Contos Novos de Mário de Andrade e o caráter autobiográfico do narrador em primeira pessoa

Alex de Andrade Medeiros, Marilúcia Mendes Ramos
Faculdade de Letras – UFG
e-mail: alex.byte@hotmail.com marilucia_ramos@uol.com.br

Palavras-chave: Mário de Andrade, *Contos Novos*, literatura, psicanálise, caráter autobiográfico

Introdução

Contos Novos de Mário de Andrade é uma publicação póstuma, de 1946, que reúne nove narrativas curtas marcadas pela maior depuração compositiva e estilística do autor, ressaltando sua maturidade artística.

Os contos apresentam estruturação moderna e acolhem os recursos estilísticos mais presentes na ficção Brasileira das décadas de 30 e 40, em que os relatos são explicitados pelo fluxo de pensamento das personagens, funcionando, os fatos exteriores, como propulsores para as situações e reflexões porque passam suas personagens, mas fogem, entretanto, da preferência pela espacialização rural, como verificado no *Romance de 30*.

O contexto histórico-cultural é o da cidade de São Paulo, durante as décadas de 20 e 40, período marcado pelos processos de forte urbanização e industrialização e também pelo embate, ainda, entre o patriarcalismo e a onda progressista.

As nove narrativas intitulam-se “Vestida de preto”, ”O ladrão”, ”Primeiro de maio”, ”Atrás da Catedral de Ruão”, ”O poço”, ”O peru de Natal”, ”Frederico Paciência”, ”Nelson” e ”Tempo da camisolinha”. Entre esses contos apenas quatro são de caráter autobiográfico, ou seja, são narrativas em primeira pessoa caracterizadas por relatos de cunho memorialista. Nestes, um *eu* conta suas reminiscências em ambiente familiar. Os demais contos são narrados em terceira pessoa. Já nestes há o relato de personagens em ambientes e circunstâncias sociais bastante diversas, em que há o distanciamento do narrador dos fatos narrados, embora seja uma marca de Mário de Andrade um distanciamento relativo,

pois em contos como “Primeiro de Maio” ou “O poço”, o trabalho da enunciação leva o leitor a imaginar um narrador bem próximo da personagem principal ou da cena meticulosamente trabalhada.

Objetivos

Em função de estudos desenvolvidos durante a disciplina obrigatória do curso de Licenciatura em Letras, “Psicologia da Educação I e II”, surgiu o interesse pelos trabalhos de Freud e, após a leitura espontânea de *Contos novos*, também por pesquisar como a psicanálise, tão estudada por Mário de Andrade, aparece em sua obra, tendo sido tomado para estudo esse livro de contos, apesar de se saber que Mário se debruçou sobre essa relação literatura-psicanálise em outros livros.

Para o *corpus* deste projeto foram selecionadas as narrativas em primeira pessoa a fim de analisar as implicações do caráter autobiográfico do narrador em primeira pessoa. Essa análise foi desenvolvida com base em dois estudos de Sigmund Freud sobre como a sexualidade se desenvolve no ser humano, desde seu nascimento até a puberdade, *Três ensaios sobre a Teoria da sexualidade* e *Totem e Tabu*, publicados em 1905 e 1914, respectivamente. Os contos analisados foram, portanto, “Vestida de preto”, “O peru de Natal”, “Frederico Paciência” e “Tempo da camisolinha”, listados aqui conforme sumário de *Contos novos* (1999). Paralelamente ao estudo à luz da psicanálise, procedeu-se ao estudo da teoria sobre o narrador em primeira pessoa, com base nos textos de José Luiz Fiorin, *Elementos de análise do discurso*, e Alfredo Leme Coelho de Carvalho, *Foco narrativo e fluxo da consciência*: *questões de teoria literária*, este, uma reunião de teorias de vários autores sobre o assunto.

Pretendeu-se, com base nessa organização da pesquisa, entender a dimensão de uma narrativa em primeira pessoa, de caráter autobiográfico, e estender as conclusões aferidas para a compreensão, ainda que parcialmente, por meio da literatura, do caráter e do processo de amadurecimento geral de um indivíduo brasileiro, habitante de uma metrópole, durante a primeira metade do século XX, utilizando a ótica psicanalítica para tal, conforme se explicitará abaixo.

