômico da levedura, foi utilizado o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega®). Para realizar a amplificação do gene de interesse (Código de acesso no GenBank M84410.1) foi empregada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene da β -galactosidase, previamente desenhados (senso 5'- ATG TCT TGC CTT ATT CCT GAG AAT TTA AAG-3' e reverso 5'-TTA TTC AAA AGC GAG ATC AAA CTC AAA G-3'), e a enzima *Pfu* DNA Polimerase. Nesta etapa foram testadas diferentes temperaturas de anelamento (50, 55 e 58°C) e diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) (0 %, 2,5 %, 5 % e 10 %), com o objetivo de otimizar as reações de amplificação. O resultado da amplificação foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,2 %. O DNA amplificado foi purificado a partir do gel e quantificado por fluorometria utilizando Qubit 2.0 Fluorometer.

Ligação do fragmento de DNA purificado em vetor de clonagem

O fragmento de DNA purificado foi ligado ao vetor de clonagem pCR®-Blunt. Células de *Escherichia coli* (DH10B) foram transformadas por eletroporação com o DNA de interesse ligado ao vetor de clonagem. As células transformadas foram semeadas em ágar Luria-Bertani (LB) (10 g/L cloreto de sódio, 10 g/L de triptona, 5 g/L extrato de levedura, 16 g/L de ágar) na presença do antibiótico de seleção canamicina (30 μ g/mL). As colônias que cresceram foram inoculadas individualmente em meio líquido LB, na presença de 30 μ g/mL de canamicina, com agitação orbital de 180 rpm, 37°C, por aproximadamente 16 h, após o crescimento

realizou-se o processo de extração do DNA plasmidial, utilizando o kit QIAprep[®] Spin Miniprep.

Sequenciamento parcial dos clones

Os DNAs dos clones contendo o tamanho esperado do gene (aproximadamente 3.500 pb) foram submetidos ao sequenciamento automático utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *M13 reverse* (5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3') e *M13 forward* (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'). As sequências foram analisadas utilizando o programa BLAST[®] (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Amplificação para inserção de sítios de enzima de restrição

Para amplificação do gene foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos contendo sítios para as enzimas de restrição *NdeI* (5'-GCA GAA TTC AGG CAT ATG TCT TGC CTT ATT CCT GAG-3') e *XhoI* (5'-CCT TAA GTC CCT CGA GTT ATT CAA AAG CGA GAT CAA AC-3'), em uma PCR com temperatura de anelamento de 60°C, na presença de 2,5% de DMSO, utilizando a enzima *Pfu* DNA polimerase. O resultado da amplificação foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,2 %. O DNA amplificado foi purificado a partir do gel e quantificado por fluorometria (Qubit 2.0 Fluorometer).

Ligação do fragmento de DNA amplificado em vetor de expressão

O fragmento de DNA amplificado com oligonucleotídeos contendo sítios de restrição para *NdeI* e *XhoI* foi ligado ao DNA do vetor de expressão (pET30a(+)) clivado com as mesmas enzimas. Células de *Escherichia coli* (DH10B) foram transformadas por eletroporação com o DNA de interesse ligado ao vetor de expressão. As células transformadas foram cultivadas em ágar LB, como descrito anteriormente. As colônias que cresceram foram inoculadas individualmente no meio líquido LB, na presença de 30 μ g/mL canamicina, com agitação orbital de 180 rpm, 37°C por aproximadamente 16 h. Realizou-se o processo de extração do DNA plasmidial (contido no vetor), utilizando o kit QIAprep[®] Spin Miniprep.

Sequenciamento do clone

Toda extensão do inserto do clone de interesse foi submetida ao sequenciamento automático utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene (Tabela 1). As sequências foram analisadas utilizando o programa BLAST[®] (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos específicos utilizados no sequenciamento automático do clone de interesse.

Nome	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')
T7 Promoter	AAT ACG ACT CAC TAT AGG
T7 Terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
LAC 3	GAC TCT CAG TAT CAG GAT G
LAC 4	GAG CCA TTT AAT CGT CAT AC
LAC 5	CAT CAT GGA TGG TTT GTG
LAC 7	CAA CTG GGG ATA TAC GAG
LAC 8	CAA TAA CCT TCT TAT ACT C
LAC 9	GGG CAT TAA CAT CGT AGA G
LAC 10	GAA ATT GAT GTG ATC ATA AG

Testes de superexpressão da β -galactosidase

Para realizar a superexpressão da β -galactosidase, foram testadas cinco cepas eletrocompetentes de *E. coli*: BL21 (DE3), Rosetta (DE3) e Rosetta-gami (DE3) da Novagen, C41 (DE3) e C43 (DE3) da Lucigen. As células foram transformadas por eletroporação com o DNA da construção pET30a(+): β -galactosidase e cultivadas em ágar LB, contendo o antibiótico de resistência específico para cada cepa recombinante, conforme pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2 - Antibióticos utilizados e suas concentrações de resistência para as cepas e vetor estudado.

Antibiótico	Vetor/Cepas		
	pET30a(+)	Rosetta	Rosetta gami-2
)	(DE3)	(DE3)
Canamicina ($\mu\text{g/mL}$)	30		
Cloranfenicol ($\mu\text{g/mL}$)		34	34
Tetraciclina ($\mu\text{g/mL}$)			12,5
Estreptomicina ($\mu\text{g/mL}$)			50

Para os testes de expressão da β -galactosidase foram testadas diferentes condições de cultivo (meio de cultura e temperatura) para as cepas estudadas, conforme apresentado na Tabela 3. Todos os cultivos foram realizados em 50 mL de meio de cultura e a indução da expressão da β -galactosidase, com isopropil-tiogalactosídeo (IPTG), foi realizada nas concentrações de 0,05 mM e 1 mM, na densidade óptica (OD) entre 0,4 e 0,6 (600 nm). Foram realizadas coletas de amostras de 1 mL nos tempos 3 h, 6 h, 9 h, 24 h e 27 h após o momento da indução.

Para todos os cultivos foram realizados controles (células transformadas com o vetor sem o inserto, induzidas e não induzidas, e transformadas com o vetor contendo o inserto, não induzidas), onde as células foram cultivadas nas mesmas condições testadas, concomitantemente. Todos os cultivos foram realizados em agitador orbital (*shaker*), com velocidade de agitação de 180 rpm.

Após cada coleta as células foram centrifugadas (5.000 rpm, 1 minuto) e congeladas. Para as análises, foram ressuspendidas em tampão Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, rompidas por ultrassom em sonicador (três pulsos de 10 segundos) e centrifugadas (4°C, 13.000 rpm, 30 minutos). As frações foram separadas em solúveis (sobrenadante) e insolúveis (sedimentado) e esta última foi ressuspendida no mesmo tampão.

Tabela 3 - Condições de cultivo, cepas utilizadas nos testes de expressão da enzima e atividades específicas máximas obtidas.

Cultivo	Cepa recombinante	Meio de cultivo	Temperatura (°C)	Atividade específica máxima (U/mg _{proteína})
1	BL21(DE3)			ND
2	Rosetta(DE3)			ND
3	Rosetta-gami 2 (DE3)	LB	37°C	ND
4	C41 (DE3)			ND
5	C43 (DE3)			ND
6	C41 (DE3)			ND
7	Rosetta(DE3)	LB		87,04 (27 h)
8	BL21 (DE3)			247,62 (9 h)
9	Rosetta(DE3)	M9	30°C	60,66 (9 h)
10	BL21 (DE3)			85,54 (9 h)
11	Rosetta(DE3)	TB		59,20 (9 h)
12	BL21 (DE3)			40,39 (27 h)

¹LB: triptona: 10 g/L, extrato de levedura: 5 g/L, NaCl: 10 g/L. ²M9: NaCl: 0,5 g/L, NH₄Cl: 1 g/L, extrato de levedura: 20 g/L, Na₂HPO₄: 6 g/L, KH₂PO₄: 3 g/L, glicose: 500 g/L, MgSO₄: 0,1 g/L, tiamina: 1 g/L, solução traço (FeSO₄: 2,8 g/L, MnCl₂: 2 g/L, CaCl₂: 2 g/L, CuCl₂: 0,26 g/L, ZnSO₄: 0,3 g/L): 1 mL/L. ³TB: triptona: 12 g/L, extrato de levedura: 24 g/L, K₂HPO₄: 12,5 g/L, KH₂PO₄: 2,3 g/L, glicerol 4 mL/L). **ND**: Não determinado.

Métodos analíticos

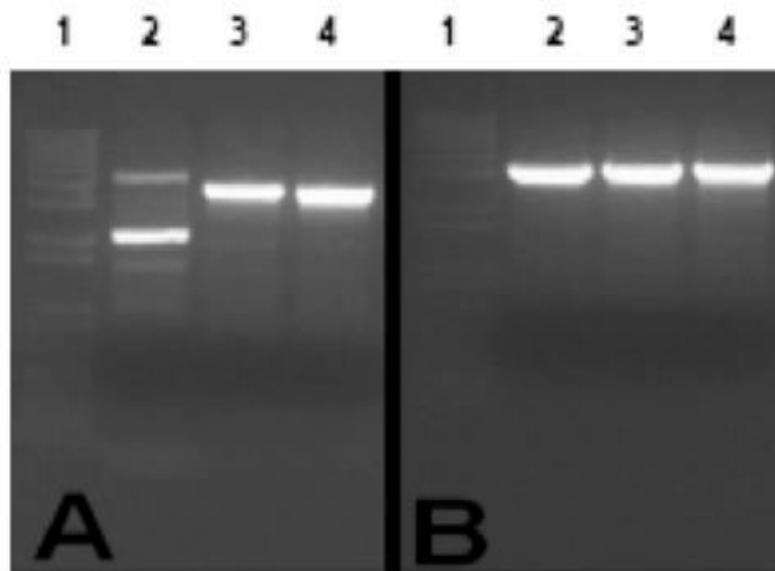
A densidade óptica dos cultivos foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm. A expressão da β -galactosidase foi analisada nas frações solúveis e insolúveis, por meio de SDS-PAGE (12%), utilizando *Comassie Brilliant Blue* como corante e o marcador de peso molecular Page Ruler (ThermoScientific). A quantificação da proteína intracelular foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando o kit *Bradford Protein Assay* (BioRad). A atividade enzimática foi determinada segundo a metodologia proposta por RECH *et al.* (1999), com modificações, utilizando o-nitrofenol- β -D-galactopiranoside (ONPG) como substrato. O volume de 100 μ L do extrato enzimático (fração solúvel) foi misturado a 1 mL da solução de substrato ONPG 13

mM e incubado a 37°C por 1 min em banho-maria, ao final a reação foi parada adicionando-se 200 μ L de carbonato de sódio 1 M. O produto da reação foi medido em espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μ mol de ONP (o-nitrofenol) por minuto, nas condições de análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os resultados das reações de amplificação do gene da β -galactosidase, a partir do DNA genômico de *Kluyveromyces* sp., utilizando diferentes temperaturas de anelamento e diferentes concentrações de DMSO.

Figura 1 - Resultado da amplificação do gene (Código de acesso no GenBank M84410.1) visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,2 %. A: diferentes temperaturas testadas (1: Marcador 1 Kb (kilo base) Plus; 2: 50°C; 3: 55°C; 4: 58°C). B: diferentes concentrações de DMSO a 58°C de anelamento (1: Marcador 1 Kb Plus; 2: 2,5%; 3: 5%; 4: 10%).

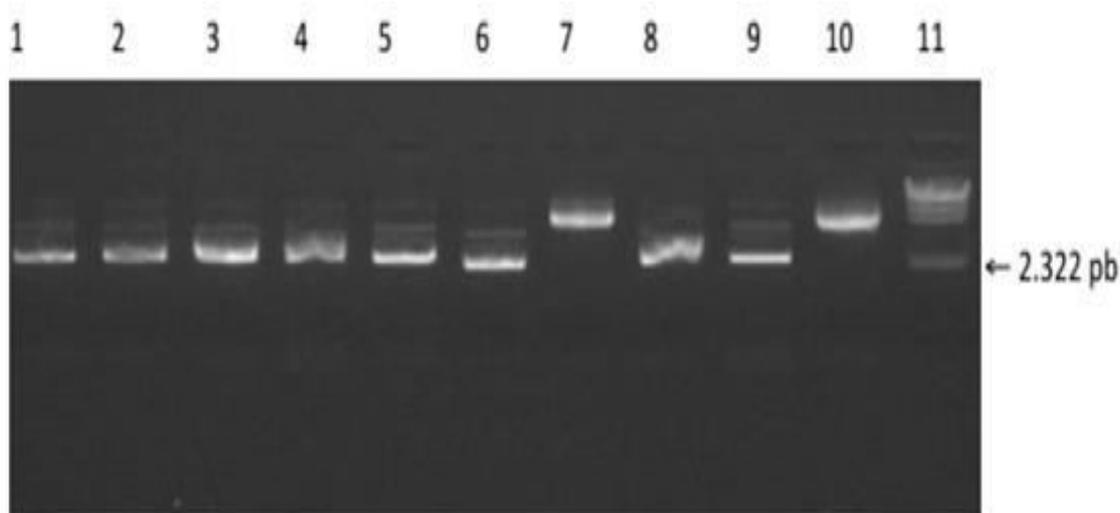


A temperatura de anelamento à 58°C foi utilizada para testar o efeito das diferentes concentrações de DMSO. O uso deste composto melhorou as reações de amplificação, visto que otimiza as reações de PCR, auxiliando na desnaturação da estrutura secundária do DNA (FRACKMAN *et al.*, 1998). A variação da concentração de DMSO não demonstrou nenhum efeito, sendo assim, optamos pelo uso da menor

concentração do composto. Na ausência de DMSO não foi possível amplificar o gene de interesse. O DNA amplificado foi purificado do gel de agarose e quantificado. A concentração de DNA obtida foi de 35,5 $\mu\text{g/mL}$.

O fragmento de DNA purificado foi ligado ao vetor de clonagem e inserido em células eletrocompetentes de *E. coli*, que foram cultivadas em meio de cultura. Após 16 h, 10 colônias de células recombinantes foram obtidas. Cada uma dessas colônias foi inoculada separadamente em meio líquido LB com o(s) antibiótico(s) específico(s). O DNA plasmidial destas células foi extraído e analisado por eletroforese em gel de agarose, o resultado da análise do DNA plasmidial dos clones obtidos pode ser visualizada na Figura 2.

Figura 2 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1,2 % do DNA plasmidial dos clones obtidos. 1 a 10: DNA plasmidial dos clones 1 a 10, respectivamente; 11: Marcador Lambda DNA/*Hind*III.



Os clones 3, 7 e 10 foram submetidos ao sequenciamento das extremidades do inserto. Os resultados do sequenciamento mostraram que o gene da β -galactosidase de *Kluyveromyces* sp. estava presente nos clones 7 e 10. A partir do DNA destes dois clones foram realizadas novas amplificações com oligonucleotídeos específicos contendo os sítios de restrição *Nde*I e *Xho*I para posterior subclonagem. As reações de PCR foram realizadas na presença de 2,5 % de DMSO e temperatura de anelamento de 58°C. O DNA amplificado foi purificado a partir do gel de agarose, clivado com as enzimas de restrição *Nde*I e *Xho*I e clonado no vetor de expressão pET30a(+), clivado com as mesmas enzimas.

Um dos clones obtidos foi quantificado e submetido ao sequenciamento das fitas complementares utilizando oligonucleotídeos internos específicos para o gene. A sequência gênica mostrou 99% de similaridade com o gene da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Com o resultado do sequenciamento, seguiu-se para os testes de superexpressão da enzima recombinante em diferentes cepas de *E. coli*.

Os resultados das atividades específicas da β -galactosidase para as cepas recombinantes estudadas e condições de cultivo estão apresentados na Tabela 2. Verificou-se que na temperatura de 37°C não ocorreu a expressão da enzima na fração solúvel, apenas nas frações insolúveis (resultados não mostrados), a atividade da mesma não foi determinada. A produção de algumas proteínas se dá na fração insolúvel, expressas em corpos de inclusão (LEE, 1996). Esta forma de expressão pode representar um obstáculo para a produção eficiente em proteínas recombinantes (ST JOHN *et al.*, 1999).

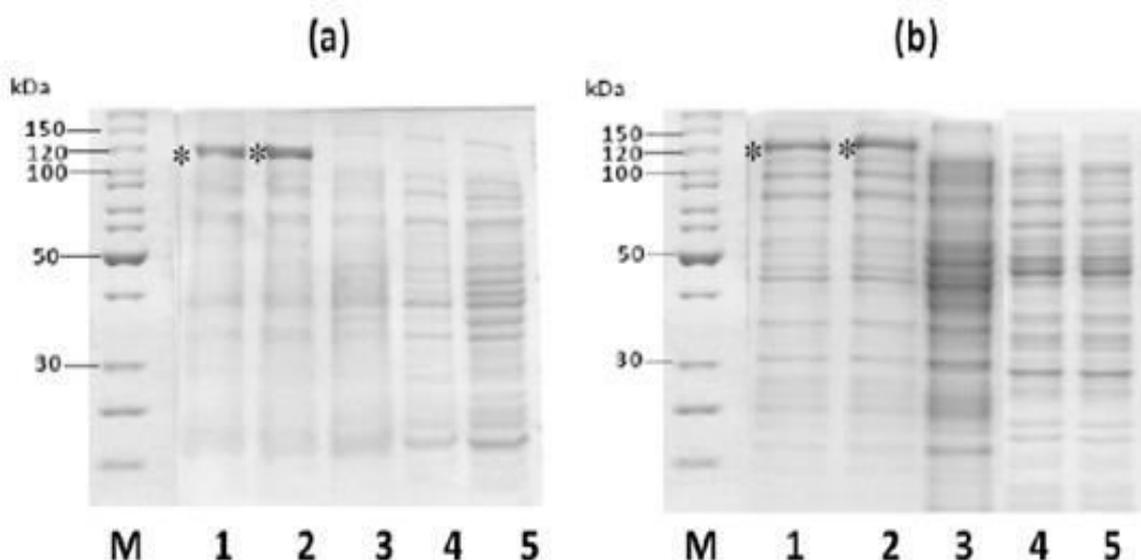
Verificou-se que a cepa recombinante Rosetta-gami 2 (DE3) não apresentou expressão da β -galactosidase na condição testada (meio de cultivo LB e 37°C), em ambas as frações (solúvel e insolúvel). Nestas condições, a cepa recombinante C41 (DE3) apresentou pouca expressão, semelhante à obtida pela cepa C43 (DE3). Frente a estes resultados as cepas recombinantes Rosetta (DE3), BL21 (DE3) e C41 (DE3) foram escolhidas para realização de testes à 30°C. A cepa C41 (DE3) continuou expressando a β -galactosidase somente na fração insolúvel. Porém as demais cepas recombinantes (Rosetta (DE3) e BL21 (DE3)), expressaram a enzima nas frações solúveis. A maior atividade específica, aproximadamente 250 U/mg_{proteína}, foi obtida pela cepa recombinante BL21 (DE3), em meio de cultivo LB, à 30°C, após 9 horas de indução com 0,05 mM de IPTG. Em trabalhos prévios do nosso grupo, foram encontradas atividades específicas máximas de aproximadamente 0,50 U/mg_{proteína}, utilizando a enzima produzida por diferentes cepas de *Kluyveromyces* selvagens (não recombinante). Logo, foi possível verificar a superexpressão da enzima na forma recombinante.

O trabalho de Dagbagli e Goksungur (2008), também apresenta a produção da β -galactosidase por uma cepa selvagem de *Kluyveromyces* (*Kluyveromyces lactis*), onde a atividade específica máxima obtida foi de 37 U/mg_{proteína}, utilizando lactose, extrato de levedura, NH₄H₂PO₄, (NH₄)₂HPO₄, MgSO₄ e KH₂PO₄, como meio de cultivo e temperatura de 30°C.

No estudo de Cieslinski *et al.* (2005) foi relatada a expressão da β -galactosidase de *Pseudoalteromonas* sp. 22B em *E. coli* ER2566, os cultivos foram realizados em meio de cultivo LB, usando ampicilina como antibiótico, à 30°C, usando IPTG como indutor, a atividade específica obtida foi de 4,0 U/mg_{proteína}, quantidade inferior às encontradas nos nossos estudos.

A Figura 3 apresenta os testes de expressão para as cepas recombinantes previamente selecionadas, Rosetta (DE3) e BL21 (DE3), na condição que levou aos maiores valores de atividade enzimática específica (meio de cultivo LB e 30°C). Aparentemente, a β -galactosidase expressa tem o tamanho de aproximadamente 120 kDa.

Figura 3 - Análise da expressão solúvel da β -galactosidase em meio de cultivo LB à 30°C, por meio de SDS-PAGE (12 %). (a) Rosetta (DE3). (b) BL21 (DE3). M: Marcador de peso molecular (Page Ruler); 1: Expressão pelas células transformadas com o vetor contendo o inserto, com indução (IPTG 1 mM); 2: Expressão pelas células transformadas com o vetor contendo o inserto, com indução (IPTG 0,05 mM); 3: Expressão pelas células transformadas com o vetor contendo o inserto, sem indução; 4: Expressão pelas células transformadas com o vetor sem o inserto, com indução (IPTG 1 mM); 5: Expressão pelas células transformadas com o vetor sem o inserto, sem indução.



Segundo Pereira-Rodríguez *et al.* (2012), esta enzima forma homooligômeros com quatro subunidades, cada cadeia polipeptídica tem massa molecular de 119 kDa. O trabalho de BECERRA *et al.* (1998) demonstrou que a β -

galactosidase de *K. lactis* é composta por monômeros com peso molecular de 124 kDa, apresentando atividade tanto na forma de dímeros como de tetrâmeros.

Verifica-se ainda que a enzima foi expressa independente da concentração de indutor utilizada, porém a atividade máxima foi obtida com 0,05 mM de IPTG, para ambas as cepas. KIM *et al.* (2003) estudaram o efeito da concentração de IPTG na expressão da enzima solúvel e verificaram que a baixa concentração deste indutor (0,05 mM), levou a maior expressão da enzima na fração solúvel.

CONCLUSÕES

Neste trabalho verificou-se a grande influência dos meios de cultivo e de diferentes cepas de *E. coli* na expressão e atividade da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces* sp. em *E. coli* recombinante, sendo possível a superexpressão da enzima. Os resultados vêm ao encontro do desenvolvimento de tecnologias que visem o desenvolvimento e redução de custos na obtenção de enzimas alimentícias, sendo importantes para as aplicações industriais.

REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. **Recombinant organisms for production of industrial products.** *Bioeng Bugs*, v. 1, p. 116–131, 2010.
- ANSARI, S. A.; SATAR, R. **Recombinant β -galactosidases- Past, present and future: a mini review.** *J Mol Cat B: Enz*, v. 81, p. 1-6, 2012.
- BECERRA, M.; CERDÁN, E.; SISO, M. I. G. **Micro-scale purification of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* reveals that dimeric and tetrameric forms are active.** *Biotech Tech*, v. 12, p. 253-256, 1998.
- BELÉM, M. A. F.; LEE, B.H. **Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative.** *Crit Rev Food Sci Nutr*, v. 38, p. 598-656, 1998.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical biochemistry*, v. 72(1-2), p. 248-254, 1976.
- CIESLINSKI, H.; KUR, J.; BIALKOWSKA, A.; BARAN, I.; MAKOWSKI, K.; TURKIEWICZ, M. **Cloning, expression, and purification of a recombinant cold-**

adapted β -galactosidase from antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b. *Protein Expression and Purification*, v. 39: 27-34, 2005.

DAGBAGLI, S.; GOKSUNGUR, Y. Optimization of β - galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y- 8279 by response surface methodology. *Electronic J of Biotechnol*, v. 11, n. 4, 2008.