Metodologia

Para a elaboração da pesquisa, procedeu-se primeiramente à leitura e fichamento do livro de contos para a seleção daqueles em primeira pessoa, verificando-se serem quatro, como mencionado acima. Após essa seleção, procedeu-se à leitura e fichamento de textos teóricos sobre o foco narrativo e suas implicações na construção do caráter autobiográfico no trabalho da enunciação. Paralelamente a estes, foi feito o estudo e fichamentos dos textos de Freud que versam sobre a sexualidade, já que se verificou nos quatro contos em primeira pessoa a manifestação do desenvolvimento sexual da personagem Juca, protagonista dos quatro contos (apesar de no conto "Tempo da camisolinha" a personagem não ser nomeada), como será melhor explanado abaixo.

Desta forma considera-se lógico, quanto à disposição dos contos na análise, que fossem organizados conforme a ordem cronológica dos fatos, que é inversa à disposição dos mesmos em *Contos novos*. Então, obteve-se a seguinte ordem que foi seguida para a análise, sendo preponderante a passagem da idade da personagem:

*	Conto	Período de produção	Idade do narrador-personagem
1º	Tempo da camisolinha	1939-1943	O protagonista narra sua vida quando tinha 3/4anos de idade.
2º	Frederico Paciência	São Paulo, 1924-1942	Dos 14 aos 17, 18 anos.
3º	O peru de Natal	1938 -versão definitiva, agosto, 1942	19 anos
4º	Vestida de preto	Rio, 1939 – São Paulo, 17-11-43	Relembra vários momentos de sua juventude. Dos 5 aos 25 anos.

Para o direcionamento da leitura, foram focados as impressões e os desdobramentos da vida de Juca, o narrador-personagem, aquele que participa diretamente dos fatos narrados, como melhor explanado na "Discussão".

Em razão da complexidade da leitura e compreensão dos textos de Freud para um aluno de Letras, portanto não especialista, cuja leitura prévia no curso de Licenciatura foi direcionada para outros fins, e a partir das discussões com os professores de Psicologia e Estudos Lingüísticos, optou-se por selecionar o levantamento e fichamento de obras que estabelecem a relação entre literatura e psicanálise, como as de Dante Moreira Leite, *Psicologia Diferencial* e *Psicologia e Literatura*, bem como a leitura e seleção de conceitos de literatura e estética presentes na primeira

parte da obra de Mikhail Bakhtin, *Questões de Literatura e Estética* (1993), para a próxima etapa da pesquisa, em que se concluirá o projeto.

Resultados

Como resultados a pesquisa propiciou a apresentação de comunicação, bem como publicação de resumo em versão virtual, no *X Colóquio de Pesquisa e Extensão,* realizado na Faculdade de Letras em março de 2009, intitulada “Contos Novos de Mário de Andrade e o caráter autobiográfico do narrador em primeira pessoa”. Discussão com a professora de Psicologia, que atende a Faculdade de Letras, sobre os livros de Freud, o que levou a novo e diversificado fichamento desses textos. Discussão com a orientadora e professores da área de Estudos lingüísticos da Faculdade de Letras sobre as nuanças no trato de um narrador em primeira pessoa, o que enriqueceu o entendimento dessa vertente do trabalho, bem como na releitura dos contos.

Discussão

Juca é o narrador-protagonista, portanto o responsável pela narração, transmissão, ou produção do discurso ao mesmo tempo em que está inserido na realidade que vivencia, visto que ele é o único responsável pela transmissão das informações que nos são dadas e é atuante na narrativa. Tudo o que nos é transmitido é filtrado pelas suas impressões de mundo e limitado a sua 'maneira' de exprimir suas idéias. Em outras palavras, de acordo com os conceitos ligados ao *percurso gerativo de sentido*, podemos afirmar que Juca é o responsável pelo *enunciado*, que é o produto de sua *enunciação* (FIORIN, 2008). A enunciação é o ato da produção do discurso.

Sabendo que o leitor é 'refém' do enunciado de Juca, não se tem condições de alcançar a plena realidade que o rodeia, visto que a personagem Juca, assim como todos os seres humanos, não é onisciente sobre o tempo, o lugar e o espaço, causando incredibilidade ao leitor (CARVALHO, 1981). Essa é a primeira diferença entre um narrador-personagem e um narrador-onisciente, que, como o próprio nome indica, tem onisciência sobre todas as coisas e está distanciado das ações das personagens, podendo realizar reflexões imparciais (que é o que se espera) sobre o

que observa, garantindo maior autenticidade sobre os fatos.

Segundo o sistema de Manuel Komroff (citado por CARVALHO,1981), Juca apresenta um *ponto de vista interno*, pois ele é um dos "atores", isto é, faz parte dos personagens da narrativa. Algumas desvantagens desse ponto de vista, apontadas por esse autor, dizem respeito à falta de acesso ao pensamento das outras personagens e a impossibilidade do protagonista fazer uma apreciação de si próprio.

Visto os 'problemas' sobre a condição do narrador-personagem, concluí-se que realmente estamos impotentes na busca de todas as respostas que se deseja obter sobre a realidade e a(s) personagem(s) que acompanhamos na narrativa de primeira pessoa. Contudo, ainda podemos fazer suposições por meio de analogias entre o mundo fictício e o real, visto que o segundo é a base para a construção do primeiro. Além do mais, o foco da pesquisa, como já foi mencionado, é Juca, sua ótica e seus julgamentos a respeito da realidade em que vive. Não há razão, nas circunstâncias dessa pesquisa, para adentrarmos na consciência dos outros personagens. Juca, como narrador, é o que apresenta maior intensidade e intimidade com o universo ao qual pertence.

Resumidamente, vimos que Juca é o *enunciador* (autor implícito ≠ Mário de Andrade) de sua história, expressa em um *enunciado* (produto da enunciação = 'texto') que visa convencer aos *enunciatários* (leitor implícito ≠ nós) sobre a veracidade da mesma. Esses raciocínios colocados em parênteses servem para esclarecer um pouco mais sobre o processo de transmissão das 'idéias', neste caso, de Juca, que não podem ser jamais consideradas como as 'idéias' de Mário de Andrade, assim como os enunciatários, que são os leitores imaginados por quem cria um texto, não podem ser considerados 'nós', os leitores de carne e osso. Todo esse processo está presente quando um enunciador está em processo de criação, pois ele objetiva, mais do que comunicar, convencer seu leitor sobre o que escreve e para tal fim, precisa imaginar para quem o faz (CARVALHO, 1981).

A tarefa de convencer um indivíduo a aceitar certas proposições não é tão simples, devido a muitas limitações de diversos tipos. Sabemos que as limitações são comuns a todos os homens e produtos de seu empenho, impedem-no de alcançar tudo o que deseja. Além disso, as próprias maneiras como cada ser humano se expressa pode não ser devidamente compreendidas por outros e ter seu sentido alterado. Isso é grandemente válido também no âmbito da escrita. Enfim, uma série de fatores podem desviar as intenções do *eu* responsável pelo discurso.

Estes desvios de intenção justificam-se pelo duplo caráter do *eu*: o *eu pressuposto* e o *eu projetado*.

Juca na instância do enunciador, ou seja, aquele que produz o enunciado, é o *eu pressuposto*. Mas o Juca que está refletido pelo discurso do enunciado, não é o mesmo que o produz. Este está na instância do narrador. Simploriamente, dificilmente alguém poderá reproduzir por escrito a mesma idéia que está em sua mente de modo a evitar novas interpretações.