FRACKMAN, S.; KOBBS, G.; SIMPSON, D.; STORTS, D. Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. *Promega Notes*, p. 27, 1998.

FREITAS, F. F.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÃO, G. C.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Biochem Eng J*, v. 58-59, p. 33-38, 2011.

GUO, Y. Y.; YU, X. W.; XU, Y. Cloning, expression and characterization of two thermostable esterases from *Aquifex aeolicus* VF5, *J Mol Catal B: Enz* (2017) [Online] Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2017.01.008>. Acesso em: 3 set, 2017.

HUSAIN, Q. Beta galactosidases and their potential applications: a review. *Crit Rev Biotechnol*, v. 30, p. 41-62. 2010.

KLEIN, M. P.; JONG, E. V.; RÉVILLION, J. P. P. Utilização da β -galactosidase para prevenção da cristalização em doce de leite. *Ciênc Agrotec*, v. 34, p. 1530-1535, 2010.

KIM, C. S.; JI, E. S.; OH, D. K. Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase in *Escherichia coli*. *Biotech Lett*, v. 25, p. 1769-1774, 2003.

LEE, S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotech.*, v. 3: 98-105, 1996.

LULE, V. K.; GARG, S.; TOMAR, S. K.; KHEDKAR, C. D.; NALAGE, D. N. Food intolerance: lactose intolerance. *Encyclopedia of food and health*, p. 43-48, 2016.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. Intolerância à lactose: mudanças de paradigmas com a biologia molecular. *Rev Assoc Med Bras*, v. 56, p. 230-236, 2010.

MISSELWITZ, B.; POHL, D.; FRÜHAUF, H.; FRIED, M.; VAVRICKA, S. R.; Fox, M. Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment. *United European Gastroenterol. J.*, v. 1, p. 151-159, 2013.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. *Enz Res*, v. 2010, p. 16, 2010.

PEREIRA-RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ-LEIRO, R.; GONZÁLEZ-SISO, M. I.; CERDÁN, M. E.; BECERRA, M.; SANZ-APARICIO, J. Structural basis of specific

in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *J Struc Biol*, v. 177, p. 392-401, 2012.

RABERT, C.; WEINACKER, D.; PESSOA, A. JR.; FARÍAS, J. G. **Recombinants proteins for industrial uses**: utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Braz J Microbiol*, v. 44, p. 351–356, 2013.

RECH, R.; CASSINI, C. F.; SECCHI, A.; AYUB, M. A. Z. **Utilization of protein hydrolyzed cheese-whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus***. *J Ind Microbiol and Biotech*, v. 23, p. 91-96, 1999.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges**. *Front Microbiol*, v. 5, 2014.

SILANIKOVE, N.; LEITNER, G.; MERIN, U. **The interrelationships between lactose intolerance and the modern dairy industry: global perspectives in evolutionary and historical backgrounds**. *Nutrients*, v.7, p. 7312–7331, 2015.

VASILEVA, N.; IOTOVA, V.; IVANOV, Y.; GODJEVARGOVA, T.; KOTIA, N. **Immobilization of β -galactosidase on modified polypropylene membranes**. *Int J Biol Mac*, v. 51, p. 710-719, 2012.

ST JOHN, R. J.; CARPENTER, J. F.; RANDOLPH, T. W. **High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 13029- 13033, 1999.

SU L.; JIANG Q.; WU J. 2017. **Enhanced extracellular production of recombinant proteins in *Escherichia coli* by co-expression with *Bacillus cereus* phospholipase C**. *Microb Cell Fact*, v. 16, 2017.

SUCHY, F.J.; BRANNON, P.M.; CARPENTER, T.O.; Fernandez, J.R.; Gilsanz, V.; Gould, J.B.; Hall, K.; Hui, S.L.; Lupton, J.; Mennella, J.; *et al.* NIH Consensus **Development Conference Statement: Lactose Intolerance and Health**. *NIH Consens State Sci Statements*, v. 27, p. 1-27, 2010.

ZOU, S.; HE, X.; LIU, Y.; CHEN, D.; LUO, Y.; HUANG, K., ZHANG, W.; XU, W. **Toxicological evaluation of lactase derived from recombinant *Pichia pastoris***. *PLoS One*, v. 9, p. e106470, 2014.

Screening of Amazonian *Bacillus* strains for lipase production using glycerol as substrate

Giandra Volpato

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(giandra.volpato@poa.ifrs.edu.br)

Victória Furtado Migliavacca

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS)
(victoria-migliavacca@uergs.edu.br)

Bruna Coelho de Andrade

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)
(bruna.andrade.001@acad.pucrs.br)

Júlio Xandro Heck

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(julio@poa.ifrs.edu.br)

Marco Antônio Záchia Ayub

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
(mazayub@ufrgs.br)

Abstract: The industrial application of lipolytic enzymes has been studied mainly due to the ability of these enzymes in catalyze reactions of synthesis and their stability in various organic solvents. One possibility is the use of lipase the organic synthesis, taking advantage as the generation of waste and difficult recovery of sub bioproducts. In this work, we carried out a selection of eighty-four isolates of *Bacillus* amazonian for lipase production, of which 30 strains showed lipolytic activity. The study of the culture conditions was performed through a Plackett-Burman experimental design using the strain that presented the highest lipolytic activity in a culture medium using glycerol as substrate. The studied conditions were: concentration of soybean oil, olive oil, triton X-100, gum arabic, glycerol, and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH, temperature and concentration of inoculums. The best result obtained were 27 U/L in 48 h of cultivation by *Bacillus circulans* BL53. This work shows that the search and selection of microorganism with lipolytic activities can facilitate the discovery of new lipases, with potential use as by-product surplus.

Keywords: Screening; Glycerol; Lipase.

INTRODUCTION

Lipases belong to the enzyme class of hydrolases (E.C.3) and they are an important group of biocatalysts with a swiftly growing biotechnology that is based mainly on their remarkable ability to carry out novel reactions in aqueous and non-aqueous media (SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012). Thus with the advent of rapid methods for discovering novel enzymes or altering the properties of enzymes, there is paramount interest in the development of screening tools that can be used to search for the best performance with respect to specific property. As each industrial application may require specific properties of the biocatalysts, there are still an interest in finding new lipases that could create novel applications (BASSEGODA *et al.*, 2013). Therefore, the screening of microorganisms with lipolytic activities is essential research aiming to the discovery of novel lipases.

Numerous carbon sources, such as Tween 80, triolein, yeast extract, olive oil, soybean oil, silk oil, sesame oil, coconut oil, and corn oil, have been used as substrates to produce lipases in cultures of bacteria (LI *et al.*, 2005; BURKERT *et al.*, 2004). However, few investigations have been carried out using glycerol as substrate (LIN *et al.*, 2006; VOLPATO *et al.*, 2008; RECH *et al.*, 2012). Glycerol can be utilized as a carbon source in microbial bioconversions for the production of a range of chemicals that might be utilized either as end-products or as precursors for the production of other chemicals, since this biofuel will be produced on a large scale in the coming years, large amounts of glycerol will be discarded and can be used in bioprocesses.

The determination of culture conditions for overproduction of the enzyme is an important step for its commercial usage and involves a number of physico-chemical parameters such as the composition of production medium, the carbon and nitrogen sources, pH and temperature (GUPTA *et al.*, 2004). The use of statistical approach involving Plackett–Burman (PB) statistical designing have been widely used for media screening and for the understanding of interactions among various parameters using a minimum number of experiments (RAJENDRAN *et al.*, 2008; ABU *et al.*, 2017). Recent studies have shown the use of statistical approaches to culture conditions optimization to lipases production by different microorganisms such as

Pichia guilliermondii (ABU *et al.*, 2017), *Bacillus cereus* (VASIEE *et al.*, 2016), and *Yarrowia lipolytica* (IMANDI *et al.*, 2014).

This work deals of screening of Amazon *Bacillus* strains to produce lipase using glycerol as substrate and to study the effects of culture conditions on lipase production using Plackett–Burman statistical designing.

MATERIAL AND METHODS

Screening of Amazon isolates

The eighty-four bacterial used in this study were isolated from samples of soil and water of the Amazon region and stocks of these bacteria are kept at Microbiology Culture Collection of BiotecLab (UFRGS, Brazil). Strains were maintained on LB agar medium containing 1% of peptone, 0.5% of yeast extract, and 1% of NaCl. Two assay methods were used to screen the lipolytic activity: a solid system (agar plates), for bacteria preselecting, and a liquid system (microplates).

The solid system was based on the spread plate technique content tributyrin agar. Cultures were grown at 37 °C for 72 h and positive colonies were identified by the presence of a translucent halo around the colonies; commercial lipase was used as a positive control, and water as negative control (SOUZA *et al.*, 2003).

In the liquid system, sterilized medium (LB supplemented with 10 % of olive oil and 1 % of gum arabic) was then homogenized in a blender, test tubes were inoculated with a single colony from an agar plate culture and incubated for 48 h at 37°C under agitation (180 rpm), the tube cultures were centrifuged at 15,000 g and 4 °C for 10 min, and an aliquot of supernatant was removed to check extracellular activity, using SpectraMax Microplate Reader, with 96-well polystyrene microplates, according to methodology proposed by Winkler and Stuckmam (1979), with modifications.

Media composition

Through the tests described above were selected the strains with higher lipolytic activity. We tested six different media of cultivation, varying the source of carbon (glucose and glycerol), nitrogen source (organic and inorganic) and source of minerals (raw yeast extract and medium Bushnell-Haas), showed Table 1. Inoculum for all experiments were prepared in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 40 mL of

the culture medium. Flasks were inoculated with 5 % of pre inoculum (medium LB, 18 h of culture, and agitation of 250 rpm), the initial pH was adjusted to 7.0, incubated for 48 h at 37 °C, and 250 rpm. Samples were taken along the 48 h of cultivation to determine lipolytic activity, pH and optical density.

Table 1 - Culture media composition.

Culture Medium	Carbon source (g/L)		Nitrogen source (g/L)		Mineral source (g/L)	
	Glycerol	Glucose	Peptone	(NH ₄) ₂ SO ₄	Raw yeast extract	Bushnell-Haas extract
1	10	0	10	0	5	0
2	0	10	10	0	5	0
3	10	0	0	10	5	0
4	0	10	0	10	5	0
5	10	0	0	10	0	5
6	0	10	0	10	0	5

Plackett–Burman statistical design

To determine which nutrients and conditions had a significant effect on lipase production, P-B design was used (PLACKETT & BURMAN, 1947), with the strain that presented the highest lipolytic activity in previous experiments. In this paper, nine variables (concentration of soybean oil and olive oil; concentration of Triton X-100; concentration of gum arabic; concentration of glycerol; concentration of (NH₄)₂SO₄; initial pH; temperature, and inoculum optical density) and two dummies variables were screened in 12 trials, in duplicate. The minimum and maximum ranges selected for the nine parameters are given in Table 2, in which each column represents an independent variable. Variables with confidence levels > 95% were considered to have significant influence on lipase production.

Table 2 - Plackett-Burman experimental design matrix with lipolytic activity in 48 h of cultivation by *Bacillus circulans* BL53.

Trial no.	Variables ^a /levels ^b									Lipolytic Activity (U/L)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	
1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	7.05
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+	1.46
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	4.15
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	4.41
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	4.23
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	8.64
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	0.48
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	1.89
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	26.73
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	11.41
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	19.32
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16.30
Effects	-4.4*	-4.9*	-8.2*	-4.7*	1.2*	5.1*	-3.1*	3.1*	0.5	

^a X₁ soybean oil: (-) = 5 g/L, (+) = 20 g/L; X₂ olive oil: (-) = 5 g/L, (+) = 20 g/L; X₃ Triton X-100: (-) = 0 g/L, (+) = 5 g/L; X₄ gum arabic: (-) = 0 g/L, (+) = 10 g/L; X₅ glycerol: (-) = 10 g/L, (+) = 30 g/L; X₆ (NH₄)₂SO₄: (-) = 0 g/L, (+) = 5 g/L; X₇ initial pH: (-) = 5, (+) = 8; X₈ temperature: (-) = 25 °C, (+) = 37 °C; X₉ inoculum optical density (-) = 5 % (v/v), (+) = 10 % (v/v). ^b (-) lower level, (+) higher level. * p-values < 0.05.

Analytical methods

The cell-free supernatant of the culture broth, referred to as the crude extract, was used for the estimation of enzymatic activities and for pH determinations using a standard lab pHmeter.

Lipolytic activity was determined using a colorimetric method described for Winkler and Stuckmam (1979), using p-nitro-phenyl palmitate (pNPP) as the substrate. A volume of 0.15 mL crude enzyme extract was mixed with 1.35 mL of the prepared substrate solution and incubated at 37°C for 15 min in a water bath. Control containing heat-inactivated enzyme was also incubated with each assay. The reaction was measured as absorbance at 410 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme that liberated 1 μmol p-nitrophenol min⁻¹ at 37°C.

RESULTS AND DISCUSSION

Thirty strains from the eighty-four studied, were selected respect with their lipolytic activities. Table 3 shows the results to of halos formed in agar tributyrin by strains pre-selected in this test, and lipolytic activity of these isolates. It was verified that the major lipolytic activities were obtained by the strains that presented the largest halos. The similar behavior was found by Bhatnagar *et al.* (2005) in the selection of lipase-producing halobacteria, these data indicate that although this method is qualitative, it can be considered very reliable. These authors have maximum lipolytic activity of 10.8 U/L, using ρ -NPP as a substrate. Among the pre-selected strains in this work, the isolated BL13 presented the higher lipolytic activity (22.5 U/L).

We performed the statistical analysis of the results, through ANOVA and Tukey test, to verify the differences between the lipolytic activities obtained for each isolated. When the activities were considered statically equal, with confidence level of 95 %, they were grouped and identified by a superscript letter. The strains that showed higher lipolytic activity (groups A and B) were selected for the study of culture media composition. Thus, eight strains were selected, BL13, BL49, BL53, BL58, BL60, BL61, BL64 and BL74, as is evident in Table 3.

After select microorganisms with lipolytic activity, different source of carbon (glucose and glycerol), nitrogen (peptone and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), and mineral (Bushnell-Haas and yeast extract) were tested for the lipase production of such strains. Table 4 presents the results of lipolytic activity for the previously selected strains, in the different cultures using glycerol (media 1, 3 and 5) or glucose (media 2, 4 and 6).

The higher lipolytic activity (26.9 U/L) was obtained by isolated BL53, previously identified as *Bacillus circulans*, in the culture medium containing glycerol as substrate (medium 1), suggesting that glycerol is a better source for microorganism growth and lipase production than glucose, for the studied strains. Volpato *et al.* (2008) and Lin *et al.* (2006), working with *Staphylococcus caseolyticus* and *Antrodia cinnamomea*, respectively, also described the induction of this enzyme by glycerol. Moreover, the lipolytic activities were higher in the media 1 and 2, indicating that the use of peptone as a nitrogen source and raw yeast extract, a cheap substrate, are more interesting for lipase production by these strains, than the use of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and mineral medium Bushnell-Haas, respectively. From these

results, we selected the isolated BL53 because it presented higher lipolytic activity in cultures containing glycerol as carbon source.

Table 3 - Amazonian isolates that showed lipolytic activity.

Strain	Tributyryn Agar Plates	Lipolytic Activity (U/L)
BL7	+	7.4 ± 0.2 ^{FG}
BL9	+	9.9 ± 0.2 ^{DEF}
BL10	+	10.3 ± 0.0 ^{DEF}
BL12	+	10.3 ± 0.4 ^{DEF}
BL13	++	22.5 ± 0.2 ^A
BL14	++	10.9 ± 0.3 ^{DE}
BL20	+	10.6 ± 0.0 ^{DEF}
BL21	+	10.3 ± 0.0 ^{DEF}
BL22	+	7.9 ± 0.5 ^{FG}
BL23	+	8.2 ± 0.1 ^{FG}
BL32	+	8.9 ± 0.4 ^{EF}
BL37	+	6.7 ± 0.0 ^F
BL38	++	11.3 ± 0.1 ^{DE}
BL48	++	10.9 ± 0.5 ^{DE}
BL49	++	14.0 ± 0.0 ^{BCD}
BL53	++	14.1 ± 0.2 ^{BCD}
BL58	++	14.1 ± 0.5 ^{BCD}
BL60	++	15.4 ± 0.3 ^{BC}
BL61	++	14.9 ± 0.0 ^{BC}
BL62	+	10.5 ± 0.2 ^{DEF}
BL63	++	12.7 ± 0.5 ^{CDE}
BL64	++	16.1 ± 0.0 ^B
BL65	++	12.9 ± 0.0 ^{CD}
BL66	+	10.8 ± 0.9 ^{DE}
BL70	++	11.7 ± 0.5 ^{DE}
BL71	+	10.8 ± 0.2 ^{DE}
BL74	++	15.5 ± 0.0 ^{BC}
BL77	++	11.5 ± 1.6 ^{DE}
BL84	++	11.9 ± 0.4 ^{DE}
BL86	++	12.4 ± 0.4 ^{CDE}

++: very clear halo; +: clear halo. Results are the mean ± standard deviation of three experiments. Means followed by different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Table 4 - Lipolytic activity of pre-selected strains in different media studied.

Strain	Lipolytic activity (U/L)					
	Medium 1	Medium 2	Medium 3	Medium 4	Medium 5	Medium 6
BL13	8.8 ± 0.9 ^E	8.1 ± 0.3 ^E	5.6 ± 0.2 ^{EF}	9.3 ± 1.0 ^{DE}	7.2 ± 0.7 ^{EF}	1.4 ± 0.1 ^G
BL49	6.9 ± 0.7 ^{EF}	4.1 ± 0.1 ^{EF}	2.5 ± 0.8 ^{FG}	2.1 ± 0.7 ^{FG}	3.3 ± 1.5 ^{EF}	1.7 ± 0.4 ^G
BL53	24.9 ± 1.1 ^A	19.5 ± 1.4 ^B	8.3 ± 1.6 ^E	11.1 ± 1.5 ^{DE}	12.8 ± 0.4 ^{DE}	2.8 ± 0.5 ^{FG}
BL58	8.3 ± 0.5 ^E	6.9 ± 0.1 ^{EF}	4.3 ± 0.7 ^{EF}	6.8 ± 0.4 ^{EF}	5.9 ± 0.8 ^{EF}	1.8 ± 0.1 ^G
BL60	8.1 ± 0.4 ^E	6.9 ± 0.3 ^{EF}	4.6 ± 0.8 ^{EF}	5.6 ± 0.3 ^{EF}	5.3 ± 0.5 ^{EF}	2.5 ± 0.8 ^{FG}
BL61	8.6 ± 0.7 ^E	10.4 ± 0.7 ^{DE}	3.9 ± 1.0 ^{EF}	5.9 ± 0.4 ^{EF}	6.4 ± 0.1 ^{EF}	1.0 ± 0.1 ^G
BL64	5.4 ± 0.4 ^{EF}	3.9 ± 0.6 ^{EF}	2.1 ± 0.7 ^{FG}	5.0 ± 0.2 ^{EF}	5.5 ± 0.5 ^{EF}	2.2 ± 0.3 ^{FG}
BL74	24.3 ± 2.3 ^A	18.0 ± 2.3 ^{BC}	6.6 ± 1.6 ^{EF}	10.8 ± 1.0 ^{DE}	14.3 ± 0.4 ^C	3.3 ± 0.6 ^{FG}

Means followed by different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Table 2 shows the PB experimental design for 12 trials with two levels for each variable and its corresponding lipolytic activity, which varied between 0.5 and 26.7 U/L. This variation reflects the importance of optimization to obtain high enzyme production. Although the kinetics of growth has been followed up to 60 hours of cultivation, the largest enzyme activities were observed with 48 hours of cultivation.

The maximum lipolytic activity (26.73 U/L) was obtained in the following conditions: soybean oil and olive oil, 5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L; glycerol, 30 g/L; initial pH, 5.0; 37 °C; inoculum optical density, 5 %; absence of Triton X-100 and gum arabic. Lin *et al.* (2006), working with *Antrodia cinnamomea*, obtained lipolytic activity, 27 U/L using glycerol (50 g/L) as a carbon source for producing lipase. Bhatnagar *et al.* (2005), found lipolytic activity maximum of 45 U/L, working with pH 7.5 and temperature in the range of 35 to 40 °C in a culture of halobacteria *Natronococcus* sp.

Among the studied variables, only the inoculum concentration presented no significant effect on confidence level of 95 % in lipase production. Some authors reported that lipases generally are heavily influenced by presence of oils in the culture medium (VOLPATO *et al.*, 2008; BURKERT *et al.*, 2004). In this study, in contrast, the oils (olive and soybean) presented negative effect in the PB experimental design, i.e., when raised from the lower level (5 g/L) to the higher level (20 g/L) the lipolytic activity decreased.

Iqbal and Rehman (2015) utilized different concentrations of oil and when the concentration has exceeded 2% microbial growth decreased. The microorganisms have the ability to use oil as carbon source, however the high concentration of this

substrate may be toxic to the cell. According to Magdouli *et al.* (2017) the depletion of the carbon source (glucose or glycerol) may lead the microorganism to consume the sources of oil, and the increased concentration can lead to decreased activity.

The source of nitrogen is also an important factor for lipase production. In our study, the addition of an inorganic nitrogen source, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, showed significant effect on lipolytic activity and consequently decreased the proteolytic activity, according to previous experiments. This result is in line to that achieved by Chen *et al.* (1999), which studied the production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* in a medium containing 1 g/L of NH_4Cl to inhibit proteolytic activity. The emulsifiers, Triton X-100 (X_3) and gum arabic (X_4), which was added in order to facilitate and maintain emulsified the oils in the cultivation medium had negative effects on lipolytic activity. This result agrees with obtained by our group when study the lipase production by a *Staphylococcus* strain (VOLPATO *et al.*, 2008).

Thus, from this result, it was possible to select the variables that most influence in the lipase production by *Bacillus circulans* BL53, and their levels. The variables that showed significant positive effect, that is the increase in their value leads to an increase in lipase production were: glycerol and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration, and temperature. The variables that showed significant negative effect, that is the increase in their value leads to an increase in lipase production were: soybean oil, olive oil, Triton X-100, gum Arabic, initial pH. The experimental PB experimental design is exploratory, that is, it only indicates the variables and suggests the values of the levels to be studied to obtain the optimal conditions for cultivation.

CONCLUSIONS

In this study, we screened and selected Amazon *Bacillus* strains with lipolytic activity. The results demonstrated that the use of the qualitative solid agar tributyrin technique was an efficient way for the pre-selection of lipase-producing microorganisms, confirmed by the quantitative assay. The Plackett-Burman experimental design was successful used to select the variables that most influence the lipase production by *Bacillus circulans* BL53. Moreover, it was possible to select a microorganism with high lipolytic activity in a medium containing glycerol as a source of carbon. Furthermore, this work showed that the search and selection of microorganisms with lipolytic activities can facilitate the discovery of new lipases, with

potential use as by-product surplus, and this result is very important in the economic point of view, with respect to biotechnological processes.

REFERENCES

ABU, M. L.; NOOH, H. M.; OSLAN, S. N.; SALLEH, A. B. **Optimization of physical conditions for the production of thermostable lipase in *Pichia guilliermondii* strain SO using response surface methodology.** *BMC Biotechnol*, v.17, 2017.

BASSEGODA, A.; FILLAT, A.; PASTOR, F. I. J.; DIAZ, P. **Special *Rhodococcus* sp. CR-53 esterase Est4 contains a GGG(A)X-oxyanion hole conferring activity for the kinetic resolution of tertiary alcohols.** *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 19, p. 8559–8568, 2013.