As informações sobre a configuração de Juca como narrador-protagonista e dos fatores que rodeiam a produção do enunciado já são suficientes, considerando os anseios da pesquisa. Mas, ainda há outro fenômeno que está vinculado à narrativa de uma personagem e que não podemos deixar de mencionar. Este é elucidado por meio de um termo psicanalítico chamado *fantasmagonia*. Para explicar esse conceito, pode-se recorrer ao seguinte raciocínio: Juca narra sua própria história de vida, logo, supõe-se que as experiências que narra podem não estar mais tão vívidas em sua memória. Para que ele possa narrar os fatos com certa exatidão é necessário que estes sejam marcantes, razão pela qual, muitas emoções passadas podem ser reavivadas durante o processo.

A esse reavivamento de fatos pretéritos com retorno da emoção que se julgava passada denominamos *fantasmagonia* e os fatos reavivados em si chamam-se *fantasmas*. Mário de Andrade chamava esse mesmo fenômeno de outra maneira, *Assombração*. Esse termo tornou-se, então, propriedade dos estudos literários. Porém, é valido comentar que Mário de Andrade não considerava que houvesse possibilidade de reviver e sentir sensações e sentimentos do passado. Para ele “o que a gente faz é povoar a inteligência de assombrações exageradas e secundariamente falsas”, conforme se lê em nota de rodapé do texto de Ivone Daré Rabello (1999, p. 47).

Logo se pode perceber, com o pouco já discutido, que estas narrativas em primeira pessoa enquadram-se no gênero autobiográfico, que como o próprio nome mostra, são aquelas que apresentam manifestações literárias como confissões e memórias que revelam os sentimentos íntimos de seus autores.

Tendo situado, então, as questões que delineiam a condição do narrador-personagem na produção do discurso é possível iniciar a análise dos contos do ponto de vista psicanalítico, conforme as leituras mencionadas previamente.

1º conto: Tempo da Camisolinha

Neste conto Juca narra como foi o início de sua segunda infância, aos quatro anos de idade. A camisolinha, a imagem de Nossa Senhora do Carmo, a foto que tirou com irmão Totó, quatro anos mais velho que ele, são elementos que o ajudam no resgate de sua memória.

Esses objetos são necessários para esse resgate, pois, sem eles, dificilmente se lembraria de muitos detalhes. Freud menciona em seu estudo sobre a *Teoria da sexualidade* (1905) que existe algo que impede a busca em nossa memória dos fatos que antecedem os seis anos de idade. Denomina-se *amnésia infantil*. Esta amnésia é responsável por isso e também está vinculada a casos de *amnésia histérica*, que são responsáveis pelo recalcamento da consciência de qualquer período da vida.

O enredo é sobre a infância de Juca, em um momento que sua família decide passar as férias escolares de Totó, seu irmão, na cidade de Santos, interior de São Paulo. Nesse mesmo período, Juca é obrigado a cortar seu cabelo por imposição de seu pai, mas, em meio a tantas desgraças, ganha de um operário que trabalha próximo de sua casa três estrelas-do-mar, detentoras de boa sorte. A infelicidade alheia afeta seus sentimentos e ele se sente impelido a doar suas estrelas.

O primeiro fato marcante do conto é a maneira como ele menciona as colocações de seu pai e demonstra a imagem negativa que desde cedo já é construída pelos meninos. Sobre essa ordem de seu pai, Juca afirma ser “uma decisão à antiga, brutal, impiedosa, castigo sem culpa, primeiro convite às revoltas íntimas: “é preciso cortar os cabelos desse menino” (p.103).

A teoria da sexualidade demonstra que, ainda na primeira infância, a criança do sexo masculino tende a alimentar por sua mãe uma espécie de amor que a torna um objeto sexual, isto é, a primeira pessoa de onde provém a atração sexual. Ela é a pessoa mais próxima desde os primeiros anos de vida e a primeira responsável pelos estímulos de prazer que são provocados na fase de lactância.

Logo o pai torna-se um rival que disputa o amor da mãe. Tem-se então o Complexo de Édipo, normalmente presente em meninos de três até seis anos de idade. Essa fase tenderá a passar para a maioria dos meninos, entretanto Juca manteve certa aversão à imagem do pai. Outra passagem, ainda nesse conto, também remete a essa idéia: “A papai então o passeio deixara bem menos pai, um

ótimo camarada com muita fome e condescendência" (p. 104).

Outro aspecto interessante nesse conto está relacionado à imagem de Nossa Senhora do Carmo. A santa possui uma imagem punitiva. É sempre usada pela mãe para ameaçar o filho sobre alguns 'maus hábitos'. Essa passagem remete a outro trabalho de Freud discutido em *Totem* e *Tabu e outros trabalhos* (1913-1914), que fala sobre a história e o conceito de totem e tabu nas sociedades primitivas e a evolução desses elementos nas sociedades modernas.

Com base nos estudos freudianos e de outros pesquisadores citados por ele, pode-se dizer que o t*otemismo* foi uma prática primitiva que visava o respeito a crenças e costumes de um determinado grupo de indivíduos. Havia muitos desses costumes e crenças que jamais deveriam ser questionados e, de fato, não o eram. Estas 'verdades absolutas' são os *tabus*. Freud acredita que essas práticas totêmicas deram origem as religiões.

Uma das razões que faziam o totemismo ser praticado por esses povos primitivos era a punição que receberiam se as 'regras' do grupo não fossem seguidas. Essa medida evitava que uma série de hábitos inadmissíveis as civilizações modernas, como o incesto, viessem a ocorrer.

Numa analogia entre o totemismo e a maneira como a mãe de Juca se utiliza do quadro da Nossa Senhora do Carmo, pode-se dizer que ainda hoje existem as práticas totêmicas. O totem, ou a imagem, serve para impor opressão ao filho que costuma realizar certos comportamentos inapropriados ao julgamento da sociedade.

O quadro de nossa Senhora é mencionado na pesquisa devido à importância que ele tem em uma das cenas deste conto. Antes de descrevê-la é preciso mencionar que Juca possui quatro anos, idade que marca uma breve florescência da atividade sexual e onde a criança começa a notar a presença de seus órgãos genitais por meio da micção (FREUD, 1905).

Um dos costumes de Juca, tão condenados por sua mãe, diz respeito ao hábito de levantar a roupa para sentir o vento passar pelas suas "partes". Juca utilizava uma camisolinha, que ele odiava, e essa peça de roupa, comum entre as crianças pequenas da década de 20 e 30, possibilitava tais movimentos.

Certo dia, Juca, querendo vingar-se da imagem que sua mãe usava para reprimi-lo, num momento de solidão, decide suspender sua camisolinha e mostrar seu pênis a sua madrinha, a santa (p.105):

> Então podia! Entrei na sala da frente, solene, com uma coragem desenvolta, heróica, de quem perde tudo mas se quer liberto. Olhei francamente, com ódio, a minha madrinha santa, eu bem sabia era santa, com os doces olhos se rindo para mim. Levantei quanto pude a camisola e empinando a barriguinha, mostrei tudo pra ela.
> "Tó! que eu dizia, olhe! olhe bem! tó! olhe bastante mesmo!" E empinava a barriguinha de quase me quebrar para trás.

Nesse dia sentiu-se tão orgulhoso e corajoso que decidiu passear até a esquina de sua rua, de onde via a praia e havia um grupo de homens trabalhando. Lá aconteceu algo maravilhoso que logo se tornaria trágico.

A felicidade poderia ser plena daquele momento em diante, pois recebeu de um operário três estrelas-do-mar que, segundo o homem, lhe dariam sorte. Há então um momento de *conjunção* com a sorte. Entretanto, a insatisfação alheia lhe cobrou uma atitude colossal: um outro operário, portuga, triste, que trabalhava ali perto, estava sem sorte e a única coisa que o salvaria eram as estrelas-do-mar, pensou o pequeno.

As estrelas, seus troféus, já haviam sido levadas para casa e estavam secando ao sol. Então, após a breve conversa com aquele homem infeliz, Juca retorna para buscá-las e entregá-las ao português "Fui correndo, fui morrendo, fui chorando, carregando com fúria e carícia a minha maiorzona estrelinha-do-mar" (p. 108).