BHATNAGAR, T.; BOUTAIBA, S.; HACENE, H.; CAYOL, J. L.; FARDEAU, M. L.; OLLIVIER, B.; BARRATI, J. C. **Lipolytic activity from Halobacteria: Screening and hydrolase production.** *FEMS Microbiol Lett*, v. 248, p. 133-140, 2005.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. **Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design.** *Biores Technol*, v. 91, p. 77-84, 2004.

CHEN, J.Y.; WEN, C. M.; CHEN, T. L. **Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*.** *Biotechnol Bioeng*, v. 62, p. 311-316, 1999.

GUPTA, N.; MEHRA, G.; GUPTA, R. **A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett-Burman design and by response surface methodology.** *Canadian J Microbiol*, v. 50, p. 361-368, 2004.

IMANDI, S. B.; KARANAM, S. K.; GARAPATI, H. R. **Use of Plackett-Burman design for rapid screening of nitrogen and carbon sources for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from mustard oil cake (*Brassica napus*).** *Braz J Microbiol*, v. 44, p. 915-921, 2014.

IQBAL, S. A.; REHMAN, A. **Characterization of Lipase from *Bacillus subtilis* I-14 and Its Potential Use in Oil Contaminated Wastewater.** *Brazilian archives of biology and technology*, v. 58, p. 789-797, 2015.

LI, C. Y.; CHEN, S. J.; CHENG, C. Y.; CHEN, T. L. **Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase with repeated fed-batch culture.** *Biochem Eng J*, v. 25, p. 195–199, 2005.

LIN, E.S.; WANG, C. C.; SUNG, S. C. **Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture.** *Enzyme Microb Technol*, v. 39, p. 98–102, 2006.

MAGDOULI, S.; GUEDRI, T.; TAREK, R.; BRAR, S. K.; BLAIS, J. F. **Valorization of raw glycerol and crustacean waste into value added products by *Yarrowia lipolytica***. *Bioresource Technology*, v. 243, p. 57-68, 2017.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. **The design of optimum multifactorial experiments**. *Biometrika*, v. 33, p. 305-325, 1947.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. **Evaluation of medium componentes by Plackett-Burman statistical disgn for lipase production by *Candida rugosa* and kinetic modeling**. *Chinese Journal of Biothnology*, v. 24, p. 436-444, 2008.

RECH, F. R.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A. Z. **The effects of emulsified polydimethylsiloxane FG-10 on the oxygen transfer coefficient (kLa) and lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17**. *J Chem Technol Biotechnol*, v. 87, p. 990–995, 2012.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. **Overview of fungal lipase: a review**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 166(2), p. 486–520, 2012.

VASIEE, A.; BEHBAHANI, B.; YAZDI, F. T.; MORADI, S. **Optimization of the production conditions of the lipase produced by *Bacillus cereus* from rice flour through Plackett-Burman Design (PBD) and response surface methodology (RSM)**. *Microb Pathog*, v. 101, p. 36-43, 2016.

VOLPATO, G.; RODRIGUES, R. C.; HECK, J. X.; AYUB, M. A. Z. **Production of organic solvent tolerant lipase by *Staphylococcus caseolyticus* EX17 using raw glycerol as substrate**. *J Chem Technol Biotechnol*, v. 83, p. 821-828, 2008.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. **Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens***. *J Bacteriol*, v. 138, p. 663-670, 1979.

Indução à anestesia e recuperação de *Betta splendens* (Regan, 1910): uma proposta de utilização de um anestésico de baixo custo para uma espécie de peixe ornamental de grande apelo comercial

Daniela Sanches Ilgenfritz

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(dani.fritz79@gmail.com)

Pâmella Chavez Ortiz

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(pamellac.ortiz@gmail.com)

Caroline Pavin Lacerda

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(carolpavin@msn.com)

Ângelo Cássio Magalhães Horn

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(angelo.horn@poa.ifrs.edu.br)

Resumo: A manipulação sofrida por peixes destinados à comercialização gera um estado de estresse que favorece a contração de doenças e/ou a morte. Uma alternativa é a sedação/anestesia. Neste contexto, o óleo de cravo surge como uma alternativa promissora, pois induz a anestesia e propicia uma rápida recuperação. O objetivo do presente trabalho foi propor a concentração de óleo de cravo que melhor se adequa à indução da anestesia em *Betta splendens* e a sua recuperação. Para isto exemplares de *B. splendens* foram submetidos a soluções de óleo de cravo nas concentrações de 10, 25, 50, 75, 100 ou 150mg/L ou a uma solução de álcool etílico com concentração de 1.075mg/L. Os resultados demonstraram não haver indução à anestesia quando utilizada a concentração de 10mg/L ou a exposição dos espécimes ao álcool etílico. Para outras concentrações de óleo de cravo percebeu-se uma redução na latência da anestesia com o aumento da concentração. O tempo de recuperação mostrou aumento quando concentrações de 25mg/L e 50mg/L foram comparadas. Conclui-se que a concentração de 25mg/L é a melhor escolha para a anestesia de *B. splendens* em razão de sua latência e do maior tempo para que o último estágio de anestesia seja alcançado.

Palavras-chave: *Betta splendens*; Anestesia; Óleo de cravo.

Induction to anesthesia and recovery of *Betta splendens* (Regan, 1910): a proposal for the use of a low-cost anesthetics for an ornamental fish species of great commercial appeal

Abstract: The manipulation suffered by commercial fish generates a state of stress that favors the contraction of diseases and/or death. An alternative is sedation/anesthesia. In this context, clove oil appears as a promising alternative, as it induces anesthesia and provides a rapid recovery. The aim of the present study was to propose the concentration of clove oil that is best suited to the induction of anesthesia in *Betta splendens* and its recovery. For this, *B. splendens* samples were submitted to solutions of clove oil at the concentrations of 10, 25, 50, 75, 100 or 150mg/L or to a solution of ethyl alcohol with concentration of 1.075mg/L. The results showed no induction to anesthesia when the concentration of 10mg/L is used or the exposure of the specimens to ethyl alcohol occurs. For other concentrations of clove oil, a decrease in the latency of the anesthesia was observed with increasing concentrations. The recovery time showed an increase when concentrations of 25mg/L and 50mg/L were compared between them. It is concluded that the concentration of 25mg/L is the best choice for the anesthesia of *B. splendens* because of its latency and the longer time for the last stage of anesthesia to be reached.

Keywords: *Betta splendens*; Anesthesia; Clove oil.

INTRODUÇÃO

A manipulação, invariavelmente, submete os animais que não estão habituados com esta prática a um estado de estresse. Para os peixes destinados a ornamentação ou ao consumo esta é uma condição extremamente prejudicial, uma vez que os conduz a aquisição de doenças ou a morte.

Uma alternativa visando reduzir o estresse causado pela manipulação é a sedação ou a anestesia. Há uma série de substâncias que atuam com esta finalidade, sendo a mais utilizada para peixes, por recomendação de diferentes órgãos que tratam de questões éticas referentes ao uso de animais nas mais diferentes áreas como o Conselho Federal de Medicina Veterinária do Brasil e a Associação Americana de Medicina Veterinária, os barbitúricos e seus derivados, (CFMV, 2002; AVMA, 2007). No Brasil, o anestésico mais utilizado com este fim é a benzocaína (ethyl-p-aminobenzoato) (GOMES *et al.*, 2001). Apesar de ser um anestésico eficiente, apresentando uma série de aspectos favoráveis (NEIFFER e

STAMPER, 2009), não é fácil de ser obtido, além de não possuir o melhor custo-benefício quando comparado a outras alternativas (SOUZA, *et al.*, 2012).

É consenso que o anestésico ideal deve produzir uma rápida indução à anestesia e à recuperação, gerando o mínimo de estresse; deve resultar em imobilização por tempo suficiente para o procedimento desejado e deve ter grande margem de segurança para o animal, para quem o manipula e para o ambiente (GOODMAN, 2012). Neste contexto, o óleo de cravo da Índia vem sendo cada vez mais utilizado. Além de atender aos critérios citados acima, contudo, com um tempo de recuperação um pouco mais longo quando comparado a outros anestésicos, é de fácil obtenção e possui um excelente custo-benefício (NEIFFER e STAMPER, 2009).

O óleo de cravo é um produto natural extraído do cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*; sinônimo *Cariophyllus aromaticus*), sendo utilizado por seres humanos como anestésico tópico para dores de dente, de cabeça e nas articulações, desde a antiguidade (ROSS e ROSS, 2008). O efeito anestésico do óleo de cravo deve-se ao eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol), isoeugenol e metileugenol, mas principalmente ao primeiro, que corresponde a aproximadamente 84% do conteúdo da substância vendida comercialmente (NEIFFER e STAMPER, 2009; JAVAHERY *et al.*, 2012).

Muitos são os trabalhos experimentais que mais recentemente descreveram e/ou mensuraram os efeitos do óleo de cravo ou do eugenol como anestésico para diferentes espécies de peixes (HISANO *et al.*, 2008; PEREIRA-DA-SILVA *et al.* 2009; SIMÕES *et al.*, 2010; DELBON e RANZANI PAIVA, 2012; DIMER *et al.*, 2012; ROTILI *et al.* 2012), com excelentes resultados, quanto a indução da anestesia e manutenção dos valores normais das variáveis fisiológicas, como os níveis de hormônios plasmáticos, a quantidade de células sanguíneas e a glicemia, dos animais testados (HOLLOWAY *et al.*, 2004; VELISEK *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2011). Seus efeitos como anestésico acabaram, inclusive, superando os efeitos obtidos por outras substâncias como a triclaína metano sulfonato (TMS ou MS-222), um derivado da benzocaína, amplamente utilizado e recomendado como anestésico na pesquisa com peixes, e a própria benzocaína (GRUSH *et al.*, 2004; HOLLOWAY *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2009, SOUZA *et al.* 2012).

Apesar de eficiente, de fácil obtenção e reduzido valor frente a outros anestésicos, a dosagem a ser utilizada para se obter o efeito anestésico varia com a espécie, a massa e a fase de desenvolvimento do peixe, assim como, o valor das

variáveis ambientais e a temperatura (BORSKI e HODSON, 2003; NEIFFER e STAMPER, 2009; GOODMAN, 2012; JAVAHERY *et al.*, 2012).

Betta splendens (Regan 1910) (Actinopterygii, Anabantoidei), também chamado de “a joia do oriente” ou “Betta esplêndido” por alguns criadores, é um peixe da subordem anabantoidei (ITIS, 2006), oriundo de diversos países da Ásia, como a Tailândia, a Indonésia, o Vietnã e a China, e que apresenta um comportamento tipicamente territorialista, demonstrando grande agressividade frente a um potencial invasor/competidor da mesma espécie (FARIA *et al.*, 2006; KARINO e SOMEYA, 2007; VERBEEK *et al.*, 2007). Em razão de constituírem-se em peixes ornamentais de fácil manutenção, possuem grande apelo comercial e, em decorrência disso, um número significativo de informações referentes a aspectos de sua biologia e criação (BORUCHOWITZ, 2006; FARIA *et al.*, 2006; GOLDSTEIN, 2012; TULLOCK, 2006). Por outro lado, estudos propositivos tentando reduzir o estresse (e também, a morte, direta ou indiretamente associada ao estresse) causado pela manipulação, com fins comerciais ou científicos, são limitados para esta espécie (SOMMANI *et al.*, 1999; PATTANASIRI *et al.*, 2008; PATTANASIRI *et al.*, 2016).

O objetivo deste trabalho foi propor a concentração de óleo de cravo que melhor se adequa à indução da anestesia e ao tempo de recuperação em exemplares adultos de *B. splendens*, visando reduzir o estresse dos animais durante a sua manipulação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Trinta e seis espécimes adultos de *B. splendens*, de ambos os sexos, foram obtidos em um comércio local e levados ao Laboratório de Histologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) – Campus Porto Alegre, onde foram mantidos por uma semana em recipientes individuais, nos quais não era permitido que mantivessem contato visual com outros animais, para aclimação. Os recipientes possuíam 0,5L de água, com salinidade de 0,3%. Todos os indivíduos foram submetidos à iluminação natural e temperatura em torno dos 28°C, sendo alimentados, duas vezes ao dia com ração comercial. Duas vezes

durante a semana foram medidos o pH e os níveis de amônia e nitritos da água, sendo esta parcialmente (25% do volume total) substituída.

Todos os procedimentos adotados nesta pesquisa com os espécimes respeitaram a Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (BRASIL, 2008), de 8 de outubro de 2008, regulamentada pelo Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 (BRASIL, 2009) e a Resolução 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais (CFMV, 2002)

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil (Protocolo nº 22625).

Desenho experimental

Os animais foram divididos em sete grupos de 3 a 4 animais e, após jejum de 40 horas, colocados em contato com uma solução de óleo de cravo nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100 e 150mg/L, assim como com uma solução de álcool etílico na concentração de 1.075mg/L (que corresponde a maior concentração de álcool etílico encontrada entre as soluções de óleo de cravo).

Foram utilizados dois aquários de igual tamanho (200mm comprimento X 90mm profundidade X 150mm de altura) e com igual volume de água (1,5L). A água utilizada em ambos possuía as mesmas temperatura e salinidade utilizadas nos recipientes destinados à aclimatação. No primeiro aquário (aquário para anestesia, Figura 1) eram misturadas à água uma solução de óleo de cravo previamente solubilizada em etanol 95% (solução estoque) ou apenas etanol, até que se atingissem as concentrações descritas anteriormente. No segundo, apenas água (aquário para recuperação). Cada indivíduo, então, era introduzido no primeiro aquário, depois de intensa oxigenação da água por 5 minutos, e o tempo de indução à anestesia (em minutos), cronometrado e anotado. Após, os animais eram transferidos para o segundo aquário, iniciando a contagem do tempo de recuperação (em min).

Figura 1 - Aquário para anestesia.



Fonte: os autores.

O tempo de permanência no aquário para anestesia se estendia até o animal atingir o estágio 4 de anestesia (Quadro 1) ou ter completado uma hora no mesmo. Ao contrário da anestesia, não foi estabelecido um tempo máximo para a permanência no aquário para a recuperação.

Após recuperados, os animais tiveram o seu comprimento padrão e massa aferidos, utilizando-se um paquímetro analógico série 125 (Starrett, Brasil), em milímetros, e uma balança semianalítica BK300 (Gehaka, Brasil), em gramas, respectivamente.

Passada a manipulação experimental os animais foram observados por uma semana e a fim de registrar possíveis mortes.

Anestésico

O óleo de cravo extraído de *Cariophyllus aromaticus* (densidade de 1,04 g/ml) foi obtido em farmácia de manipulação e diluído em etanol 95% a 10%, para facilitar sua solubilização em água (solução estoque). Esta solução estoque foi, então, diluída na água do aquário para anestesia até obter-se as concentrações desejadas para os grupos de animais utilizados, sendo intensamente oxigenada por 5 minutos antes da introdução do animal em seu interior, como descrito anteriormente.

Estágios de anestesia e recuperação

Foram identificados para os peixes submetidos ao óleo de cravo, pelas características comportamentais, quatro estágios de anestesia e mais a recuperação. O tempo (em minutos) que cada animal levou para atingir cada um dos estágios de anestesia foi anotado e uma tabela representando a relação entre a concentração do anestésico, o estágio de anestesia e este tempo, construída (Tabela 1). Da mesma forma o tempo (em minutos) necessário para que cada animal se recuperasse da anestesia foi registrado e expresso nesta mesma tabela (Tabela 1).

Os estágios de anestesia e a recuperação utilizados foram aqueles descritos por WOODY *et al.*, (2002) e caracterizados no Quadro 1.

Quadro 1 - Características comportamentais para peixes durante diferentes estágios de anestesia e recuperação.

Estágio de anestesia	Características comportamentais
1	Movimentos operculares lentos ou erráticos
2	Dificuldade de manter a posição normal de nado enquanto parado e perda esporádica do equilíbrio.
3	Perda completa do equilíbrio com incapacidade de assumir a posição normal de nado.
4	Sem reação à manipulação ou a um forte estímulo no pedúnculo caudal.
Recuperação	Recuperação da posição normal de nado e da capacidade de nadar horizontalmente.

Fonte: WOODY *et al.* (2002).

RESULTADOS

Nossos resultados demonstraram que os exemplares de *B. splendens*, de ambos os sexos, com comprimento padrão entre 27,2mm e 44,8mm e massa variando de 0,61g a 2,29g, apresentaram uma latência menor para ingressar nos estágios de anestesia com valores mais altos a medida que a concentração do anestésico ao qual foram expostos aumentou (Tabela 1). Por exemplo, animais expostos a concentrações de anestésico de 25mg/L atingiram o estágio 3 apenas depois de transcorridos 7 minutos do início da exposição ao óleo de cravo, enquanto

animais submetidos a uma concentração de 100mg/L atingiram o mesmo estágio já no primeiro minuto de exposição (Tabela 1).

Não houve indução à anestesia quando se utilizou a concentração de 10mg/L de óleo de cravo, mesmo depois de transcorrida uma hora da exposição ao anestésico (Tabela 1).

Por outro lado, o tempo de recuperação dos animais apresentou grande variação entre as diferentes concentrações e entre os diferentes animais submetidos a uma mesma concentração do anestésico (Tabela 1). Cabe atentar que, como exemplo, ao comparar animais expostos à uma concentração de óleo de cravo de 25mg/L com aqueles submetidos a uma concentração equivalente a 100mg/L, o tempo máximo necessário à recuperação dos representantes do segundo grupo é inferior ao tempo máximo de recuperação obtido pelos animais do primeiro grupo, não fazendo qualquer sentido a não ser sob a lógica da variabilidade.

O álcool etílico, em uma concentração equivalente a 1.075mg/L, valor igual à maior concentração desta substância misturada ao óleo de cravo (encontrada na solução de óleo de cravo de 150mg/L) e com o papel de aumentar a solubilidade do anestésico à água, não apresentou qualquer efeito anestésico.

Transcorrida uma semana da exposição à solução de óleo de cravo ou a de álcool etílico não houve morte de qualquer espécime testado.

Indução a anestesia e recuperação de *Betta splendens* (Regan, 1910): uma proposta de utilização de um anestésico de baixo custo para uma espécie de peixe ornamental de grande apelo comercial

Tabela 1 - Tempo para indução aos estágios de anestesia e para a recuperação em *B. splendens* expostos a soluções de óleo de cravo com diferentes concentrações.

Concentração (mg/L)	Anestesia (min)																Recuperação (min)	
	10										20		30	40	50	60		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20						
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N
25	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	2,3	2,4	2	2,3	2,3	2,3	2-8
50	1	1,2	1,2,3	2,3	2,3	3	3	3	3	3	3,4	3,4	4	-	-	-	-	9-12
75	1,2	2,3	2,3	3	3,4	3	3	3	3,4	3	4	-	-	-	-	-	-	5-13
100	1,2,3	3	3	3	3,4	3,4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5-7
150	1,2,3	3	3,4	3,4	3	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5-10

0, Ausência de anestesia; 1, Estágio 1; 2, Estágio 2; 3, Estágio 3 e 4, Estágio 4. N, Não houve necessidade de recuperação.

DISCUSSÃO

Apesar do efeito anestésico do óleo de cravo já ter sido aferido em *B. splendens* (PATTANASIRI *et al.*, 2008), tanto as concentrações utilizadas quanto os tempos de permanência dos animais em contato com a substância foram diferentes daqueles propostos em nosso trabalho. Enquanto, no trabalho de 2008 as concentrações variavam de 5 a 100ppm e o tempo de exposição máximo era de 48 horas em nosso trabalho a concentração máxima foi de 150mg/L e o tempo máximo de 60min.

Diferente do trabalho de PATTANASIRI *et al.*, (2008), concentrações iguais a 10mg/L, na presente pesquisa, não induziram à anestesia, nem mesmo após transcorrida uma hora de exposição. Por outro lado, todas as concentrações de óleo de cravo iguais ou superiores a 25mg/L conduziram à anestesia os exemplares de *B. splendens* já no primeiro minuto dos testes. No trabalho de 2008, a uma concentração de 20ppm, o óleo de cravo induziu a anestesia apenas após transcorridos 30min de exposição, ocorrendo o mesmo com uma concentração ligeiramente inferior (15ppm). Concentração capaz de induzir a anestesia depois de transcorridos 5 minutos de contato dos peixes com o anestésico foi observada apenas em concentrações superiores a 50ppm (PATTANASIRI *et al.*, 2008). Tais discrepâncias observadas entre os dois trabalhos podem ser explicadas pela concentração de eugenol encontrada nas amostras de óleo de cravo utilizadas, uma vez que os autores citados acima obtiveram o óleo de *Syzigium aromaticum*.

Adicionalmente, a presente investigação mostrou que a latência para se atingir estágios de anestesia cada vez mais altos (do 1 ao 4) tornou-se cada vez menor a medida que havia um aumento na concentração do anestésico, concluindo-se que a ação do óleo de cravo na indução à anestesia, mostrou um padrão dose-dependente. Tal dado concorda com aquele já expresso para *B. splendens* (PATTANASIRI *et al.*, 2008) e para outras espécies de peixes que utilizaram o óleo de cravo como anestésico (WOODY *et al.*, 2002; HISANO *et al.*, 2008; NEIFFER e STAMPER, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009; PEREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009; SIMÕES *et al.*, 2010). Assim, utilizando-se a concentração de 25mg/L, os estágios 2 e 3 são obtidos após transcorridos 7 minutos de exposição, enquanto o estágio 4 só advém aos 20 minutos de contato do animal com o anestésico. Para todas as demais concentrações os estágios 2 ou 3 são obtidos já nos primeiros 2 minutos de

exposição, enquanto o estágio 4 é observado após 15 minutos, para uma concentração de 50mg/L, 5 minutos, para concentrações de 75mg/L e 100mg/L e 3 minutos para a concentração de 150mg/L.

Desta forma, com base na latência observada, a concentração de óleo de cravo de 25mg/L parece ser a que melhor se adequa a reduzir o estresse causado pela manipulação com certa margem de segurança, uma vez que exige um tempo para a indução à anestesia (estágio 1) reduzido (1 a 15min) e cerca de trinta minutos para que o estágio 4 seja alcançado, estágio este que poderia conduzir o animal à morte pela interrupção da ventilação e redução do débito cardíaco (AVMA, 2007).

Além da concentração indicada acima outras concentrações poderiam vir a ser testadas com a mesma finalidade, como concentrações intermediárias entre os 10mg/L e 25mg/L.

Quanto ao tempo de recuperação, surpreendentemente, os dados não mostraram a existência de uma clara relação dose-dependente (quanto maior a concentração do anestésico maior o tempo de recuperação), como ocorre com outros peixes (PEREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009; SIMÕES *et al.*, 2010) e mesmo com *B. splendens* (PATTANASIRI *et al.*, 2008). Apesar de se observar um padrão de dose-dependência quando comparadas as concentrações de 25mg/L e 50mg/L, percebe-se, que o tempo máximo de recuperação de animais expostos a concentrações de 100mg/L e 150mg/L são menores do que daqueles exemplares submetidos a concentrações de 25mg/L e 50mg/L, respectivamente. Esta discrepância parece ser resultado de fatores intrínsecos, próprios dos animais testados, e está calcada na variabilidade intraespecífica da população amostrada. Uma maneira de reduzir esta variabilidade seria aumentando o número de animais testados em cada uma das concentrações propostas.

Concluindo, este trabalho objetivou testar a ação de diferentes concentrações de óleo de cravo na indução da anestesia e no tempo de recuperação de exemplares adultos de *B. splendens*, com a finalidade de propor sua utilização na redução do estresse causado pela manipulação. Os dados apontam que a concentração de 25mg/L de óleo de cravo é a que melhor se adequa ao objetivo proposto, em razão de sua latência reduzida e do longo tempo necessário para conduzir o animal ao estágio mais profundo de anestesia.

REFERÊNCIAS

- AVMA. **American Veterinary Medical Association**: Guidelines on Euthanasia. (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia). Disponível em: <http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf>. Acesso em: 19 de setembro. 2007.
- BORSKI, R.J., HODSON, R.G. **Fish Research and the Institutional Animal Care and Use Committee**. *ILAR Journal*, 44(4): 286-294. 2003.
- BORUCHOWITZ, D. E. **Aquarium Care of Bettas**. Neptune City: Tfh Pubns Inc. 2006.
- BRASIL. Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008. Procedimentos para o Uso Científico de Animais. In: *Diário Oficial da União*, Brasília, v. 145, n. 196. p.1. 2008.
- BRASIL. **Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009**. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. In: *Diário Oficial da União*, Brasília, n. 134. p.2. 2009.
- CFMV. **Resolução n. 714, de 20 de julho de 2002**. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia e animais, e dá outras providências. In: *Diário Oficial da União*, Brasília, n. 118. p.201. 2002.
- DELBON, M.C., RANZANI PAIVA, M. J. T. **Eugenol em juvenis de tilápia do Nilo**: concentrações e administrações sucessivas. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 38(1): 43-52. 2012.
- DIEMER, O., NEU, D. H., BITTENCOURT, F., SIGNOR, A., BOSCOLO, W.R., FEIDEN, A. **Eugenol como anestésico para jundiá (*Rhamdia voulezi*) em diferentes pesos**. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 33(4): 1495-1500. 2012.
- FARIA, P. M. C.; CREPALDI, D. V.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, L. P.; SOUZA, A. B.; CARVALHO, D. C.; MELO, D. C. SALIBA, E. O. S. **Criação, manejo e reprodução do peixe *Betta splendens* (Regan, 1910)**. *Rev. Bras. Reprod Anim.* 30(3/4): 134-149, 2006.
- GOLDSTEIN, R. J. *Bettas: Barron's complete pet Owner's Manuals*. 2 ed. New York: Barron's Educational Series. 2012.
- GOMES, L.C.; CHIPPAR-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M. **Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Collossoma macropomum***. *Journal of the World Aquaculture Society*, Baton Rouge, 32 (4): 426-431. 2001.

GOODMAN, G. **Guidelines for anaesthesia and analgesia of fish**. Disponível em: < <http://www.norecopa.no/norecopa/vedlegg/Guidelines-for-anaesthesia-and-analgesia-of-fish.pdf> >. Acesso em 21 de setembro. 2012.

GRUSH, J., Noakes, D.L.G, Moccia, R.D. **The Efficacy of Clove Oil as an anesthetic for the Zebrafish, *Danio rerio*** (Hamilton), *Zebrafish*, 1(1):46-53. 2004.

HISANO, H., ISHIKAWA, M. M., FERREIRA, R. A., BULGARELLI, A. L. A., COSTA, T. R., PÁDUA, S. B. **Tempo de indução e de recuperação de dourados *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), submetidos a diferentes concentrações de óleo de cravo *Eugenia sp.*** *Acta Sci. Biol. Sci.*, 30(3): 303-307. 2008.

HOLLOWAY, A. C., KEENE, J. L., NOAKES, D. G., MOCCIA, R.D. **Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss***, Walbaum. *Aquaculture Research*, 35: 1025-1030. 2004.

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM (ITIS). **Catalog of fishes**. Disponível em <http://www.itis.usda.gov>. Acesso em 16 de março de 2011.

JAVAHERY, S., NEKOUBIN, H., MORADLU, A. H. **Effect of anesthesia with clove oil in fish** (Review). *Fish Physiol. Biochem.*, 38: 1545-1552. 2012.

KARINO, K.; SOMEYA, C. **The influence of sex, line, and fight experience on aggressiveness of the Siamese fighting fish in intrasexual competition**. *Behavioural Process*. 75: 283-289, 2007.

MOREIRA, A.G.L., TEIXEIRA, E. G., MOREIRA, R. L., FARIAS, W. R. L. **Glicose plasmática em juvenis de tilápia do Nilo anestesiados com óleo de cravo**. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, Salvador, 12(3): 794-804. 2011.

NEIFFER, D. L., STAMPER, M. A. **Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs**. *ILAR Journal*, 50(4): 343-360. 2009.

OLIVEIRA, J. R., CARMO, J. L., OLIVEIRA, K. K. C., SOARES, M. C. F. **Cloreto de sódio, bezocaína e óleo de carvo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-nilo**. *R. Bras. Zootec.*, 38(7): 1163-1169. 2009.

PATTANASIRI T., TAPARHUDEE, W., SUPPAKUL P. **Antianxiety activity of clove oil and its principal constituent, and possible application in active packaging for transportation of Siamese fighting fish**. *The Proceedings of 16th IAPRI World Conference on Packaging*. June 8-12, 2008. Bangkok, Thailand.

PATTANASIRI T., TAPARHUDEE, W., SUPPAKUL P. **Anaesthetic efficacy of clove oil-coated LDPE bag on improving water quality and survival in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*, during transportation**. *Aquacult int*, DOI: 10.1007/s10499-016-0022-0. 2016.

PEREIRA-DA-SILVA, E. M., OLIVEIRA, R. H. F., RIBEIRO, M. A. R., COPPOLA, M. P. **Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari.** *Ciência Rural*, Santa Maria, 39(6): 1851-1856. 2009.

ROTILI, D. A., DEVENS, M. A., DIEMER, O., LORENZ, E. K., LAZZARI, R., BOSCOLO, W. R. **Uso do eugenol como anestésico em pacu.** *Pesq. Agropec. Trop.*, Goiânia, 42(3): 288-294. 2012.

ROSS, L. G., ROSS, B. **Anaesthetic & Sedative Techniques for Aquatic Animals.** 3rd Ed. Oxford: Blackwell Publishing. 2008. 221p.

SIMÕES, L. N., PAIVA, G., GOMES, L. C. **Óleo de cravo como anestésico em adultos de tilápia-do-nilo.** *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 45(12): 1472-1477. 2010.

SOMMANI, A., KERDKRIENGKAI, S., INGKAPAIROJ, N. **Effect of MS-222 and Benzocaine to the transportation of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan).** *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 33: 368-376. 1999.

SOUZA, R. A. R., CARVALHO, C.V.A., NUNES, F. F., SCOPEL, B. R., GUARIZI, J. D., TSUZUKI, M. Y. **Efeito comparativo da benzocaína, mentol e eugenol como anestésicos para juvenis de *Robalo peva*.** *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 38(3): 247-255. 2012.

TULLOCK, J. H. **Betta: Your Happy Healthy Pet.** 2 ed. New York: Howell Book House. 2006.

VELISEK, J, WLASOW, T., GOMULKA, P., SVOBODOVA, Z. NOVOTNY, L, ZIOMEK, E. **Effects of Clove Oil and Anaesthesia on European Catfish (*Silurus glanis* L.).** *Acta Vet. Brno*, 75: 99-106. 2006.

VERBEEK, P.; IWAMOTO, T.; MURAKAMI, N. **Differences in aggression between wild-type and domesticated fighting fish are context dependent.** *Anim. Behav.* 73: 75-83, 2007.

WOODY, C.A., NELSON, J., RAMSTAD, K. **Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials.** *Journal of Fish Biology*, 60: 340-347. 2002.

Análise anatômica e histoquímica das folhas de *Eugenia uniflora* L.

Amanda Brandt Beschorner

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(mandybeschorner@hotmail.com)

Márcia Bündchen

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(marcia.bundchen@poa.ifrs.edu.br)

Resumo: *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) é uma árvore nativa cujas folhas têm propriedades farmacológicas conhecidas da tradição popular. Visando complementar as abordagens anatômicas e fitoquímicas sobre a espécie, realizou-se a caracterização das suas folhas. Folhas completamente expandidas foram coletadas de dez plantas adultas, fixadas em FAA₇₀ e armazenadas em etanol 70%. Para as análises anatômicas, secções transversais e paradérmicas da lâmina foliar foram coradas e analisadas sob microscopia de luz e em microscopia eletrônica de varredura (MEV). A epiderme unisseriada é coberta com uma cutícula estriada. A folha é hipoestomática e tem estômatos paracítico com distribuição aleatória. Tricomas tectores unicelulares ocorrem predominantemente na região da nervura central somente na face abaxial da folha. O mesofilo é dorsiventral e cavidades secretoras com conteúdo lipídico adentram o parênquima clorofiliano, em posição subepidérmica. Cristais de oxalato de cálcio ocorrem distribuídos no mesofilo e nos bordos foliares. A nervura central apresenta feixe vascular bicolateral envolvido pela bainha esclerenquimática e colênquima anelar. Nossos resultados contribuem para a consolidação do conhecimento anatômico sobre *Eugenia uniflora* L.

Palavras-chave: Anatomia foliar; Pitangueira; Histologia vegetal.

Anatomical and histochemical analysis of *eugenia uniflora* L. Leaves

Abstract: *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) is a native tree whose leaves have pharmacological properties that are known from the folk tradition. In order to complement the anatomical and phytochemical approaches about this species, the characterization of its leaves was carried out. Fully expanded leaves were collected from ten adult plants, fixed in FAA₇₀ and stored in 70% ethanol. For anatomic analyses leaf blade transverse and paradermal sections were stained for observations under light microscopy, by scanning electron microscopy (SEM). The uniserial epidermis is covered with a striate cuticle. The leaf is hypostomatic, with paracitic stomata randomly distributed. Simple unicellular trichomes occur predominantly on the midrib region only on the abaxial side of the leaf. The mesophyll is dorsiventral and there are secretory cavities with lipidic content sunken in the chlorophyllous parenchyma, in subepidermal position. Calcium oxalate crystals occur distributed in the mesophyll and in the leaf margins. The midrib presents bicollateral vascular bundles surrounded by the

sclerenchymatic sheath and annular collenchyma. Our results contribute to the consolidation of the anatomical knowledge about *Eugenia uniflora* L.

Key words: Leaf anatomy; Pitangueira; Plant histology.

INTRODUÇÃO

As propriedades farmacológicas de *Eugenia uniflora* L., (Myrtaceae), a pitangueira, são bastante estudadas e conhecidas da cultura popular (LORENZI e ABREU, 2002). O uso empírico de pitanga é principalmente devido ao efeito hipotensor, mediado por uma atividade vasodilatadora direta e um efeito diurético fraco que pode estar relacionado a um aumento no fluxo sanguíneo renal (CONSOLINI *et al.*, 1999). As folhas de *E. uniflora* apresentam atividade antioxidante na redução da peroxidação lipídica, podendo servir como antibactericida e antifúngico (MARTINEZ-CORREA *et al.*, 2011; VICTORIA *et al.*, 2012), desempenhando atividade citotóxica (OGUNWANDE *et al.*, 2005) e atuando como fonte de nutracêuticos com atividade anti-tripanososoma, particularidade importante como alternativa para combater a doença de chagas (SANTOS *et al.*, 2012).

Métodos histoquímicos podem auxiliar no diagnóstico de compostos do metabolismo primário e secundário dos tecidos vegetais, como por exemplo, compostos fenólicos - ligninas, taninos, flavonoides, cumarinas, alcaloides, aminoácidos, açúcares, ceras e mucilagens e ainda, na determinação da composição botânica de misturas vegetais oriundas de misturas e pós vegetais, de pastagem animal, de fardos comercializados e de misturas farmacêuticas, além de subsidiar a Botânica Sistemática na identificação e subscrição das espécies (DÔRES, 2007).

E. uniflora apresenta uma composição química bastante complexa, incluindo óleos essenciais, sesquiterpenos, taninos, pigmentos flavonoides e antocianicos, saponinas, sais minerais e vitamina C, tanto nas folhas como nos frutos (LORENZI e ABREU, 2002). Além disso, é comum que, nas plantas, variações anatômicas decorram dos diferentes habitats nos quais os indivíduos se desenvolvem (DONATO e MORRETES, 2009; LARCHER e BOEGER, 2009). Neste contexto, a caracterização histoquímica auxilia não só na identificação da composição de

células e tecidos e como também na detecção de variações morfoanatômicas entre indivíduos ou populações de uma mesma espécie.

No presente estudo, métodos histoquímicos combinados com técnicas de microscopia óptica e eletrônica, foram utilizados com o objetivo de caracterizar a estrutura foliar de *E. uniflora*, complementando outros estudos anteriormente publicados sobre a espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Folhas maduras de dez plantas crescendo em condições naturais na região de Porto Alegre, RS (30°01'59" S; 51°13'48" W) foram coletadas, fixadas em FAA₇₀ no momento da coleta e, após 48 horas, mantidas em álcool 70%.

Secções paradérmicas e transversais foram obtidas manualmente, com auxílio de lâmina de aço. As secções obtidas à mão livre foram clarificadas com hipoclorito 40% e neutralizadas com água acidificada. Já neutralizadas, foram coradas a fim de identificar estruturas relevantes para os estudos histológicos e histoquímicos. Para vista paradérmica foi ainda utilizada a dissociação da epiderme e diafanização das folhas, de acordo com o protocolo de Franklin (1945).

Secções transversais foram também obtidas por meio de inclusão em glicol metacrilato, seguindo o protocolo do fabricante, seccionamento em micrótomo rotativo, coloração e montagem de lâminas permanentes.

Para análise histoquímica, foram utilizados os seguintes corantes: sudan III (lipídios), azul de toluidina (celulose, lignina, pectinas), reativo de lugol (amido), floroglucinol acidificado (lignina) e vermelho de rutênio (pectina) de acordo com os protocolos sugeridos por Kraus e Arduin (1997), Johansen (1940) e Venning (1954).

Após o processo de coloração, as amostras foram analisadas em microscópio óptico (MO) com luz polarizada modelo Diaghtech e os registros microfotográficos foram realizados no mesmo equipamento, munido de equipamento fotográfico.

Para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), amostras das folhas foram desidratadas em série ascendente de acetona, transferidas para o ponto crítico de CO₂ e aderidas ao suporte antes de serem submetidas ao processo de metalização com ouro. O material foi visualizado em microscópio JEOL JSM 6060 no Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CMM/UFRGS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A folha é hipostomática com estômatos que apresentam distribuição aleatória (Figura 1). As faces da epiderme são distintas, sendo que a face abaxial (Figura 2) apresenta células com paredes anticlinais com contorno sinuoso enquanto nas células da face adaxial (Figura 3), predomina o contorno levemente sinuoso a poliédrico, concordando com a descrição de Alvarez e Silva (2012) e Fiuza e colaboradores (2008).

Os estômatos paracíticos (Figura 4) de *E. uniflora* apresentam nos polos um espessamento cutinizado em “T” (Figura 4) não proeminente, indicado por Haron e Moore (1996) como típico das espécies de *Eugenia* do Novo Mundo e descrito por Machado, Costa e Fontenelle (1988) em *E. sulcata*.

A partir da dissociação da epiderme, observou-se a presença de tricomas tectores unicelulares (Figura 5) na face abaxial da lâmina foliar, conforme descrito por Alvarez e Silva (2012) que verificaram a presença deste tipo de tricoma ou suas cicatrizes em várias espécies do gênero. Alves Tresmondi e Longui (2008), no entanto, descrevem a folha como glabra. Raros tricomas unicelulares foram descritos por Donato e Morretes (2009) na face abaxial da lâmina foliar de *Eugenia florida*.

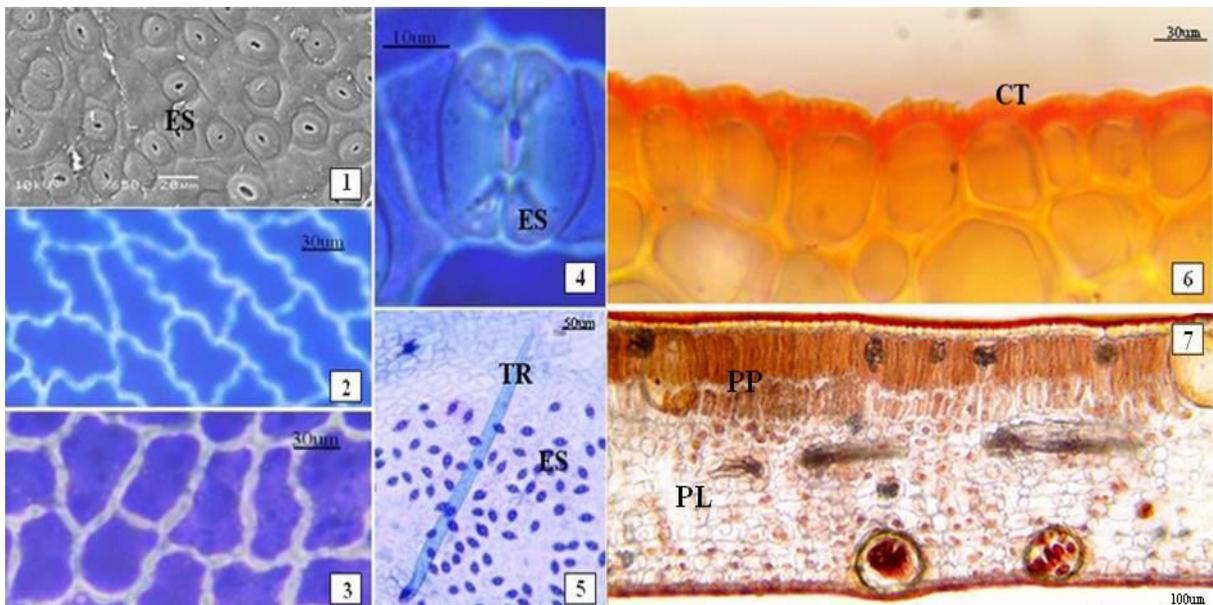
A epiderme foliar de *Eugenia uniflora* é unisseriada e recoberta com uma espessa cutícula estriada evidenciada com Sudan III em vista transversal (Figura 6). A maioria das características foliares evidenciadas foram anteriormente descritas por Alvarez e Silva (2012) e Alves, Tresmondi e Longui (2008), no entanto, a ocorrência de estômatos paracíticos contrasta com Fiuza e colaboradores (2008), que citam estômatos predominantemente, anomocíticos.

O mesofilo é dorsiventral (Figuras 7, 8 e 10) e, transversalmente, o parênquima paliçádico pode apresentar-se uni ou biestratificado (Figuras 10 e 7, respectivamente).

Com floroglucinol acidificado evidenciou-se a nervura central e o feixe vascular biclateral. O feixe encontra-se circundado por fibras esclerenquimáticas (Figura 9) em processo de lignificação, indicado pela reação mais intensa evidenciada no xilema. Pectinas foram identificadas com vermelho de rutênio no floema (Figura 11). Na região da nervura central não há parênquima clorofiliano e,

entre a epiderme e as fibras. são visualizadas camadas de colênquima anelar (Figuras 9 e 11).

Figura 1-7 - Distribuição aleatória dos estômatos na face abaxial da epiderme foliar de *E. uniflora* em MEV (1). Vista paradérmica das células da face abaxial (2) e adaxial (3) da epiderme foliar. Detalhe do estômato paracítico (4) e tricoma tector unicelular na face abaxial da epiderme foliar (5), coloração: Azul de toluidina; Detalhe da cutícula espessa (6). Vista transversal do limbo foliar com reação positiva para lipídios e parênquima paliçádico biestratificado (7), coloração: Sudan III. Legenda: Legenda: CT – cutícula, ES – estômatos, PL – parênquima lacunoso, PP – parênquima paliçádico, TR – tricoma.

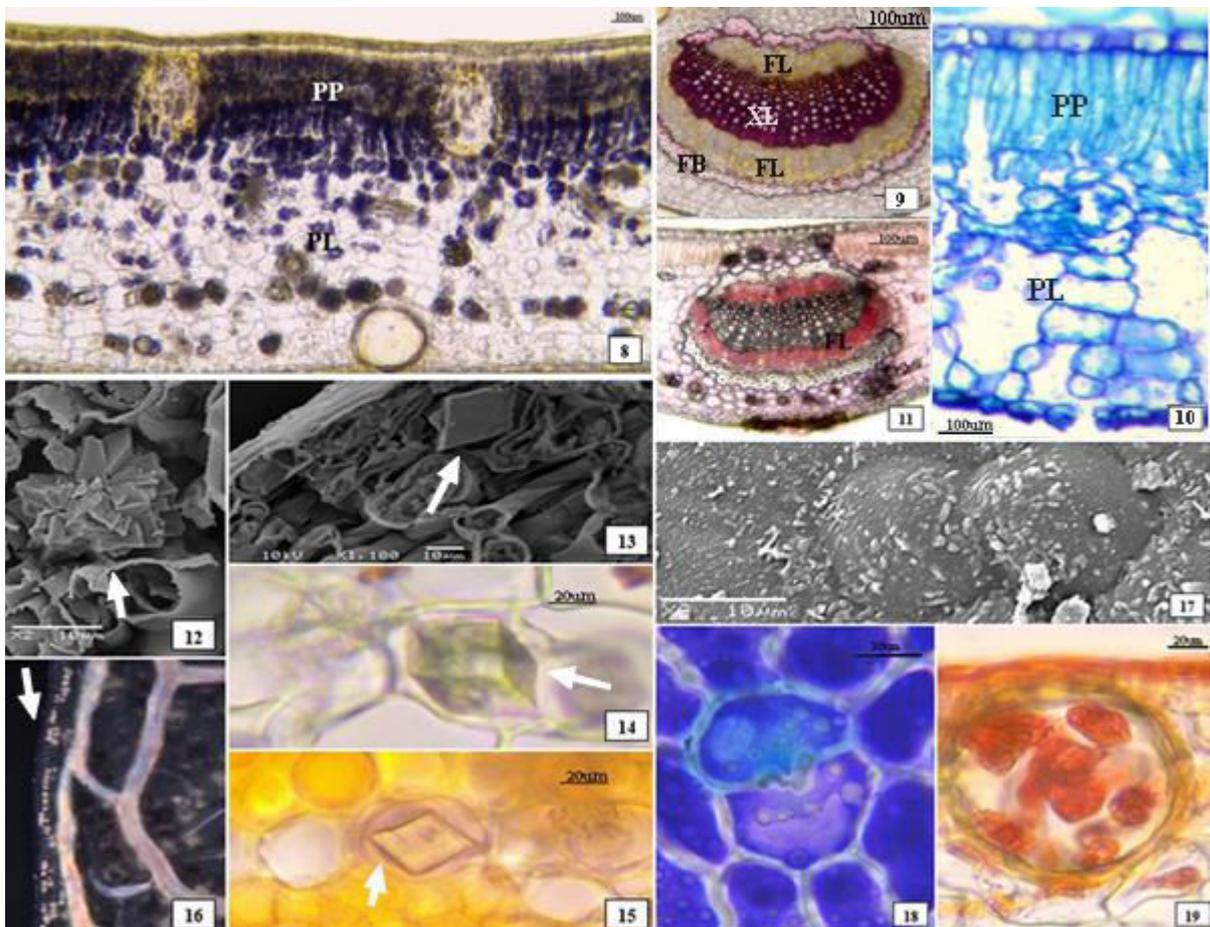


Idioblastos cristalíferos são encontrados nos parênquimas paliçádico e lacunoso, bem como, no floema e no colênquima anelar que ladeia a nervura central. Os cristais de oxalato de cálcio, testados quimicamente com ácido acético, apresentam-se na forma de drusas (Figura 12) ou cristais prismáticos (Figuras 13, 14 e 15). Os cristais também foram evidenciados sob luz polarizada, concentrados nos bordos foliares (Figura 16). Idioblastos cristalíferos são descritos por Alvarez e Silva (2012) em outras espécies de *Eugenia*.