Nessa fase da vida outro grande fator será definido: se a criança será altruísta ou egoísta. Juca mostrou que o altruísmo seria parte de sua personalidade ao tomar esta grande decisão. Assim descobre-se através desse recorte de parte da infância de Juca o que foi responsável pelo seu desenvolvimento psicológico e como a psicanálise explica as questões ligadas à formação do indivíduo.

2º conto: Frederico Paciência

Os anos passaram e no próximo conto Juca está com 14 anos. Nesse conto vivencia-se as experiências de Juca junto ao seu grande e único amigo da época, Frederico Paciência.

Juca, com seus 14 anos, chega enfim a puberdade, período caracterizado pela maturação dos órgãos sexuais e pela busca de um *objeto sexual externo*. Denomina-se *objeto sexual* qualquer coisa ou pessoa de quem provém a atração sexual. Chamamos de *externo* quando se refere a um objeto que não pertence ao

organismo da pessoa. Por exemplo, as crianças lactantes também possuem um objeto sexual, algo que lhes proporciona prazer e este é o seio materno. Ele é o responsável pela estimulação da primeira zona erógena da criança, a zona labial. Pode-se afirmar que o seio materno é um objeto sexual externo porque não pertence ao organismo do bebê, mas ao da mãe. Entretanto, o seio materno não estará disponível por muito tempo e a criança adquire a necessidade de *chuchar* (sugar com deleite) outra 'coisa'. Geralmente escolhe alguma parte do corpo, por ser mais acessível. Logo o dedo do pé ou da mão poderá vir a ser o novo objeto sexual. Este pertence ao seu organismo, portanto a psicanálise denomina *objeto sexual interno* (FREUD, 1905).

Agora, na puberdade, o objeto sexual, isto é, o que lhe provoca a atração, são outras pessoas e a fase auto-erótica (quando a fonte de satisfação encontra-se no próprio corpo) é superada.

Na puberdade ocorre mais nitidamente a separação dos caracteres femininos e masculinos. E existe uma fase onde a busca de um objeto sexual pode ser extraviada. Isso é normal por um período e explica a razão pela qual os meninos buscam amizades masculinas e as meninas buscam amizades femininas (DESSOIR, 1894, *opus* FREUD, 1905). Logo a atração pelo sexo oposto se tornará mais forte. Mas, alguns casos podem perdurar além do esperado.

Juca apresenta nesse conto esta fase da atração pelo gênero masculino. No início, apenas deseja imitar quem acredita ser um modelo a ser seguido, seu amigo Frederico, mas logo esse sentimento transforma-se em desejo.

As passagens a seguir refletem bem essa fase:

> Admirava lealmente a perfeição moral e física de Frederico Paciência e com muita sinceridade o invejei. […] Tive ânsias de imitar Frederico Paciência. Quis ser ele, ser dele, me confundir naquele esplendor, e ficamos amigos. (pág. 76)
> Frederico Paciência estava maravilhoso, sujo de futebol, suado, corado, derramando vida. (pág. 77)
> Agora falávamos insistentemente de nossa “amizade eterna”, projetos de nos vermos diariamente a vida inteira, juramentos de um fechar os olhos do que morresse primeiro. (pág. 82)

O que ocorre na mente de uma pessoa que se sente atraída por outra do mesmo sexo a psicanálise denomina *inversão*. Segundo Freud, todos os seres humanos possuem certo grau de bissexualidade, que tende a se desenvolver mais para a atração por homens, por mulheres, ou até mesmo por ambos os sexos. Para

ele, famílias instáveis, caracterizadas pela ausência do pai ou da mãe por razão de separação, divórcio ou morte, ou famílias onde os meninos são criados exclusivamente por homens podem desenvolver tendências ao homossexualismo.

Com o passar do tempo o destino consegue afastar Paciência de Juca. Os pais do primeiro falecem e seu desejo de tornar-se médico e se formar no Rio de Janeiro colaboram para esse distanciamento. Juca não tinha interesse pelos estudos e, em alguns momentos, percebíamos que eram cautelosos em seus encontros (p. 83):

> Estávamos nos amando de amigo outra vez; estávamos nos desejando, exaltantes no ardor, mas decididos fortíssimos, sadios.
> – Precisamos tomar mais cuidado.
> Quem falou isso? Não sei se fui eu se foi ele, escuto a frase que jorrou de nós. Jamais fui tão grande na vida.