As cavidades secretoras ocorrem predominantemente em posição subepidérmica, incluídas no parênquima clorofiliano (paliçádico e lacunoso), conforme descrito por Alvarez e Silva (2012). De acordo com Fiuza e colaboradores (2008), a composição química dos óleos essenciais dessas cavidades varia de

acordo a espécie de Myrtaceae. Quando observadas em vista paradérmica as cavidades secretoras exibem duas células de revestimento (Figura 17 e 18). Tais células, dispostas na epiderme sobre as cavidades secretoras são denominadas células sobrejacentes (*overlying cells*) e foram descritas nas espécies de *Eugenia* estudadas por Fontenelle e colaboradores (1994). O conteúdo das cavidades secretoras apresenta reação positiva para compostos lipídicos com Sudan III (Figura 19).

Figura 8-19 - Vista transversal do limbo foliar e detalhe do parênquima paliçádico reação positiva para amido (8), coloração: Lugol. Feixe anficriaval circundado por fibras (9), coloração: Floroglucinol. Aspecto do mesofilo dorsiventral (10), coloração: Azul de Toluidina; Reação positiva para pectinas no floema (11), coloração: Vermelho de Rutênio; Cristais do tipo drusa em MEV (12); Cristais prismáticos em MEV (13) e em MO (14 e 15). Detalhe dos cristais dispostos no bordo foliar em luz polarizada (16). Cavidades secretoras em vista paradérmica destacando as duas células sobrejacentes em MEV (17) e MO (18), coloração: Azul de toluidina. Cavidade secretora em vista transversal com reação positiva para lipídios (19), coloração: Sudan III. Legenda: FB – fibras esclerenquimáticas, FL – floema, XL – xilema, PL – parênquima lacunoso, PP – parênquima paliçádico.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

As características verificadas nas folhas de *Eugenia uniflora* L. auxiliam a consolidar o conhecimento anatômico e histológico da espécie e incluem: folhas hipostomáticas, estômatos paracíticos, epiderme unisseriada com cutícula estriada e raros tricomas unicelulares na face abaxial. O mesofilo é dorsiventral, o feixe vascular da nervura central é circundado por esclerênquima e colênquima anelar. Cavidades secretoras subepidérmicas distribuem-se pelo mesofilo e idioblastos cristalíferos de oxalato de cálcio concentram-se nos bordos foliares.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, A.S; SILVA, R.J.F. **Anatomia foliar de espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae) oriundas da restinga de Algodual/Maiandeuá-Pará.** *INSULA Revista de Botânica*, n. 41, p. 83-94, 2012.
- ALVES, E.S.; TRESMONDI, F.; LONGUI, E.L. **Análise estrutural de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil.** *Acta Botanica Brasílica*. v.22, n.1, p. 241-248, 2008.
- CONSOLINI, A.E; BALDINI, O.A.N; AMAT, A.G. **Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive.** *Journal of Ethno-Pharmacology*, v. 66, p. 33-39, 1999.
- DONATO, A.M.; MORRETES, B.L. **Anatomia foliar de *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae).** *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.19, n.3, p.759-770, 2009.
- DÔRES, R.G.R. **Análise morfológica e fitoquímica da Fava D'Anta (*Dimorphandra mollis* Benth.).** 2007. 374p.Tese. (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- FIUZA, T. S.; REZENDE, M.H.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T.; BARA, M.T.F.; TRESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R. **Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae).** *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 5, p 21-31, 2008.
- FONTENELLE, G. B.; COSTA, C. G.; MACHADO, R. D. **Foliar anatomy and micromorphology of eleven species of *Eugenia* L. (Myrtaceae).** *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 115, p. 111-133, 1994.

FRANKLIN, G.L. **Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood.** *Nature*, v. 51, n., p. 39-24, 1945.

HARON, N.W.; MOORE, D.M. **The taxonomic significance of leaf micromorphology in the genus *Eugenia* L. (Myrtaceae).** *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 120, p.265-277, 1996.

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique.** New York: McGraw-Hill, 1940.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal.** Rio de Janeiro: EDUR, 1997.

LARCHER, L.; BOEGER, M.R.T. **Arquitetura foliar de *Odontonema strictum* (Nees) O. Kuntze (Acanthaceae) em duas condições de luminosidade.** *Hoehnea*, v. 36, n.2, p. 321-327, 2009.

LORENZI, H.; ABREU, F.J.M. **Plantas Medicinais do Brasil.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MARTINEZ-CORREA, H.A.; MAGALHÃES, P.M.; QUEIROGA, C.L.; PEIXOTO, C.A.; OLIVEIRA, A.L.; CABRAL, F.A. **Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds.** *Journal of Supercritical Fluids*, v. 55, p. 998–1006, 2011.

OGUNWANDE, I.A.; OLAWORE, N, O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T.M.; SCHMIDT, J.M.; SETZER, W.N. **Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L.** *The International Journal of Aromatherapy*, v.15, p. 147-152, 2005.

SANTOS, K.A.; MATIAS, E.F.F.; TINTINO, S.R.; SOUZA, C.E.S.; BRAGA, M.F.B.M.; GUEDES, G.M.M.; ROLÓN, M.; VEGA, C.; ARIAS, A.R.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M. **Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L..** *Experimental Parasitology*, v. 131, p 130-132, 2012.

VENNING, F.D. **Manual of advanced plant microtechnique.** Dubuque: WM.C. Brown, 1954.

VICTORIA, F.N.; LENARDÃO, E.J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R.G.; ALVES, D.; SILVA, V.P.; MOTTA, A.S.; NASCENTE, P.S. **Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p 2668-2674, 2012.

Estudo histológico da penetração do estilete da Pérola da Terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Wille, 1922) (Hemiptera:Margarodidae) nas Raízes de Videira

Marcelina Mezzomo Debiasi

Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) – *Campus* Joaçaba
(marcelina.debiasi@unoesc.edu.br)

Márcia Bündchen

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(marcia.bundchen@poa.ifrs.edu.br)

Katiane Paula Bagatini

Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) – *Campus* Joaçaba
(katiane.bagatini@unoesc.edu.br)

Edegar Luiz Peruzzo

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI)
(peruzzo@epagri.sc.gov.br)

Fernanda Maurer D'Agostini

Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) – *Campus* Joaçaba
(fernanda.dagostini@unoesc.edu.br)

Resumo: *Eurhizococcus brasiliensis* (Wille, 1922), a pérola da terra, é considerada a principal praga da videira no sul do Brasil e existe pouca informação sobre as interações inseto-planta. O objetivo deste estudo foi verificar o mecanismo de penetração de *E. brasiliensis* nas raízes de *Vitis vinifera* através de cortes histológicos. Amostras de 250 raízes de *V. vinifera* infestadas por *E. brasiliensis* foram coletadas e fixadas em FAA₇₀ e armazenadas em etanol 70%; Após a fixação das raízes infestadas, os segmentos foram desidratados, emblocados em parafina, seccionados e corados para a preparação de lâminas histológicas permanentes. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz e os dados obtidos do estudo anatômico revelaram que o estilete de *E. brasiliensis* quando introduzido nos tecidos radiculares rompe as células e aproxima-se do xilema. A penetração do estilete forma um canal com as margens mais claras e irregulares atingindo até 650 µm no interior dos tecidos da raiz.

Palavras-chave: Interação inseto-planta; Histologia da raiz; *Vitis vinifera*.

Histological study of penetration of the brazilian ground pearl stylet *eurhizococcus brasiliensis* (wille, 1922) (hemiptera: margarodidae) in Raízes de Videira

Abstract: *Eurhizococcus brasiliensis* (Wille, 1922), the Brazilian ground pearl, is considered the main vine pest in Southern Brazil and there is few information about the insect-plant interactions. The aim of this study was to verify the penetration mechanism of the *E. brasiliensis* in the roots of *Vitis vinifera* through histological cuts. Samples from 250 *V. vinifera* roots infested by *E. brasiliensis* were collected and were fixated at FAA₇₀ and stored in ethanol 70%; then, root segments were dehydrated, molded in paraffin, sectioned and staining to prepare the permanent histological slides. The slides were analyzed under a light microscope and the obtained data from the anatomical studies revealed that the *E. brasiliensis* stylet when introduced in the root tissues, breaks the cells and reaches to the xylem. The root penetration of the stylet forms a track with clearer and more irregular margins reaching up to 650µm inside the root tissues.

Keywords: Insect-plant interaction; Root histology; *Vitis vinifera*.

INTRODUÇÃO

Eurhizococcus brasiliensis (Wille, 1922) Hemiptera, popularmente conhecida como “pérola da terra” ou “margarodes” é uma espécie de cochonilha neotropical endêmica do Brasil e encontrada principalmente na região Sul (BOTTON, 2010a; EFROM *et al.*, 2012). É um parasita subterrâneo que se alimenta nas raízes de cerca de 70 espécies de plantas, incluindo videiras, cana-de-açúcar, palmeiras, algodão e diversas outras, causando assim sérios danos nestas culturas (FOLDI, 2005). As consequências da infestação de *E. brasiliensis* na produtividade da cultura de *Vitis* sp. têm maior impacto econômico em decorrência do papel da vitivinicultura na sustentabilidade econômica das pequenas propriedades rurais do sul do Brasil (MELLO, 2012).

Na literatura as hipóteses para o declínio e morte das plantas de videira, associadas à infestação pela cochonilha incluem: sucção contínua da seiva floemática; bloqueio da translocação de fotossimilados; toxicidade injetada pelo aparelho bucal e infecções secundárias, por microorganismos. Segundo Panizzi e Noal (1971) e Foldi (2005), o definhamento progressivo do parreiral pode ser devido à sucção contínua de seiva, resultando na redução da produção e consequente morte das plantas. Zart *et al.* (2014) constataram que a evolução dos sintomas foliares associados ao definhamento da planta está relacionada com uma redução na atividade fotossintética e com o acúmulo de amido nas folhas das plantas

infestadas, sugerindo que decorram do bloqueio no transporte de fotoassimilados das folhas. Outra interpretação acerca dos sintomas indica que a saliva injetada pela cochonilha nos tecidos vegetais é tóxica para a videira e distribui-se de forma sistêmica pela planta através do sistema vascular, acarretando em baixo vigor, mesmo quando se elimina o inseto das raízes (SORIA e GALLOTTI, 1986). A penetração do estilete pode também representar um veículo para a penetração de viroses, a exemplo da transmissão, também em videiras, do *Grapevine virus B* pela cochonilha *Pseudococcus longispinus* (KUNIYUKI *et al.*, 2006).

Historicamente, a pérola da terra é uma praga de difícil controle (BOTTON *et al.*, 2000) devido, particularmente, ao hábito subterrâneo, aliado ao desenvolvimento na forma de cisto, à dispersão e infestação facilitadas pelas formigas (NONDILLO *et al.*, 2013). Durante a fase jovem (primeiro instar e cisto) esta espécie ataca as raízes da videira alimentando-se dos tecidos vasculares ou células de parênquima utilizando o estilete para a nutrição (FOLDI, 2005; SORIA e CONTE 2005). O inseto somente é prejudicial na fase jovem uma vez que os adultos não apresentam aparelho bucal (BOTTON *et al.*, 2000).

As tentativas de controle têm sido restritas ao uso de inseticidas por diferentes vias de aplicação, as quais não se mostraram eficientes para evitar os danos nas videiras (BOTTON *et al.*, 2008; BOTTON *et al.*, 2010a; HICKEL *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2001). Além disso, tem se procurado, no uso de agentes biológicos, uma alternativa aos inseticidas químicos (CAUSTON *et al.*, 2004; GRAFTON-CARDWELL *et al.*, 2005) para o controle de insetos da família Margarodidae. O díptera *Proleptis lucifer* (Asilidae), um predador encontrado em populações naturais de *E. brasiliensis*, mostrou-se um potencial agente de controle biológico (SORIA *et al.*, 2004) enquanto o uso de cobertura de solo com mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*), não foi eficiente para o controle da pérola-da-terra (BOTTON *et al.*, 2010b).

Considerando a importância socioeconômica derivada do impacto da pérola da terra na produção das videiras e a escassez de informações sobre a relação parasita-hospedeiro, o presente estudo visou, por meio da análise histológica, visualizar e documentar a inserção do estilete de *E. brasiliensis* nos tecidos radiciais de *Vitis vinifera*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas aleatoriamente 250 amostras de raízes de *V. vinifera*, completamente infestadas por *E. brasiliensis*, provenientes de um vinhedo de Cabernet Sauvignon sobre o porta-enxerto Paulsen 1103, na Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), localizada no município de Videira, na região Centro Oeste do estado de Santa Catarina (coordenadas 27°01'28"S/51°08'55", altitude 745m). Após a coleta as raízes infestadas foram fixadas em FAA₇₀ (formol, ácido acético e álcool etílico 70%) (JOHANSEN, 1940) por 48 horas e, a seguir, armazenadas em etanol 70%.

Para o processamento do material, segmentos da extremidade distal, com menor diâmetro, das raízes foram dispostos em porta amostras (cassetes) apropriados ao procedimento de inclusão e submetidos ao processador de tecidos da marca LUPE® onde foram submetidos a álcool absoluto e formalina (4:1) por uma hora, álcool absoluto por três horas, xilol por três horas e parafina líquida por três horas (TIMM, 2005). Os segmentos foram emblocados em parafina e permaneceram por 15 minutos no refrigerador a -18° C para serem desenformados. Os blocos resultantes foram colocados por 2 horas na água amoniacal, com a finalidade de amolecer o tecido, e em seguida mantidos sob refrigeração (-18° C) por aproximadamente 10 minutos, adaptando-se a técnica de Timm (2005). Foram confeccionados 62 blocos resultando em 298 lâminas seriadas.

Secções transversais e longitudinais (com relação à orientação das raízes) foram obtidas em micrótomo de rotação (Leica®) com espessura de 4 µm. Os cortes foram distendidos em água a 40° C, dispostos de forma seriada em lâminas de vidro e desparafinados em estufa a 70°C por um período de duas horas. A coloração foi realizada com solução aquosa de azul de toluidina 0,05% (O'BRIEN *et al.* 1965), hematoxilina/eosina (JOHANSEN, 1940) e montadas em resina sintética Permound®.

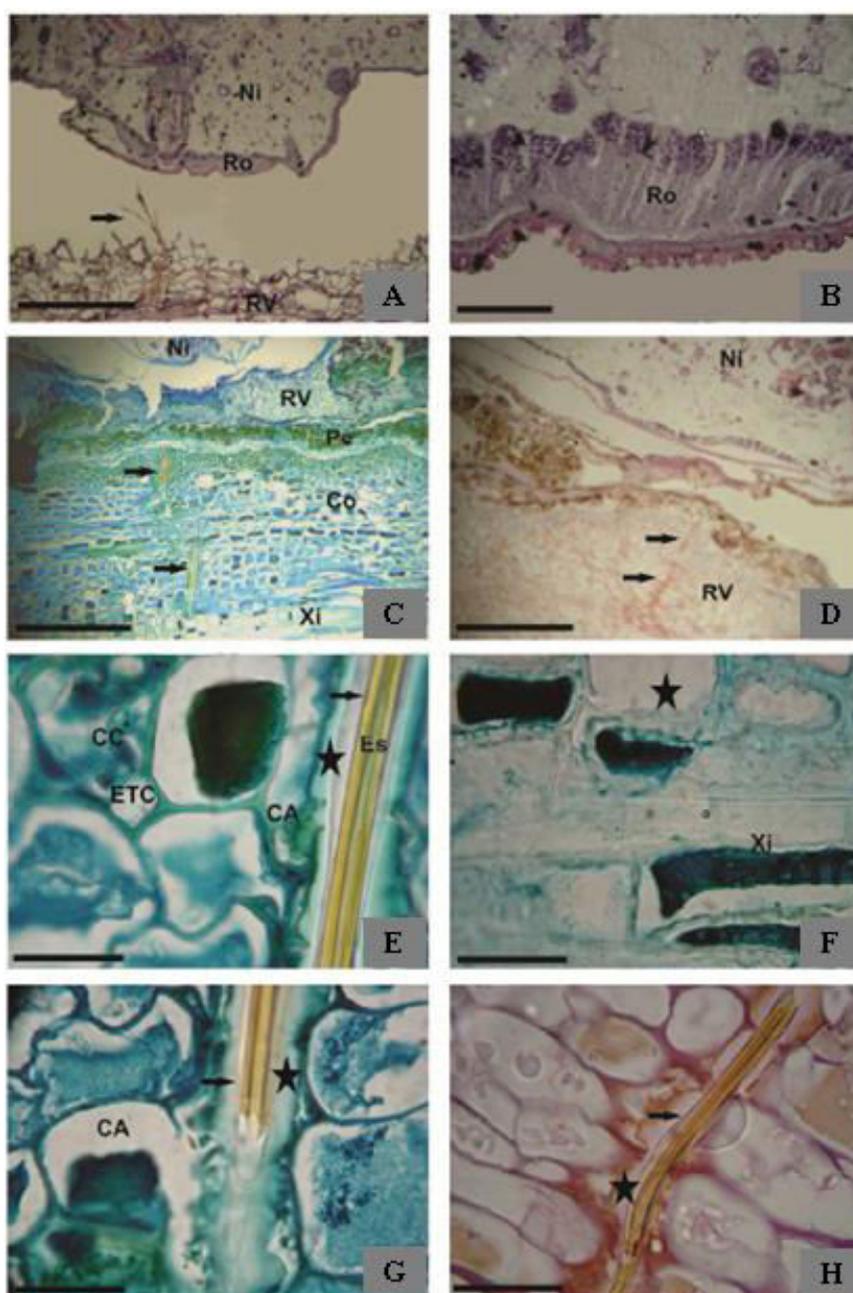
As análises microscópicas e os registros fotográficos foram realizados em microscópio fotônico (Nikon®) com captura de imagem. Nas lâminas em que o estilete pode ser visualizado foi efetuada a mensuração do seu comprimento e largura através do software Motic Images Plus 2.0 (MIP-2.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estilete de *E. brasiliensis* é formado por três segmentos (Figura 1-A seta), quitinosos, originados das duas mandíbulas e da maxila que se modificam, unificando-se e formando um tubo (COSTA LIMA, 1942; FOLDI, 2005) com 6,27 μ m (\pm 0,9) de espessura. O estilete penetra na raiz através dos tecidos da periderme e do córtex, ultrapassando o tecido floemático (Figura 1-C, 1-D e 1-E) e se aproximando do xilema (Figura 1-F) aprofundando-se até 650 μ m. Na área que circunda a inserção do estilete destaca-se a margem de coloração mais clara e aspecto irregular (Figura 1-E, 1-G e 1-H), resultado da penetração do estilete através das células, formando um “canal” e causando lise e desagregação dos componentes das paredes celulares das células atingidas. Nas células adjacentes ao canal, no entanto, não se evidenciam alterações morfológicas (Figura 1-G e 1-H). No decorrer da penetração do estilete as células adjacentes ao canal são de diferentes tipos morfológicos, periderme, córtex parenquimático (Figura 1-C e 1-D) e tecido floemático (Figura 1-E).

Kellow *et al.* (2004) analisando a interação entre *V. vinifera* e *Daktulosphaira vitifoliae* constataram que as células imediatamente em torno daquelas penetradas pelo estilete não apresentaram alteração perceptível em microscopia óptica, não formando um canal. Inclusive, durante a introdução do estilete de *D. vitifoliae*, diferentemente do presente estudo, não foi visualizada a penetração do mesmo no citoplasma ou no vacúolo das células (KELLOW *et al.*, 2004). O aspecto histológico da penetração do estilete observado em *E. brasiliensis* é similar ao descrito por Hewer *et al.* (2011) e Pointeau *et al.* (2012) para afídeos (Hemiptera). Nos afídeos a penetração do estilete é acompanhada pela secreção de saliva que se solidifica e permanece na planta após a retirada do estilete. Esta saliva contém componentes não enzimáticos que inibem as respostas de defesa da planta com relação aos danos no sistema vascular (MILES, 1999).

Figura 1 - Secções transversais (A a G) e seção longitudinal (H) de raiz *Vitis vinifera* infestada por *Eurhizococcus brasiliensis*. (A) Detalhe do estilete três segmentos (seta) de *E. brasiliensis*. (B) Detalhe das células da ninfa perto do rostrum (C e D). Estilete (seta) nos tecidos da raiz. (E, F, G e H) Detalhe do estilete (seta) inserido na raiz formando um canal (estrela) por lise e rompimento das paredes das células. Ni - ninfa; Ro - células próximas à tribuna; RV = raiz *Vitis vinifera*; Pe - periderme, Co - córtex; Xi - xilema, CC – célula companheira (floema), ETC – elemento de tubo crivado (floema), CA - célula adjacente, Es - estilete. Barra de escala: 200 um (fotomicrografias A, C e D), 30 um (fotomicrografia B), 20 um (fotomicrografias E, F, G e H). Técnica de azul de toluidina (fotomicrografias C, E, F e G) e técnica de hematoxilina/eosina (fotomicrografias A, B, D e H).



CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo revelou detalhes dos aspectos da interação inseto-plantas, permitindo visualizar a penetração do estilete nos tecidos radiciais. A análise histológica das raízes infestadas revelou que o estilete de *E. brasiliensis* quando introduzido na raiz de *V. vinifera* excede ao floema e aproxima-se ao xilema, causando lise e degradação dos componentes da parede celular das células atingidas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às colaborações da médica, especialista em Anatomia Patológica, Nádia Aparecida Lorencette e do biólogo, doutor em Ciências Morfológicas, Dib Ammar.

REFERÊNCIAS

- BOTTON, M., BASTOS, G., PEREIRA, O. Y ONZI, I. **Efeito da cobertura vegetal sobre a pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira.** *Acta Scientiarum. Agronomy*. n.32, v.4, p.681-685, 2010a.
- BOTTON, M, TEIXEIRA, I, BAVARESCO, A, PASTORI, P L. **Use of soil insecticides to control the Brazilian ground pearl in vineyards.** *Revista Colombiana de Entomología*, v. 36, p. 20-24, 2010b.
- BOTTON, M, SCHUK, E, SORIA, S DE J, HICKEL, E R. **Manejo de pragas na cultura da videira. EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves.** 2008. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/.../perola.html>>. Acesso em: 12 nov. 2015.
- BOTTON, M., HICKEL, E. R., SORIA, S. DE J. AND TEIXEIRA, I. **Bioecologia e controle da pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel, 1922) (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira.** Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 27. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, 2000. 23p.
- CAUSTON, C. E.; LINCANGO M. P.; POULSOMT, G. A. **Feeding range studies of *Rodolia cardinalis* (Mulsant), a candidate biological control agent of *Icerya purchasi* Maskell in the Galapagos islands.** *Biological Control*, v.29, p.315-325, 2004.
- COSTA LIMA, A. M. da. **Insetos do Brasil. 3, Homópteros.** Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942. p.327.

EFROM, C.F.S.; BOTTON M.; MEYERI, G.A. **Brazilian ground pearl damaging blackberry, raspberry and blueberry in Brazil.** *Ciência Rural*, n. 42, p. 1545–1548, 2012.

FOLDI, I. **Ground pearls: a generic revision of the Margarodidae sensu stricto (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea.** *Annals Sociedade Entomológica*, v.41, p.81-125, 2005.

GRAFTON-CARDWELL.E.E.; GU, P; MONTEZ, G.H. **Effects of temperature on development of vedalia beetle, *Rodolia cardinalis* (Mulsant).** *Biological Control*, v.32, p.473–478, 2005.

HEWER, A.; BECKER, A.; VAN BEL, A. J. E. **An aphids Odyssey – the cortical quest for the vascular bundle.** *The Journal of Experimental Biology*, v.214, p.3868-3879, 2011.

HICKEL, E.R.; PERUZZO, E.L.; SCHUCK, E. **Controle da pérola-da-terra, *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel, 1922) (Homoptera: Margarodidae), através da insetigação.** *Neotropical Entomology*, v.30, p.125-132, 2001.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique.** New York, 1940. p.523.

KELLOW, A.V., SEDGLEY, M., VAN, H. R. **Interaction Between *Vitis vinifera* and Grape Phylloxera: Changes in Root Tissue During Nodosity Formation.** *Annals of Botany*, v.93, p. 581-590, 2004.

KUNIYUKI, H.; GIORIA, R.; REZENDE, J.A. M.; WILLINK, C.G; NOVO, J.C.S.; YUKI, V.E. **Transmissão experimental do Grapevine virus B pela cochonilha *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozzetti (Hemiptera: Pseudococcidae).** *Summa Phytopathologica*, v.32, p.151-155, 2006.

MELLO, L.M.R. de. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012.** EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves. 2012.

MILES, PW. Aphid saliva. **Biological Review**, v.74, p. 41-85, 1999.

NONDILLO, A.; SGANZERLA, V.M.A.; BUENO, O.C.; BOTTON, M. **Interaction between *Linepithema micans* (Hymenoptera: Formicidae) and *Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae) in Vineyards.** *Environmental Entomology*, v.42, p.460-466, 2013.

O'BRIEN, T.P., FEDER, N., MCCULLY, M.E. **Polycromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O.** *Protoplasma*, v.59, p. 368-373, 1965.

PANIZZI, A.R.; NOAL, A.C. ***Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel, 1922) disseminação no município de Passo Fundo.** Universidade de Passo Fundo: IPEPLAN, Passo Fundo. 1971. 34p.

POINTEAU, S.; AMELINE, A.; LAURANS, F.; SALLÉ, A.; RAHBÉ, Y.; BANKHEAS-DRONNET, S.; LIEUTIER, F. **Exceptional plant penetration and feeding upon cortical parenchyma cells by the woolly poplar aphid.** *Journal of Insect Physiology*. v.58, p.857-866, 2012.

SORIA, S.J.V.; GALLOTTI, B.J. **O margarodes da videira *Eurhizococcus brasiliensis* (Homoptera: Margarodidae):** biologia, ecologia e controle no sul do Brasil. *Circular técnica 13*. EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves. 1986.

SORIA, S. J.; MELLO R. P.; OLIVEIRA, A. M. **Novos registros de *Prolepsis lucifer* (Wiedemann, 1928) (Diptera, Asilidae) como predador de *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel in Wille, 1922) (Hemiptera, Margarodidae) em diferentes regiões viticultoras do Rio Grande do Sul, Brasil.** *Entomología y Vectores* v.11, p. 323-331, 2004.

SORIA, S.J., CONTE, A.F. **Bioecologia e controle das pragas da videira.** *Circular Técnica 63*. EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 2005.

TEIXEIRA, I.; MARCOS, M.; LOECK, A.E. **Avaliação de inseticidas visando ao controle de *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel) (Hemiptera: Margarodidae) em novos plantios de videira.** *Neotropical Entomology*, v.31, p.457-461, 2001.

TIMM, L.L. **Técnicas Rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas.** *Caderno La Salles XI*, Canoas, v.2, n.1, p.231-239, 2005.

ZART, M.; DE CÉSARO, A.; SANTOS, H.P. dos; SOUZA, P.V.D.de. **Caracterização morfo-fisiológica de plantas de videira atacadas por pérola-da-terra.** *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, n. 3, p. 1187-1200, 2014.

Inspeção de segurança aplicado à laboratórios de ensino e pesquisa

Karin Tallini

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(karin.tallini@poa.ifrs.edu.br)

Bárbara de Cássia Alexandre Baierle

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(barbara_baierle@hotmail.com)

Dyowanne Hiulei Schmitt

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(dyowanne.hshmitt@gmail.com)

Resumo: Os laboratórios de ensino são ambientes destinados à realização de atividades práticas e desenvolvimento de projetos de pesquisa, ensino e extensão. O presente teve como objetivo a elaboração e aplicação de uma inspeção de segurança em dois laboratórios de ensino técnico do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – Campus Porto Alegre. A metodologia do trabalho foi baseada na elaboração e aplicação de um roteiro de inspeção de segurança que foi fundamentado em normas nacionais relacionadas à biossegurança de laboratórios. A elaboração dos questionários levou em consideração a avaliação dos agentes de risco biológico, químico, físico, ergonômico e de acidentes. Para melhor interpretação dos dados foram elaborados histogramas de frequência. Nos resultados pôde-se constatar que, quando feita a comparação entre os resultados das inspeções de segurança entre os laboratórios, muitos quesitos obtiveram frequência similares, enquanto os quesitos EPI, equipamentos, manuseio e descarte de resíduos, armazenamento de produtos e materiais obtiveram percentuais de frequência totalmente diferentes.

Palavras- chave: Inspeção; Biossegurança; Laboratório.

Safety inspection applied to teaching and research laboratories

Abstract: The teaching laboratories are environments designed to carry out practical activities and development of research, teaching and extension projects. The purpose of the present study was the elaboration and application of a safety inspection in two laboratories of technical education of the Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio Grande do Sul - Porto Alegre Campus. The methodology of the work was based on the elaboration and application of a roadmap of safety

inspection that was based on national standards related to laboratory biosafety. The preparation of the questionnaires took into account the evaluation of agents of biological, chemical, physical, ergonomic and accident risk. Frequency histograms were developed for better interpretation of the data. The results showed that, when comparing the results of safety inspections between laboratories, many items obtained similar frequencies, while PPE, equipment, handling and disposal of waste, storage of products and materials obtained percentages of frequencies.

Keywords: Inspection; Biosafety; Laboratory.

INTRODUÇÃO

O laboratório visto de uma maneira geral é um ambiente hostil, pois convivem no mesmo espaço pessoas, equipamentos, reagentes, soluções, microrganismos, papéis, livros, amostras entre outros fatores. Quando queremos definir um laboratório dentro de uma instituição de ensino e pesquisa devemos agregar, além destes preceitos que os mesmos são locais onde se desenvolvem atividades práticas e teóricas específicas para determinadas áreas de conhecimento, além de se destinarem a atividades de pesquisa e extensão, é neste contexto que colocamos os laboratórios de ensino técnico para este trabalho (HIRATA, 2002).

O ambiente laboratorial deve ser entendido como um sistema complexo, onde existem interações constantes entre os fatores humanos, ambientais, tecnológicos, educacionais e normativos que podem favorecer a ocorrência de acidentes (MOLINARO, 2009).

O laboratório por si só é considerado um local de alto potencial de acidentes, devido a inúmeros fatores tais quais, a natureza dos materiais manuseados (letais, tóxicos, corrosivos, irritantes, inflamáveis), os equipamentos utilizados que podem expor a temperaturas extremas e radiações, e o contato com agentes patogênicos são alguns dos exemplos (CIENFUEGOS, 2001; OLIVEIRA, 1987).

Além disso, acidentes neste local de trabalho, ainda podem ocorrer por uso incorreto de equipamentos, montagem incorreta de aparelhagem de vidro, utilização inadequada ou o não uso de equipamento de segurança e a falta de manutenção devida. (OLIVEIRA, 1987).

Neste sentido devemos diferenciar perigo de risco. O risco é a probabilidade de ocorrência de um acidente em decorrência à exposição de algum perigo que possa causar algum efeito adverso à saúde humana, animal e ambiental. O risco

pode interferir na vida do homem em vários aspectos, sendo categorizado em: físico, químico, biológico, ergonômico e de acidente (MASTROENI, 2006).

Devido a estes problemas devemos considerar as questões relacionadas a segurança laboratorial, neste caso, é importante conhecer os conceitos de biossegurança, conforme Teixeira (2010) que são:

[...] um conjunto de ações voltadas para prevenção, minimização ou eliminação de riscos às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, riscos que podem comprometer a saúde do homem, dos animais, do meio ambiente ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos (Teixeira, 2010, p. 19).

Sendo assim, a inspeção de segurança é uma avaliação de riscos, onde é possível identificar e avaliar a probabilidade de ocorrer algum efeito adverso. As Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos do Ministério de Saúde (2010) descrevem que:

[...] a importância no conhecimento e na identificação do risco torna sua avaliação primordial para a aplicação de técnicas e procedimentos que possibilitem que estes sejam atenuados ou eliminados. Identificar o agente manipulado, os tipos de ensaio realizados e conhecer a espécie utilizada são critérios importantes para uma avaliação de risco eficiente. Além disto, esta avaliação deverá contemplar as várias dimensões que envolvem a questão, sejam elas relativas a procedimentos (boas práticas: padrões e especiais), a infraestrutura (desenho, instalações físicas e equipamentos de proteção) ou a capacitação e qualificação das equipes. A organização do trabalho e as práticas gerenciais também passaram a ser reconhecidas como importante foco de análise, seja como causadoras de acidentes, doenças e desconforto, ou como integrantes fundamentais de um programa de Biossegurança nas instituições (Ministério da Saúde, 2010, p. 11).

Segundo Catai (2012), não há um método específico para a identificação de riscos. A combinação de métodos pode ser uma alternativa válida, o mais importante é reunir a maior porção possível de informações a respeito de perigos. Sendo corriqueiramente aplicado listas de verificações ou *checklists*, no qual uma série de perguntas são preparadas, e respondidas de forma: sim ou não, atende ou não atende, conforme ou não conforme.

Conforme a norma regulamentadora NR-9 (1994) em seu artigo 9.1.5, são considerados riscos ambientes aqueles causados por agentes físicos, químicos e biológicos capazes de danificar a saúde do trabalhador em função de sua natureza, concentração e tempo de exposição.

Além dos três agentes citados pela NR 9, é conveniente a consideração de mais dois, ergonômicos e de acidentes, que completa a divisão tradicional das cinco classes de riscos, detalhadas a seguir (ZOCCHIO, 1996).

Dessa maneira verificamos que é necessário que sejam desenvolvidas estratégias de procedimento adequadas, com a finalidade de minimizar e prevenir possíveis acidentes. As práticas de biossegurança baseiam-se na necessidade de proteção ao operador, seus auxiliares e à comunidade local de trabalho, dos instrumentos de manipulação e do meio ambiente (HIRATA, 2002; CARVALHO, 2009).

Levando em consideração estes pressupostos, o objetivo deste trabalho foi à elaboração e aplicação de um roteiro de inspeção de segurança nos laboratórios de Bioquímica e Histologia do Instituto Federal do Rio Grande do Sul – Campus Porto Alegre localizada na Rua Coronel Vicente, 281, bairro Centro Histórico da cidade de Porto Alegre - RS.

METODOLOGIA

A metodologia do trabalho foi baseada na elaboração e aplicação de um roteiro de inspeção de segurança que foi fundamentado em normas nacionais relacionadas a biossegurança de laboratórios, sendo as “Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos”, BRASIL (2010a), na “Classificação de Risco dos Agentes Biológicos”, BRASIL (2010b) e no roteiro de inspeção de segurança de MASTROENI (2006). O roteiro levou em consideração os agentes de risco biológico, químico, físico, ergonômico e de acidentes, definidos pelas normas regulamentadoras NR 9 e NR 15 (BRASIL, 1994, 2015)

Dessa maneira a fim de termos uma melhor organização das atividades este trabalho foi realizado em quatro etapas: Descrição dos Processos de Trabalho; Elaboração do Roteiro de Inspeção de Segurança; Aplicação do Roteiro de Inspeção de Segurança e Avaliação dos Resultados.

Descrição dos processos de trabalho

Nesta parte são verificadas todas as áreas envolvidas com os processos de trabalho que são realizadas no laboratório.

Elaboração e aplicação do roteiro de inspeção de segurança

A partir da descrição dos processos de trabalho, foi elaborado um roteiro de inspeção de segurança fundamentado nos três trabalhos citados anteriormente. O roteiro foi dividido em 12 itens (critérios avaliados), foram eles: manuseio e descarte de resíduos; armazenamento de produtos e materiais; equipamentos; equipamentos de proteção individual (EPI); equipamentos de proteção coletiva (EPC); aspectos ergonômicos; boas práticas de laboratório (BPLS); segurança; prevenção de incêndio; limpeza e condições sanitárias; instalações e eletricidade.

Cada item possuía vários quesitos com questões associados ao laboratório ou a estrutura do prédio. Para os mesmos foram atribuídas notas, na Tabela 1 podemos ver as notas atribuídas para cada quesito e seu significado.

Tabela 1 – Notas atribuídas para cada quesito (primeira coluna) e seu significado (segunda coluna).

1	Totalmente Insatisfatória
2	Parcialmente Satisfatória
3	Nem satisfatória, nem insatisfatória
4	Parcialmente Satisfatória
5	Totalmente Satisfatória

Os roteiros foram aplicados nos dois laboratórios de Histologia do IFRS- *Campus*, Porto Alegre (sede Ramiro e sede Centro). Aplicação do roteiro foi realizada no Laboratório de Histologia no primeiro semestre de 2015 e no laboratório de Histologia do IFRS- *Campus* Porto Alegre (sede Ramiro) e posteriormente no segundo semestre de 2016 no laboratório de histologia do IFRS- *Campus* Porto Alegre (sede Centro).

Avaliação dos Resultados

Para a melhor visualização dos resultados, foram realizados histogramas de frequência no *software Microsoft Excel 2010*®. No eixo x, são indicados os itens avaliados, e no eixo y, a frequência dos resultados obtidos em porcentagem. Os quesitos que receberam nota 1 (totalmente insatisfatória), foram representados na cor vermelha, os quesitos que receberam nota 3 (nem satisfatório, nem insatisfatório), foram representados na cor amarela e os quesitos que receberam no

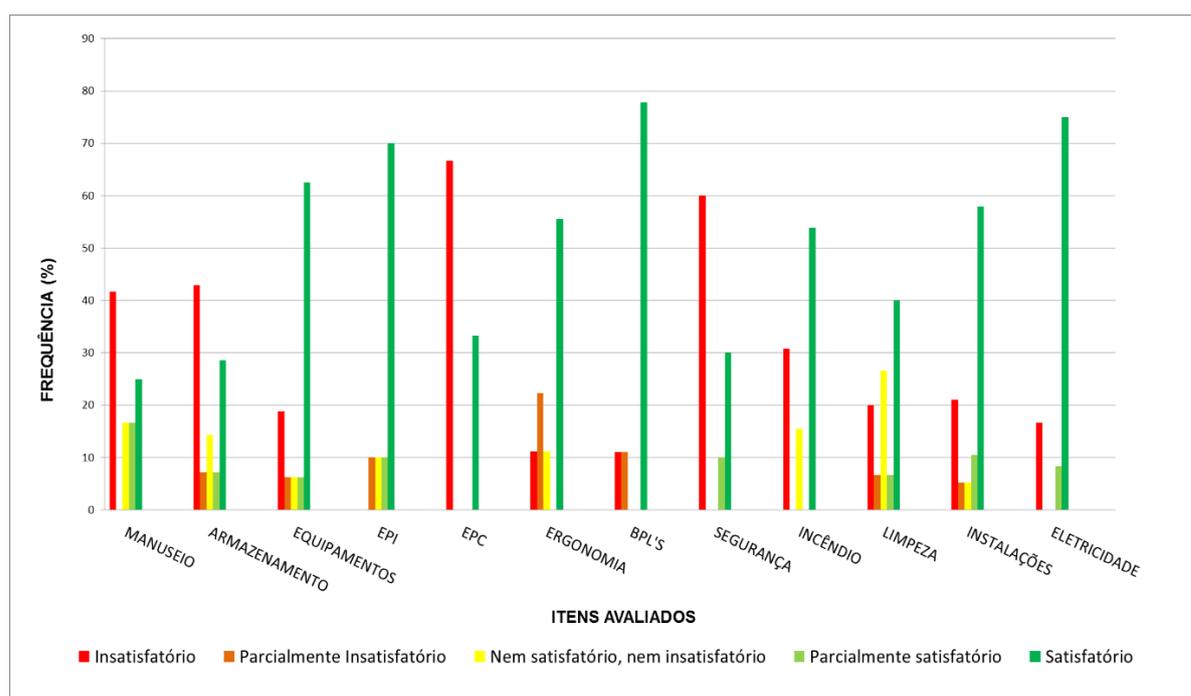
5 (totalmente satisfatória), foram representados na cor verde. Posteriormente, os histogramas dos dois laboratórios foram comparados a fim de possibilitar uma maior compreensão dos problemas e desafios do novo laboratório da sede centro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho foi desenvolvido no primeiro semestre de 2016 no laboratório de Bioquímica e Histologia do IFRS – *Campus* Porto Alegre.

No primeiro momento foi realizada a descrição dos processos de trabalho. Nesta etapa foi possível verificar as instalações e os equipamentos utilizados; materiais e produtos utilizados; resíduos gerados; infraestrutura do laboratório e do; as práticas que realizadas no laboratório e os fatores de risco presentes no laboratório e no prédio que podiam gerar algum acidente para os indivíduos. Após a descrição dos processos de trabalho, foi elaborado e aplicado um roteiro de inspeção de segurança com quesitos específicos para os laboratórios de Bioquímica e Histologia e após, foram realizados os histogramas de frequência, que podem ser vistos, respectivamente, nas Figura 1 e 2.

Figura 1 – Histograma de Frequência do Laboratório de Bioquímica do Instituto Federal do Rio Grande do Sul – *Campus* Porto Alegre.



Os quesitos que obtiveram frequências totalmente satisfatórias foram: equipamentos, equipamentos de proteção individual (EPI), boas práticas de laboratório (BPL) e eletricidade, com percentual acima de 60%. O quesito BPL obteve o melhor percentual, 78%, devido ao fato de que os novos estagiários, bolsistas ou funcionários receberam treinamento antes de iniciarem suas atividades de trabalho, os EPIs são de uso rotineiro e adequado a cada atividade desenvolvida. Foi verificado que não são estocados comidas e bebidas no laboratório e também, não são observados o hábito de fumar, beber ou se alimentar dentro do local de trabalho.

No quesito que trata sobre EPIs, a frequência obtida foi de 70% e foi possível observar que os EPIs foram vistoriados, periodicamente, quanto à sua integridade física, estavam dentro do prazo de validade e foram considerados confortáveis pelos usuários. O laboratório possuía máscaras de segurança disponíveis e os usuários recebem informações sobre a finalidade dos EPIs e o modo correto de sua utilização.

O quesito equipamento obteve um percentual acima de 60%, devido ao fato de que os equipamentos que estavam em condições precárias foram removidos de uso. Foi verificado que todos os equipamentos estavam dispostos de uma forma que permitia o fácil acesso e higienização adequada. Os equipamentos elétricos possuíam aterramento conectado, a exaustão estava funcionando corretamente, os refrigeradores e freezers possuíam um sistema de degelo controlado periodicamente.

No quesito eletricidade, o percentual de frequência foi acima de 70%. Isso se deve ao fato que a instituição dispõe de um sistema de segurança contra raios, todos os circuitos do laboratório possuem interruptores para caso de falha no aterramento, todas as tomadas e equipamentos do laboratório estão devidamente identificados com sua voltagem (110 ou 220 V). Existem extensões elétricas adequadas para o funcionamento dos equipamentos e os dutos de energia e gases são acessíveis à manutenção.

Os únicos quesitos que obtiveram menor conceito, isto é, totalmente insatisfatórias foram: manuseio e descarte de resíduos, armazenamento de produtos e materiais, equipamentos de proteção coletiva (EPC) e segurança, com frequência acima de 40%. No quesito manuseio e descarte de resíduos, percentual de frequência foi de 41%, devido ao fato de que a instituição não possuía um plano de

gerenciamento de resíduos, os usuários do laboratório não são atualizados periodicamente quanto ao descarte de resíduos, os resíduos não são neutralizados antes de serem descartados.

No quesito que trata sobre armazenamento de produtos e materiais, a frequência obtida foi de 42% e foi observado que não existe registro diário do uso de produtos químicos. Os produtos químicos não estão organizados/estocados de acordo com a compatibilidade química, não existem instruções de trabalho disponíveis no laboratório em casos de derramamento de produtos químicos, manipulação e descarte adequado de materiais perfurocortantes, os produtos inflamáveis não estão armazenados de forma a estarem protegidos de fonte de ignição.

No item que trata de equipamentos de proteção coletiva (EPC), o percentual de frequência foi de 68% e isto foi devido ao fato que não havia expurgo semanal do chuveiro de descontaminação; a solução lava-olhos não era trocada periodicamente. Outro fato avaliado foi que não existia balde de areia ou solução absorvente de soluções químicas dentro do laboratório; não havia kit nem POPs de primeiros socorros disponíveis no laboratório; as capelas de segurança química não são avaliadas periodicamente e reagentes são estocados dentro da mesma.

Em relação à segurança, o percentual de frequência foi de 60%. Isso se deve ao fato de que não havia registro de eventuais acidentes de trabalho; não havia mapa de riscos afixados no laboratório; os seguranças (noturno e diurno) não possuem treinamento adequado para lidar em situações de emergência na área da saúde; a instituição não conta com um ambulatório médico ou profissional qualificado e disponível para atendimento em casos de emergência; o laboratório não possuía visivelmente anexado à porta de entrada, um telefone de emergência e dados do responsável para casos de emergência.

Alguns quesitos, como: aspectos ergonômicos, prevenção de incêndio, limpeza e condições sanitárias e instalações, também, obtiveram frequências totalmente satisfatórias, mas não apresentaram frequência acima de 60%.

No quesito que trata sobre aspectos ergonômicos, o percentual de frequência foi de 57%, porque atividades repetitivas e monótonas são evitadas no ambiente de trabalho, existe espaço para trabalhar com segurança no ambiente de trabalho (a bancada está livre de materiais desnecessários ou de equipamentos estragados ou fora de uso), a área do laboratório (chão, prateleiras etc.) é livre de objetos em

desuso ou estranho ao ambiente. Em compensação, existe apenas um carrinho que circula em todos os laboratórios, não há escadas ou bancos apropriados para uso junto às estantes, caso seja necessário alcançar objetos nas prateleiras mais altas, a temperatura do ambiente não é confortável aos trabalhadores em todas as estações do ano (verão e inverno).

Na avaliação da prevenção de incêndio, a frequência obtida foi de 56%, devido à instituição contar com um alarme de incêndio, as saídas de emergência estarem desobstruídas, sinalizadas e em condições de uso, os extintores de incêndio situam-se em locais visíveis, sinalizados, estão dentro da validade e são de número e tipo adequados aos diferentes ambientes de trabalho, segundo a NR-23 do Ministério do Trabalho e Emprego. O sistema de mangueira de incêndio estava em local de fácil acesso e pronto para uso, a instituição possuía treinamento de combate e prevenção aos princípios de incêndio periódico. Porém, o laboratório não possuía um sistema de detecção de fumaça e luzes de emergência em caso de incêndio, as portas do laboratório não possuem revestimento ou não são de material que retarde incêndios (são de madeira) e não existe um hidrante próximo à instituição.

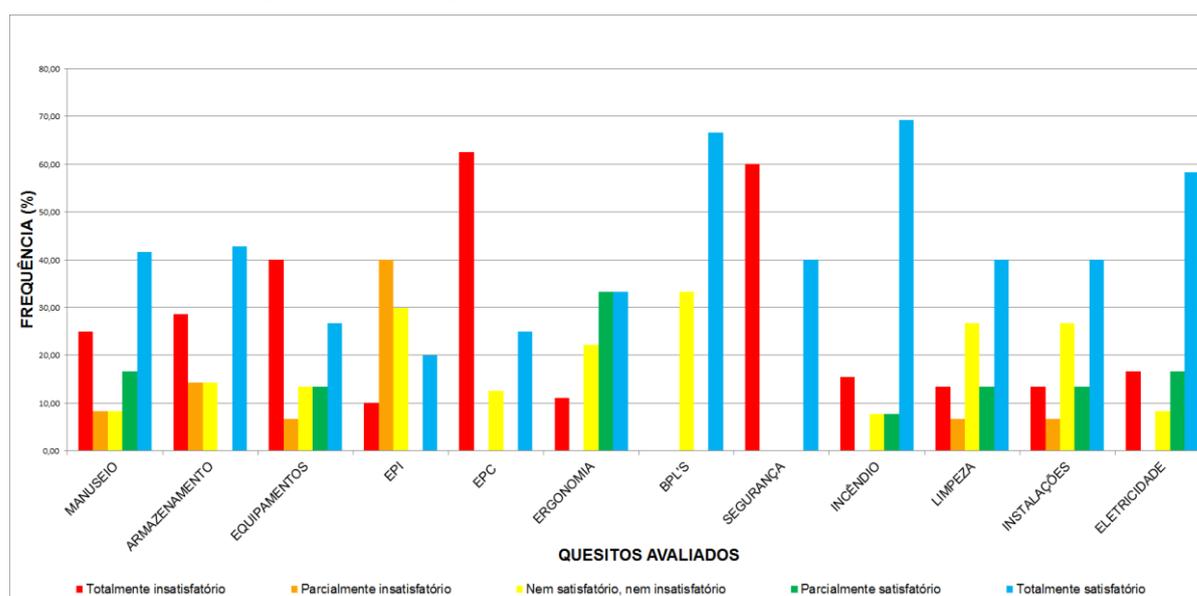
No quesito limpeza e condições sanitárias, o percentual de frequência foi de 40%, e foi observado que os recipientes coletores de lixo são higienizados periodicamente, materiais limpos e sujos permanecem separados durante todo o tempo, há medidas preventivas e corretivas com o objetivo de impedir a atração, o abrigo, o acesso e/ou proliferação de vetores e pragas urbanas. Entretanto, não existe registro de higienização de equipamentos e móveis, não existe o registro periódico de limpeza e organização geral do laboratório, a descontaminação das superfícies das bancadas e das áreas de trabalho é realizada apenas quando tem aulas práticas e as janelas não são limpas periodicamente.

E no quesito instalações, a frequência obtida foi de 59% devido o laboratório possuir um sistema de exaustão adequada, o teto e paredes do laboratório são de acabamento liso, em cor clara, impermeável e de fácil limpeza, as superfícies das bancadas são resistentes a choque mecânico, calor e produtos químicos, os corredores desse andar são adequados para a circulação de pessoas e materiais (o andar está adequado para a circulação de carrinhos de laboratório). Contudo, os móveis do laboratório não estão em número suficiente, não são de material apropriado, resistentes a fogo e produtos químicos, os bancos não são confortáveis

e não são de altura regulável e as pias do laboratório não possuem a profundidade recomendada.

Neste histograma de frequência, foi possível identificar que os quesitos prevenção de incêndio e BPL apresentaram frequências totalmente satisfatórias, com percentual acima de 60%. O quesito prevenção de incêndio obteve o melhor percentual, 69%, devido ao fato de que a instituição possui alarme de incêndio; o laboratório possui luzes de emergência, há extintores de incêndio disponíveis e dentro da validade; as portas dos ambientes de trabalho estão dispostas, de modo a abrirem de dentro para fora; o sistema de mangueira de incêndio está em local de fácil acesso e pronto para uso, caso necessário.

Figura 2 – Histograma de frequência do laboratório de histologia do Instituto Federal do Rio Grande do Sul – *Campus* Porto Alegre.



No quesito BPL, o percentual de frequência foi de 67%, e foi possível observar que não há o hábito de fumar, beber ou se alimentar no laboratório; os usuários fazem o uso dos EPIs e estão cientes da forma correta de utilizá-los; há um manual de biossegurança e materiais educativos disponíveis e os novos usuários do laboratório (alunos, professores, técnicos, entre outros) recebem treinamento antes de iniciarem as atividades.

Os quesitos que obtiveram frequência totalmente insatisfatórias foram: equipamentos, EPC e segurança, com frequência acima ou igual a 40%. No quesito equipamentos, o percentual de frequência foi de 40%, devido ao fato de que a

instituição não possuía o sistema de detecção de fumaça; as portas do laboratório e armários não apresentavam revestimento que retarde incêndios e não existe hidrante próximo à instituição.

No quesito que trata sobre EPC, o percentual de frequência foi acima de 60%, observou-se que não há POPs de primeiros socorros nem kit de primeiros socorros disponíveis no laboratório e não é realizado o expurgo do chuveiro de emergência.

O quesito segurança obteve um percentual de frequência de 60%, e foi constatado que o laboratório não possui os telefones de emergência, dados do responsável e nem mapa de risco anexados a porta do laboratório; também não conta com um ambulatório médico ou profissional qualificado e os seguranças não possuem treinamento adequado para lidar em situações de emergência.

O quesito EPI apresentou frequência parcialmente insatisfatória, com percentual de 40%, devido ao fato de que não existem EPIs disponíveis para todos os trabalhadores e nem para os diferentes tipos de atividades desenvolvidas, há luvas de látex com tamanhos limitados e o laboratório não possui óculos de segurança disponíveis para os usuários.

Alguns quesitos, como: manuseio e descarte de resíduos, armazenamento de produtos e materiais, limpeza e condições sanitárias, instalações e eletricidade, também, obtiveram frequências totalmente satisfatórias, mas não apresentaram frequência acima de 60%.

No quesito que trata sobre manuseio e descarte de resíduos, o percentual de frequência foi de 41%, porque os resíduos químicos são neutralizados antes de serem descartados, existe recipientes seguros para o descarte de vidros quebrados, os resíduos líquidos são acondicionados em recipientes resistentes, com tampa rosqueada e vedante. Em compensação, não existe um local apropriado para o armazenamento temporário dos resíduos químicos, e os resíduos químicos no estado líquido são submetidos a tratamento.

Na avaliação do armazenamento de produtos e materiais, o percentual de frequência foi de 42%, devido todos os reagentes químicos estão devidamente rotulados e identificados, os produtos químicos serem armazenados em ambiente escuro e fresco, e protegidos da ação dos insetos e roedores, o material armazenado na geladeira e freezer está rotulado com data, tipo de material e responsável. Porém, os produtos químicos não são estocados/organizados de acordo com a compatibilidade química, existe um registro diário de uso dos produtos

químicos, reagentes utilizados no dia-a-dia não são devidamente rotulados de acordo com a sua periculosidade.

O quesito limpeza e condições sanitárias o percentual de frequência foi de 40%, e foi constatado que o piso dos ambientes de trabalho é limpo diariamente, os banheiros são limpos diariamente, os produtos de higienização utilizados são regularizados pelo Ministério da Saúde. Entretanto, os recipientes coletores de lixo não são higienizados periodicamente, não existe registro de higienização de equipamentos e móveis, a higienização das instalações e dos objetos não é adequada e frequente.

Em relação as instalações, o percentual de frequência foi de 40%, porque o laboratório está equipado com pia para lavagem das mãos, as superfícies das bancadas são resistentes a choque mecânico, calor e produtos químicos, os corredores desse andar são adequados para a circulação de pessoas e materiais. Contudo, os bancos não são confortáveis, de altura regulável e permitem aos usuários boa postura e ergonomia, o laboratório não é climatizado artificialmente e o sistema de ventilação possui filtros adequados.

No quesito eletricidade, o percentual de frequência foi de 58%, e mostrou que a iluminação geral é adequada ao ambiente de trabalho; a instituição dispõe de um sistema de segurança contra raios; existem tomadas para os aparelhos de 110V e 220 V; apenas um aparelho é conectado em cada tomada e inexistem cabos elétricos atravessando a área de trabalho. Em compensação, os circuitos dos ambientes de trabalho não possuem interruptores para caso de falha de aterramento e a instituição não conta com gerador e no break caso haja queda de energia elétrica. E o quesito aspectos ergonômicos obteve a mesma frequência nos itens parcialmente e totalmente satisfatórios, com percentual acima de 30%, devido ao fato de que existe espaço para trabalhar com segurança no ambiente de trabalho, a intensidade luminosa é adequada à execução das tarefas no laboratório, atividades repetitivas e monótonas são evitadas no ambiente de trabalho e existe carrinho para transporte de materiais do laboratório.

Comparação dos resultados e discussão

Na comparação, pôde-se constatar que, de modo geral, muitos quesitos obtiveram de frequência similares, como: BPL, eletricidade, aspectos ergonômicos,

limpeza e condições sanitárias, prevenção de incêndio e instalações, com frequências totalmente satisfatórios. Enquanto os quesitos EPC e segurança, com frequências totalmente insatisfatórios.

Já os quesitos EPI, equipamentos, manuseio e descarte de resíduos, armazenamento de produtos e materiais obtiveram percentuais de frequência totalmente diferentes. Enquanto o item equipamentos obteve uma frequência totalmente satisfatório, com percentual acima de 60% no laboratório de Bioquímica, o mesmo obteve uma frequência totalmente insatisfatória, com percentual de 40%, no laboratório de Histologia.

O quesito EPI obteve frequência totalmente satisfatória, com percentual acima de 70% no laboratório de Bioquímica, mas no laboratório de Histologia obteve uma frequência parcialmente insatisfatório, com percentual de 40%.

No quesito manuseio e descarte de resíduos, obteve-se frequência totalmente insatisfatória, com percentual de 41% no laboratório de Bioquímica, enquanto no laboratório de Histologia, obteve-se maior frequência totalmente satisfatória, também com percentual de 41%. E no quesito armazenamento de produtos e materiais obteve frequência totalmente insatisfatória, com percentual de 42% e, no laboratório de Histologia, obteve-se maior frequência totalmente satisfatória, também com percentual de 42%.

Essa diferença se dá porque ambos os laboratórios possuem distintas atividades praticadas, nas quais necessitam do uso de diferentes EPI, são utilizados diferentes equipamentos e reagentes, nos quais devem ser armazenados, manipulados e descartados de maneira diferente.

Neste trabalho foram identificados vários riscos no ambiente laboratorial, neste sentido, Sangioni (2013) descreveu em seu trabalho que as atividades de ensino, pesquisa e extensão praticadas nos laboratórios de ensino de microbiologia e parasitologia das universidades brasileiras abrangem as diferentes áreas do conhecimento e no seu desenvolvimento existe a presença de riscos. Esse fato demanda a necessidade de normas de segurança destinadas à análise e desenvolvimento de estratégias para minimizá-los, sendo esta a principal função da biossegurança.

Outro trabalho da Universidade Estadual de Campinas, (2016) relata que grande parte dos acidentes em laboratórios são provocados por imperícia, negligência e até imprudência dos técnicos. Logo, é fundamental a adoção de

normas mais rígidas de segurança. No entanto, os profissionais, geralmente, não recebem, nas universidades, instruções adequadas sobre normas de segurança do trabalho, uma vez que são priorizadas às condições técnicas do candidato e raramente é analisado seu conhecimento sobre segurança.

Outra questão é seguir os preceitos da Norma Regulamentadora NR 9 que estabelece a obrigatoriedade de identificar os riscos à saúde humana no ambiente de trabalho, atribuindo às Comissões Internas de Prevenção de Acidentes (CIPA) a responsabilidade pela elaboração de mapas de riscos ambientais. A partir das informações deste trabalho será possível instrumentar a CIPA na elaboração de mapas de risco para os dois laboratórios.

Logo, universidades, por serem empresas públicas, devem constituir CIPA. No entanto, devido, principalmente, a sua dimensão, muitas áreas dentro da universidade não são atendidas pelo serviço da CIPA. Como é o caso do laboratório em análise, não tendo, dessa forma, seu mapa de riscos elaborado. No entanto, a constituição do mapa de risco é fundamental para reunir conhecimentos necessários para determinar a situação de segurança e saúde do trabalho no laboratório, pois permite troca e divulgação de informações, alertando, conscientizando e estimulando a participação dos usuários em atividades de prevenção (NEVES, 2006).

A partir desses resultados devemos considerar que há a necessidade de seguir as boas práticas de laboratórios, elaborar manuais de biossegurança e mapas de risco laboratorial para os laboratórios, além disso, todos estes deverão ser disponibilizados aos usuários dos laboratórios por meio de treinamentos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devemos pensar que cada laboratório é único, no sentido de que cada atividade desempenhada nesse ambiente gera um risco diferente. Este trabalho permitiu uma melhor visualização dos riscos do laboratório de Bioquímica e Histologia do Instituto Federal do Rio Grande do Sul – *Campus* Porto Alegre fazendo com que muitos dos problemas citados fossem levantados e assim a instituição pode tomar providencias e iniciar a correção dos mesmos. Este trabalho é o início de uma série de avaliações nos laboratórios da instituição, devemos ressaltar que estas

ações precisam ser realizadas continuamente nos laboratórios, pois os mesmos estão em constante atividade.

O trabalho permitiu que os usuários (alunos, professores, técnicos, estagiários, entre outros) pudessem receber orientações sobre os riscos existentes e conseqüentemente, se prevenir a possíveis acidentes de trabalho. Esta também é uma ação que precisa ser contínua, ainda mais se tratando de ações educativas.

As informações contempladas pelo presente trabalho, de identificação dos riscos nos laboratórios, servem de alerta e guia para tomadas de decisões futuras. Visto que, outro tema a ser estudado futuramente é a gestão de risco no laboratório, pois este trabalho só esta baseado na identificação do risco. Neste sentido devemos salientar que o processo de gestão de riscos é uma visão mais complexa, visto que estamos apenas iniciando o trabalho de avaliação de risco ambiental, e esta é somente a primeira etapa, pois após termos as fases avaliação do risco, controle de riscos e o gerenciamento do risco.

REFERÊNCIAS

BRASIL. **Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos. Ministério da Saúde.** Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. 3.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a. 70p. Disponível em: <[https://w2.fop.unicamp.br/cibio/downloads/cibio_diretrizes_gerais_trabalho_contencao_0_agenes_biológicos_3ed_.pdf](https://w2.fop.unicamp.br/cibio/downloads/cibio_diretrizes_gerais_trabalho_contencao_0 agentes_biológicos_3ed_.pdf)>. Acesso em: 22 maio. 2018.

BRASIL. **Classificação de risco dos agentes biológicos.** Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. 2.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010b. 44p. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/06_1155_M.pdf>. Acesso em: 22 maio. 2018.

BRASIL, **Ministério do Trabalho e Emprego;** Norma Regulamentadora 9 – Programa de Prevenção de Riscos Ambientais; Publicado em 30/12/1994. Disponível em: <<http://trabalho.gov.br/images/Documentos/SST/NR/NR09/NR-09-2016.pdf>>. Acesso em: 22 maio. 2018.

BRASIL, **Ministério do Trabalho e Emprego;** Norma Regulamentadora 15 – Atividades e Operações Insalubres; 29/09/2015. Disponível em: <<http://trabalho.gov.br/images/Documentos/SST/NR/NR15/NR-15.pdf>>. Acesso em: 22 maio. 2018.

CATAI, R. E. **Higiene do Trabalho – Gerência de Riscos**, Notas de aula do curso de Especialização em engenharia de segurança do trabalho – UTFPR, 2012.

CARVALHO, C.M.R.S. et. al. **Aspectos de biossegurança relacionados ao uso do Jaleco Pelos profissionais de saúde: uma revisão da literatura**. *Revista Texto & Contexto Enfermagem*, Florianópolis, Abr-Jun; 18(2): 355-60, 2009.

CIENFUEGOS, F. **Segurança no laboratório**. Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 269p., il. Inclui bibliografia. ISBN 8571930570 (broch.).

HIRATA, M. H. **O laboratório de ensino e pesquisa e seus riscos**. In HIRATA, M. H.; MANCINI FILHO, J. *Manual de Biossegurança*. São Paulo: Manoele LTDA, 2002.

MASTROENI, M. F.. **Biossegurança aplicada a laboratórios e serviços de saúde**. São Paulo: Atheneu, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes Gerais Para o Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos**. Brasília, DF: 3ª edição, 2010.

MOLINARO, E. M. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC 2009 v. 1.

NEVES, W. B.; MELO, R. A. M; RAMOS, C. P. S.; CAVALCANTI, M. B.; PEREIRA, F. H. B.; LACERDA, T. M. S. **Mapa de risco em laboratório clínico**. *Biociência & Desenvolvimento*, n. 36, 2006. Disponível em: <http://files.paulasennafarma.webnode.com.br/200000098-659bd66954/lab_36.pdf>. Acesso em: 22 maio 2018.

OLIVEIRA, Wilson Pinto de. **Manual de segurança em laboratórios**. São Paulo: [s.n.], 1987. 323p.

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. 2.ed. Rio de Janeiro, RJ: FIOCRUZ, 2010. 442p.

SANGIONI, L. A.; PEREIRA, D. I. B.; VOGEL, F. S. F.; BOTTON, S. A. **Princípios de biossegurança aplicados aos laboratórios de ensino universitário de microbiologia e parasitologia**. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.43, n.1, p.91-99, 2013.

Diagnóstico das concepções e das práticas de biossegurança entre alunos do IFRS – *Campus* Porto Alegre

Cassiano Pamplona Lisboa

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(cassiano.lisboa@poa.ifrs.edu.br)

Karin Tallini

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(karin.tallini@poa.ifrs.edu.br)

Carmynie Barros e Xavier

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(carmynie@gmail.com)

Resumo: O diagnóstico das concepções e das práticas de biossegurança entre estudantes usuários dos laboratórios de ensino do IFRS – *Campus* Porto Alegre é de suma importância para a elaboração de um programa de sensibilização em biossegurança a ser aplicado na Instituição. Os alunos ingressantes nos cursos Técnicos em Biotecnologia e Segurança do Trabalho, e no curso superior de Licenciatura em Ciências da Natureza formam a amostra estudada por pertencerem a um grupo de risco, uma vez que, os profissionais egressos dessas áreas poderão trabalhar em ambientes laboratoriais, tendo maior exposição a agentes químicos, físicos e biológicos em relação à população em geral. A exploração do campo de pesquisa foi realizada através do acompanhamento das aulas práticas e da realização de entrevistas por meio de questionários. Além disso, para a coleta dos dados, utilizou-se anotações em diário de campo e gravações (de áudio) das entrevistas. Analisando-se os resultados dos questionários, pode-se perceber que mais de 30% dos alunos ingressantes apontaram ter conhecimento sobre *biossegurança* e também sobre a separação de resíduos laboratoriais. Em contrapartida, apenas 12,7% dos entrevistados indicaram conhecer o termo *biossegurança*. Todos os participantes da pesquisa consideraram importante a presença da disciplina *biossegurança* no currículo dos respectivos cursos, contudo, a maioria não identificou o laboratório como um local perigoso.

Palavras-chave: Laboratório; Condições de Trabalho; Pesquisa Qualitativa.

Diagnosis of biosafety concepts and practices of IFRS students, *Campus Porto Alegre*

Abstract: The diagnosis of conceptions and practices of biosafety among students and users of IFRS - *Campus Porto Alegre* teaching laboratories is of utmost importance for the elaboration of a biosafety awareness program to be applied in the Institution. Students entering the Technical courses in Biotechnology, Occupational Safety; and a degree in Natural Sciences, forming a sample studied because they belong to a risk group, since the graduated professionals are areas of work in laboratory environments, having greater exposure of chemical, physical and biological agents in relation to the general population. The exploration of the field of research was accomplished through the monitoring of practical practices and the accomplishment of interviews through questionnaires. In addition, data collection and recording (audio) interviews were used for data collection. By analyzing the results of the questionnaires, it can be seen that more than 30% of the incoming students pointed out to have knowledge about biosafety and also about the separation of laboratory residues. On the other hand, only 12.7% of respondents indicated that they knew the term biosafety. All participant of the study considered important the presence of the biosafety discipline without curriculum of transposition of courses, however, most did not identify the laboratory as a dangerous place.

Keywords: Laboratory; Working Conditions; Qualitative Research.

INTRODUÇÃO

Segundo Andrade e Sanna (2007), a preocupação inicial dos profissionais da área da saúde encontra-se relacionada ao surgimento da Biossegurança como campo do saber que abordava as doenças transmissíveis, tendo o enfoque maior para o risco biológico, permanecendo esse destaque atualmente. Em um estudo realizado por Soares (2008), o conceito de Biossegurança está relacionado à minimização dos riscos de contaminação, através de um conjunto de medidas, envolvendo o meio ambiente e acidentes pessoais nos locais de trabalho. De acordo com a Organização Mundial da Saúde - OMS (2004), para uma adequada proteção biológica é necessário que as práticas de segurança sejam eficazes, pois servem de base para o sistema envolvido com a matéria Biossegurança:

Através de avaliações de risco efetuadas como parte integrante do programa de segurança biológica de uma instituição, recolhe-se informação sobre o tipo de organismos disponíveis, [...] identificação das pessoas [...] responsáveis. [...] Para cada serviço, é preciso preparar e implementar um programa específico sobre proteção biológica em laboratório, segundo as exigências do serviço, o tipo de trabalho realizado, e as condições locais. (OMS, 2004, p. 60).

Dessa forma, o contato com a biossegurança deve acontecer desde o início da formação, pois o aprendizado científico acontece por aproximações sucessivas e pela reconstrução permanente do conhecimento ao longo da escolaridade. A educação em biossegurança e suas atualizações são hoje fundamentais para a conscientização e mudança de hábito entre os usuários de laboratórios, pois exige uma modificação cultural para a adoção de medidas preventivas, devendo-se identificar e gerir os riscos. (GIR *et al.*, 2004; FARIAS e ZEITOUNE, 2005; SILVA *et al.*, 2015).

Alguns autores abordam essa temática de gerenciamento de riscos laboratoriais enfatizando a necessidade de capacitação dos recursos humanos, a exemplo disso, afirmou Mastroeni (2006):

A falta de uma cultura prevencionista tem sido o principal obstáculo para as pessoas agirem com precaução nos locais de trabalho. Muitos trabalhadores são admitidos sem treinamento e passam a exercer funções sem estarem familiarizados com os procedimentos dos serviços, contribuindo para o aumento do risco nas atividades. [...] Em virtude do fator humano ser a principal causa de acidentes em laboratórios, o maior esforço deve ser concentrado na educação, visto que alguns trabalhadores tendem a menosprezar os riscos, levando em consideração somente a execução do experimento. [...] A melhor proteção que podemos oferecer ao trabalhador é a informação e treinamento, pois nada valerá uma parafernália de equipamentos de proteção se estes forem incorretamente empregados. (MASTROENI, 2006, p. 04).

De acordo com Araújo (2007), muitos desafios são impostos à educação decorrente das modificações que são observadas no mundo do trabalho. Nesse sentido, cabe às instituições de ensino reconsiderar suas atribuições de modo a colocarem à disposição dos alunos meios que os tornem cognitivamente hábeis e capazes de adotar condutas diante das muitas situações. Para que um aluno tenha a capacidade de utilizar conhecimentos científicos na resolução de problemas de ordem prática, é preciso que a escola se responsabilize em repassar as informações necessárias para subsidiar e incentivar seus atos de maneira responsável, criativa e crítica. Ainda nesse sentido, a instituição escolar se torna um espaço onde o aluno desenvolve a criatividade, sensibilidade e a imaginação, fatores primordiais para a construção de um trabalhador mais capacitado para o exercício da cidadania (ARAÚJO, 2007). O educandário assume, portanto, um papel de destaque na construção de uma sociedade democrática e, para tal, a educação surge como um

dos pilares dessa construção, tendo em vista que é inquestionável a participação da mesma para a formação cidadã (SILVA, 2000).

Outro aspecto considerado na construção deste trabalho foi o fato do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, *Campus Porto Alegre*, ser uma instituição federal de ensino e, como tal, precisar se adequar as Normas Regulamentadoras (NRs) do Ministério do Trabalho em conformidade com o Manual para os Serviços de Saúde dos Servidores Civis Federais, neste caso NR – 7, Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional, NR – 9, Programa de Prevenção de Riscos Ambientais, e, quando aplicada a área de saúde conforme os cursos da Instituição tal como o Curso Técnico em Biotecnologia, NR – 32 que trata da Segurança e Saúde no Trabalho em Serviços de Saúde. Os órgãos públicos federais, nesse sentido, assumem a responsabilidade pela gestão da qualidade das condições de trabalho do servidor público federal e a educação em biossegurança se torna fundamental para que se faça essa ligação entre o ensinar e a prática em sala de aula e em laboratórios escolares, desde espaços mais simples como laboratórios de ciência até os mais especializados como os do ensino profissionalizante e da graduação e pós-graduação.

A instituição de ensino, entendida como local que congrega muitas pessoas, é concebida para educar para a vida, o que implica na prevenção e na criação da cultura de saúde e segurança. Ações de treinamento periódico são importantes para impedir que docentes e discentes fiquem inativos e paralisados, sabendo como se portar ante a um perigo iminente e desconhecido (REIS, 2005). Os alunos formados em ambientes seguros e apoiados para desenvolverem seus potenciais, adquirem conhecimentos e competências requeridas para prevenir os riscos e as situações que podem ameaçar a sua integridade. Assim sendo, o ensino da Biossegurança pode ser uma ferramenta útil para atender a essa demanda, em especial a partir da inclusão de conteúdos adequados nos currículos escolares (HERNAN GARCIA *et al.*, 2001).

Por fim, convém ressaltar que os laboratórios, sejam eles de ensino, pesquisa ou produção, representam um ambiente de risco, já que no mesmo espaço há equipamentos, reagentes, soluções, microorganismos, pessoas, papéis, livros, amostras, etc. Além disso, as atividades laboratoriais envolvem o manuseio de produtos químicos, vidrarias, equipamentos eletrônicos, bem como o uso de gases e a montagem de sistemas (TALLINI e LISKA, 2014).

Tendo em mente o acima exposto, o presente artigo apresenta e discute os resultados de uma pesquisa que teve como objetivo diagnosticar as concepções e as práticas de biossegurança de estudantes usuários dos laboratórios de ensino do IFRS, Campus Porto Alegre, com vistas à elaboração de um programa de sensibilização em biossegurança a ser aplicado na Instituição. O delineamento metodológico da investigação, os resultados e algumas ponderações a partir destes são apresentados nas seções que seguem.

METODOLOGIA

A investigação que subsidia as considerações apresentadas neste artigo pode ser caracterizada como de tipo qualitativo e de caráter exploratório. No contexto da metodologia qualitativa aplicada ao campo da biossegurança, é importante salientar que se emprega a concepção trazida das Ciências Humanas, segundo às quais não se busca estudar o fenômeno em si, mas entender seu significado individual ou coletivo no cotidiano das pessoas (TURATO, 2005). Nesse ínterim, torna-se indispensável saber o que os fenômenos, tais como trabalho, risco e segurança representam para elas. O significado tem função estruturante: em torno do que a situação representa, as pessoas organizarão de certo modo suas vidas, incluindo a adoção (ou não) de boas práticas no que se refere à biossegurança.

A primeira etapa da pesquisa se caracterizou pela construção e reestruturação dos instrumentos de pesquisa (questionários) até sua versão final. O questionário intitulado “Levantamento Preliminar em Biossegurança” foi composto por questões abertas e fechadas sobre biossegurança e informações relacionadas ao perfil do ingressante. Sua aplicação foi acompanhada pela negociação da participação na investigação por meio de termo de consentimento livre e esclarecido. A versão final do instrumento de pesquisa pode ser visualizada na Figura 1.

Na etapa posterior, o questionário foi aplicado aos participantes da pesquisa: 70 estudantes ingressantes no IFRS, matriculados nos cursos de graduação em Licenciatura em Ciências da Natureza – habilitação Biologia e Química; Técnico em Segurança do Trabalho; e Técnico em Biotecnologia. Os dados foram coletados no segundo semestre de 2012, durante o intervalo das aulas dos alunos. Para a tabulação e análise dos dados foram utilizadas planilhas eletrônicas, *Excel* (Plus

RESULTADOS

Do total de entrevistados - 70 alunos ingressantes - 25 estavam matriculados no curso de graduação em Licenciatura em Ciências da Natureza: Biologia e Química (n=25), 25 pertenciam ao quadro discente do curso Técnico em Segurança do Trabalho (n=25) e 20 era oriundos do curso Técnico em Biotecnologia (n=20).

No que tange aos resultados da investigação, um dos primeiros aspectos a serem considerados diz respeito ao conhecimento dos discentes acerca do tema biossegurança. Conforme expressaram nos questionários, 56% dos ingressantes considerou não ter conhecimento sobre o significado de biossegurança, por não ter um contato formal com o tema (83%), destacando-se os alunos matriculados no curso de Licenciatura em Ciências da Natureza. Em direção semelhante, os estudantes (60%) não identificaram o laboratório como um local perigoso.

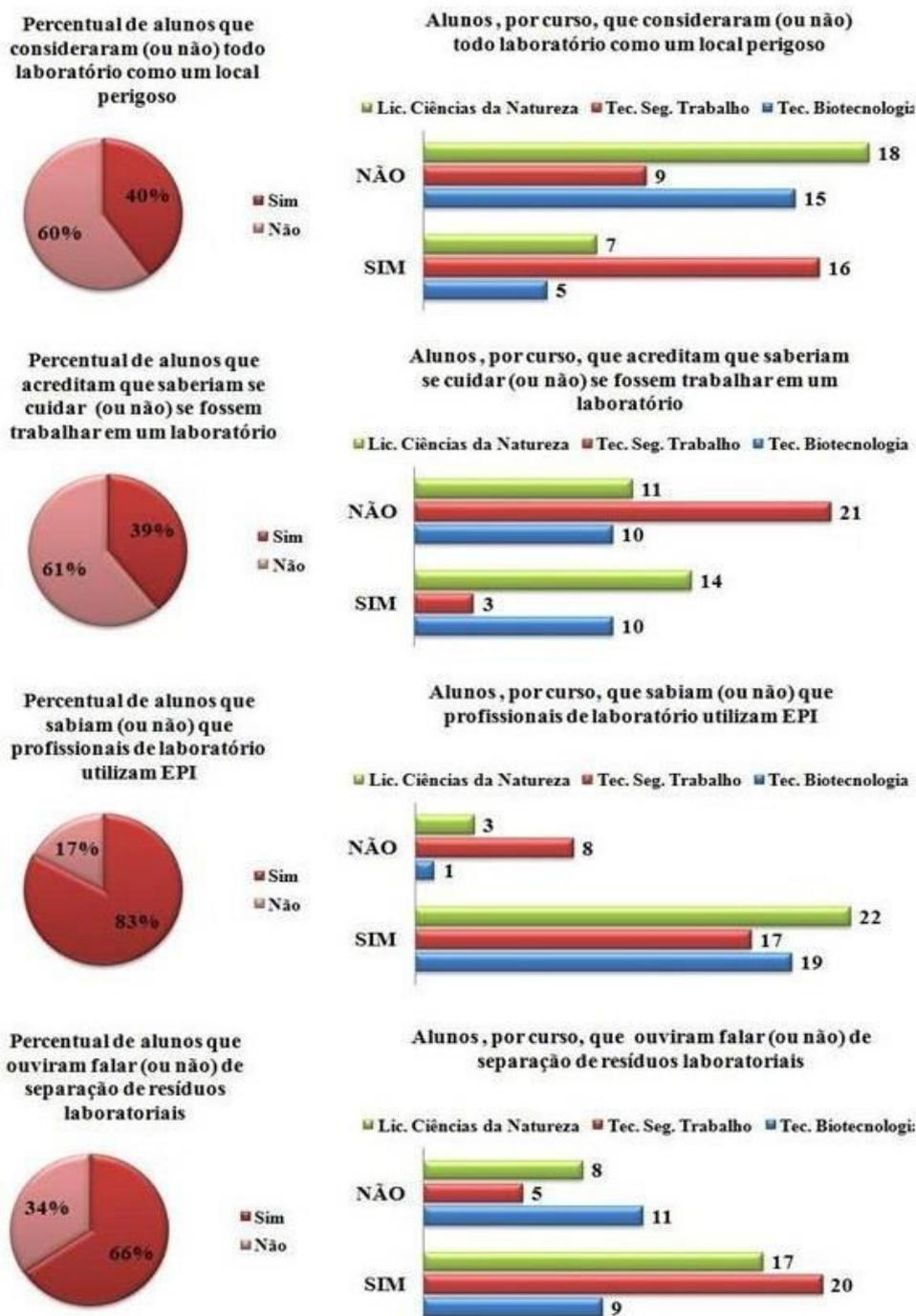
As respostas fornecidas às demais questões apresentadas, entretanto, permitem-nos relativizar em parte os dados apresentados acima e identificar a existência de noções básicas em relação a como se portar nesse tipo de ambiente. Como exemplos e indicativos dessas noções, cerca de 83% dos estudantes sabiam que profissionais da área utilizam EPIs e 66% tinham conhecimento acerca da separação de resíduos laboratoriais (ainda que 61% afirmaram que não saberiam se cuidar em um laboratório). Os alunos do Curso Técnico de Segurança do Trabalho apresentaram ter mais familiaridade com o termo *biossegurança*. Diferentemente de outros cursos, a maior parte (64%) dos discentes reconheceu o laboratório como um ambiente perigoso, Foi unanimidade entre os entrevistados a importância do tema *biossegurança* no curso em que estão ingressando. Esses dados podem ser observados a seguir nas Figuras 2.1 e 2.2. As duas ilustrações possibilitam uma visão geral das informações coletadas e tabuladas ao longo do presente estudo.

Figura 2.1 - Concepções de biossegurança entre alunos ingressantes (2012) dos cursos de Licenciatura em Ciências da Natureza, Técnico em Segurança do Trabalho e Técnico em Biotecnologia do IFRS, *Campus* Porto Alegre.



Fonte: elaboração própria.

Figura 2.2 - Continuação das Concepções de biossegurança entre alunos ingressantes (2012) dos cursos de Licenciatura em Ciências da Natureza, Técnico em Segurança do Trabalho e Técnico em Biotecnologia do IFRS, *Campus* Porto Alegre.



Fonte: elaboração própria.

DISCUSSÃO

Ribeiro e colaboradores (2015) realizaram um estudo com docentes do ensino técnico em enfermagem e verificaram a predominância de três concepções de *biossegurança*, em ordem decrescente: como sinônimo de equipamentos de proteção individual; como proteção dos envolvidos no trabalho; e como segurança da vida. Verificaram também que o docente reproduz aprendizados escolares e toma decisões influenciadas pelos cenários de sua prática. Nesse estudo, conclui-se que os docentes entendem a importância de adotar práticas laborais seguras, e que o ensino influencia nas ações dos futuros profissionais, no entanto, a concepção de defesa da vida foi minoritária.

No estudo de Neto (2017), que investigou o conhecimento e a adesão de 343 estudantes da área da saúde às Medidas de Prevenção Padrão (MPP) e a percepção dos riscos de estudantes a partir do 4º período dos cursos de enfermagem, medicina e odontologia, evidenciou-se que quanto ao ensino das medidas de biossegurança no decorrer da graduação, 94% dos entrevistados na enfermagem, 26% na medicina e 99,1% na odontologia relataram ter recebido instrução sobre medidas de biossegurança em algum momento da graduação.

No nosso estudo, todos os alunos afirmaram que no local de ensino se adotam boas práticas de biossegurança, dentre essas, a utilização dos Equipamentos de Proteção Individuais (EPI's) e Equipamentos de Proteção Coletivos (EPC's), assinalando-os conforme o requerido no instrumento de pesquisa. O trabalho de Neto (2017) mostrou que 100% dos estudantes da enfermagem e da odontologia declararam utilizar frequentemente os EPIs, 82% dos alunos de medicina afirmaram aderir ao uso.

Ao cruzar as respostas fornecidas a diferentes perguntas, percebemos que a maioria dos ingressantes reconhecem os EPIs como um item utilizado por profissionais do laboratório, contudo não consideraram esse ambiente perigoso (n=35). Pelas respostas encontradas (Figura 3), percebemos que o uso do EPI está mais associado à função desempenhada pelo trabalhador do que com a proteção que este confere. Por exemplo, o uso do jaleco está mais associado à imagem de analista clínico do que à proteção contra reagentes químicos e chamas.

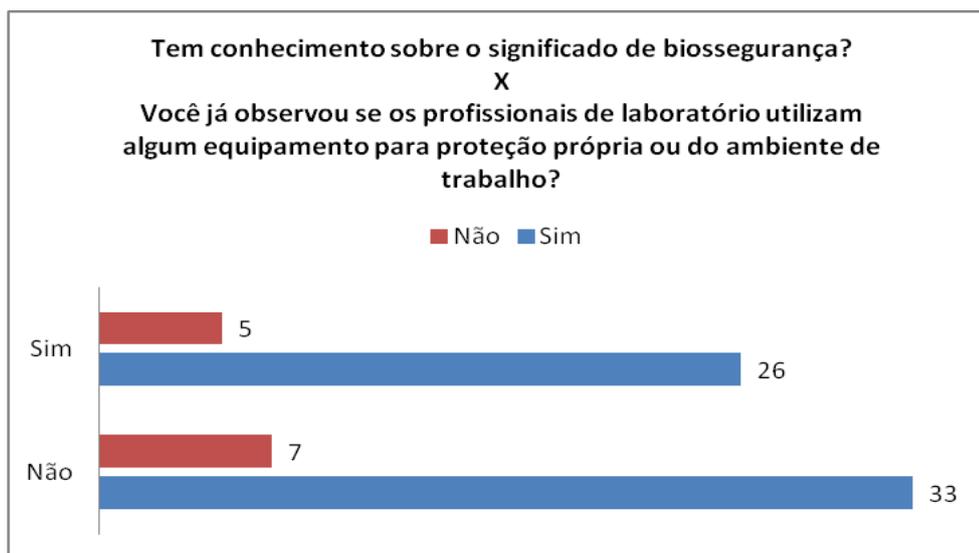
Figura 3 - Uso de EPIs e impressões sobre segurança

Fonte: elaboração própria.

No que se refere à utilização dos equipamentos de proteção individual, constatou-se no estudo de OLIVEIRA (2009) que os alunos do curso de enfermagem utilizaram com frequência superior a 90%, somente a máscara e a luva, e/ou usaram de forma inadequada o gorro, os óculos e o avental. Para os alunos do curso de medicina houve resposta satisfatória quanto ao uso de luvas (100,0%), avental (95,0%) e máscara (90,0%); porém o gorro e os óculos não apresentaram respostas com a mesma frequência.

A Figura 4, por sua vez, demonstra a percepção dos alunos que reconhecem o significado de *biossegurança* da mesma forma que consideram os EPI's como ferramentas utilizadas pelos profissionais da área. Ou seja, os indivíduos que atuam em laboratórios, minimizam os riscos e incidentes nestes ambientes, potencializando o entendimento dos frequentadores destes locais quanto ao comportamento e vestimenta requeridos.

Em linhas gerais, outros autores já afirmaram que no Brasil, a biossegurança não é adequadamente inserida nas diretrizes curriculares das instituições de ensino superior, relativas à área da saúde, principalmente nos cursos de medicina e enfermagem (PEREIRA, *et al.*, 2010; REIS, 2013).

Figura 4 - significados atribuídos ao termo ‘biossegurança’ e uso de epis.

Fonte: elaboração própria.

Na pesquisa de VARGAS e colaboradores (2014) realizada na Universidade Federal de Uberlândia Campus de Patos de Minas com os acadêmicos em Biotecnologia do primeiro ao quinto período do semestre letivo de 2013 foi verificado que a maioria dos alunos ingressantes no Curso de Biotecnologia (79,4%) considerou o tema importante, achou a disciplina necessária ao biotecnólogo e afirmou que a biossegurança promove a melhoria em laboratórios. Já quando o quando a pesquisa foi realizada após cursarem os mesmos terem cursado a disciplina de Biossegurança, os resultados demonstraram que, após os conhecimentos adquiridos, 98,04% dos discentes julgaram o tema importante e afirmaram que a disciplina é necessária ao biotecnólogo e que a biossegurança promove a melhoria em laboratórios.

Os estudantes se apresentam, em um primeiro momento, com um pensamento simplista em relação à biossegurança, uma vez que a associaram primariamente à prevenção dos acidentes vinculados ao laboratório. Nessa linha de raciocínio, reconheceram que existem consequências graves, aqui entendidas como acidentes, se não houvesse ações de biossegurança. De fato, a diminuição dos casos de acidentes em laboratórios de pesquisa tem sido o principal desafio à falta de conhecimento, que estabelece a prevenção como principal meio de controle. Muitos acadêmicos, bolsistas e estagiários estão em contato com os laboratórios sem treinamento e por isso exercem funções sem estarem familiarizados com os

procedimentos das atividades, favorecendo o aumento do risco. MÜLLER (2004) e MARQUES (2010) relatam que é necessário que todos os envolvidos em atividades de risco tenham o conhecimento sobre as regulamentações de biossegurança e que sejam aptos a colocá-las em prática de forma efetiva.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A capacitação dos alunos é citada como fundamental durante o processo de formação, fazendo-se necessária a elaboração de um programa de sensibilização em biossegurança. Os entrevistados expressaram a importância de saber não apenas quais são os equipamentos de proteção, e sim, como utilizá-los de forma correta. Por unanimidade, veem na disciplina de biossegurança uma forma de incentivo, através da educação para que as práticas de risco e o comodismo sejam modificados pelas ações resultantes na proteção do discente e no seu futuro profissional.

O trabalho de Lima (2017) relata que visão de biossegurança para os estudantes de licenciatura são orientações pouco exploradas em suas formações, carecendo ampliá-las ainda na formação ou através de manuais que discutam e orientem professores e alunos da Educação Superior e/ou Básica aos cuidados que minimizem riscos de acidentes e proponham alternativas nas atividades práticas experimentais de ensino.

Desta maneira se torna necessário incorporar nos currículos dos cursos à adoção as diretrizes de biossegurança, boas práticas de laboratório e gestão de laboratório para que ao longo do tempo tenhamos profissionais com uma formação mais consciente das suas ações e as consequências no mundo do trabalho.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. C.; SANNA, M. C. **Ensino de biossegurança na graduação em Enfermagem: uma revisão da literatura**. REBEN, 60 (5), set.-out., 2007, p.569-572.

ARAÚJO, O. J. M. **A prática docente e a formação cidadã**. 2007. Disponível em: <<https://www.webartigos.com/artigos/a-pratica-docente-e-a-formacao-cidada/1059>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

FARIAS S. N. P.; ZEITOUNE, R. C. G. **Riscos no trabalho de enfermagem em um Centro Municipal de Saúde**. Revista de Enfermagem UERJ, v.13, p. 167- 174, 2005.

GIR, E.; TAKAHASHI, R. F.; OLIVEIRA, M. A. C.; NICHATA, L. Y.; CIOSAKI, S. I. **Biossegurança em DST/AIDS: condicionantes da adesão do trabalhador de enfermagem às precauções**. Rev. Esc. Enferm. USP. São Paulo, v.38, n.3, p. 245-53, abr/mai, 2004.

HERNAN GARCIA, M.; RAMOS MONSERRAT, M.; FERNANDEZ AJURIA, A. **Revisión de los trabajos publicados sobre promoción de la salud en jóvenes españoles**. Rev. Esp. Salud Publica, Madrid, v. 75, n. 6, p. 491-504, nov. 2001. Disponível em <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272001000600002&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 26 mar. 2018.

MARQUES, M. A.; COSTA, M. A.; SULDOSKI, M. T.; COSTA, G. F. M. **Biossegurança em laboratório clínico: uma validação do conhecimento dos profissionais a respeito das normas de precauções universais**. RBAC2010; 42:283-6.

MASTROENI, M. F. **Biossegurança aplicada a laboratórios e serviços de saúde**. *Atheneu*. 2ª Edição. São Paulo, 2006.

MÜLLER I.C., MASTROENI M.F. **Tendência de acidentes em laboratórios de pesquisa**. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 2004; 33:101-8.

OLIVEIRA, A. C. & GONÇALVES, J. A. **Incidência de Acidentes com Material Perfurocortante entre Alunos de Graduação em Ciências da Saúde**. *Cuid Saude*. 2009 Jul/Set; 8(3):385-392.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Manual de segurança biológica em laboratório**. 3ª ed. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2004. 204 p.

PEREIRA, M. E. C.; COSTA, M. A. F.; BORBA, C. M. *et al*. **Construção do Conhecimento em Biossegurança: uma revisão da produção acadêmica nacional na área de saúde**. (1989-2009). Rev Saúde Soc. 2010; 19 (2):395- 404.

REIS, M. M. A. S. **Acidentes escolares nos agrupamentos de escolas de Braga entre 1998 e 2003**. 2005. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Estudos da Criança - Promoção da Saúde e Meio Ambiente, Universidade do Minho, Braga, 2005. Disponível em <[http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/3247/1/ACIDENTES OCORRIDOS NOS AGRUPAMENTOS DE ESCOLAS DE BRAGA NOS ANOS LECTIVOS 1998 a 2003.pdf](http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/3247/1/ACIDENTES%20OCORRIDOS%20NOS%20AGRUPAMENTOS%20DE%20ESCOLAS%20DE%20BRAGA%20NOS%20ANOS%20LECTIVOS%201998%20a%202003.pdf)>. Acesso em: 26 mar. 2018.

REIS P. G. T. A, DRIESSEN A. L, da COSTA A. C. B. A, *et al*. **Perfil epidemiológico de acidentes com material biológico entre estudantes de medicina em um pronto-socorro cirúrgico**. Rev Col Bras Cir. 2013 Jul; 40 (4):287-92.

RIBEIRO, G.; PIRES, D. E. P. & FLÔR, R. C. **Concepção de biossegurança de docentes do ensino técnico de enfermagem em um estado do sul do Brasil.** Trabalho, Educação e Saúde. V 13 (3) p. 721-737. Rio de Janeiro, Set/Dez, 2015.

SILVA, Aida Maria Monteiro. **Escola Pública e a formação da cidadania: possibilidades e limites.** 2000. 222 f. Tese (Doutorado) - Curso de Faculdade de Educação, Pós-graduação da Faculdade de Educação, Universidade de São Paulo-SP.

SILVA, M. D. S.; SILVA, P. H.; OLIVEIRA, Y. R.; ABREU, M. C.; OLIVEIRA, P. V.; PACHECO, A. C. L. **Biossegurança em laboratórios: uma revisão de literatura.** *Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade*, v. 8, n. 2, p. 145-173, jun. 2015.

SOARES, B. E.C. **Prevenção de Riscos Biológicos para os profissionais de Saúde e Perspectiva de Biossegurança.** *Revista Infecto Atual*; Ano IX. Edição 50. Abril/Maio, 2008.

TALLINI, K.; LISKA, M. *Biossegurança.* In: Alessandra Nejar Bruno. (Org.). ***Biotecnologia I - Princípios e Métodos.*** 1ªed. Porto alegre: Artmed Editora LTDA, 2014, v. I, p. 47-59.

TURATO, E. R. **Métodos qualitativos e quantitativos na área da saúde: definições, diferenças e seus objetos de pesquisa.** *Revista de Saúde Pública*, Campinas, v. 39, n. 3, p.507-514, abr. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v39n3/24808.pdf>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

VARGAS, L.; RIBEIRO, M. A.; ARAÚJO, T. G. **A biossegurança na opinião dos estudantes da Universidade Federal de Uberlândia; Um desafio biotecnológico.** *Evidência*, Joaçaba v. 14 n. 2, p. 99-112, jul./dez. 2014. Disponível em: <http://editora.unoesc.edu.br/index.php/evidencia/article/view/5070/pdf_16> Acesso em: 26 mar. 2018.