Com o passar do tempo, ao final do conto, Juca chegou aos 16 anos de idade, narra que passou a freqüentar muitos bailes e num deles conheceu Rose. Nessa época encerrou-se a fase da valorização da amizade de Frederico Paciência (p. 84):

> Se pouco menos de ano antes, conhecêramos juntos para que nos servia a mulher, só agora nos dezesseis anos, é que a vida sexual se impusera entre os meus hábitos.

Desta maneira percebe-se como Juca viveu e com quem compartilhou o início de sua puberdade, marcada por sentimentos conflitantes com relação ao que a sociedade espera. Ao observar a realidade de fora, sem ter acesso aos pensamentos dos jovens torna-se difícil deduzir que todo esse processo é responsável pelas suas escolhas e amadurecimento delas.

3º conto: O peru de Natal

Juca possui agora 19 anos. Neste conto ele é responsável pela idéia de junto a sua mãe, sua Tia Velha, e seus irmãos, desfrutarem de um peru de Natal. Entretanto, além da do peru, havia a imagem de outra morte na residência, era a de seu pai, morto há menos de um ano. Este é o momento em que o protagonista reflete sobre quem foi seu pai, o que ele representou para a família e como seria a vida daquele momento em diante.

Como já foi mencionado, Juca nunca foi muito próximo de seu pai. O que

sentia por ele quando criança, de certo modo, nunca se modificou com o tempo. Para ele, o pai era “desprovido de qualquer lirismo, duma exemplaridade incapaz, acolchoado no medíocre” (p. 71).

Seria possível interpretar toda esta situação da seguinte forma: teria Juca vencido a 'batalha' travada entre ele e seu pai na busca pela conquista exclusiva do amor materno? Teria o complexo de Édipo permanecido até sua maturidade? Não se pode afirmar com certeza se o complexo de Édipo se prolongaria; Freud afirma que esse complexo é comum apenas durante a infância, mas o fato é que as indagações são possíveis.

Nesse conto nota-se também vestígios dos elementos trabalhados em *Totem e Tabu*. Aqui a imagem do pai tornou-se um *tabu*, um assunto que não deve ser discutido. Durante o jantar, a mãe relembra a imagem do pai, que fica responsável por destruir a sensação de bem estar que todos sentiam naquele momento de descontração e satisfação por consumirem algo que, geralmente, não tinham acesso durante os encontros familiares realizados pelo pai.

Juca, numa tentativa de evitar que a felicidade de todos se esvaísse, começou a mencionar a importância do pai e o quanto ele estaria feliz ao ver que sua família estava reunida. Juca foi responsável por tornar seu pai um *totem*. O totem, para as civilizações primitivas, era um animal, ou vegetal, ou fenômenos naturais, como a chuva, que mantinha uma relação peculiar com todo o clã (FREUD, 1914). Neste caso, o pai de Juca passou a ser reverenciado e tornou-se um símbolo digno de admiração, que culminou na conclusão da ceia. Ao final, a imagem do peru se tornou mais forte e seu pai, como bem disse, tornou-se santo, uma “inexorável estrelinha do céu” (p. 75).

4º conto: Vestida de preto

O conto é o relato dos principais momentos de encanto e prazer que sentiu no decorrer de sua infância e juventude. Sobre seus grandes amores, Juca afirma que aos cinco anos ele mesmo foi seu grande amor e não ter sofrido do complexo de Édipo (p. 19). Aos nove, dez anos vivenciou seu primeiro beijo, não um beijo de boca, mas um beijo de amor puro que se dá em uma menina sem mais intenções. Este episódio se passa na casa da Tia Velha quando, junto de seus primos, decidem brincar de 'família'. As crianças formam os casais e cada um se isola em um dos

muitos quartos do casarão. Juca fica com sua prima Maria e decidem se esconder em um quarto que foi transformado em dispensa.

Os dois, sós nesse cômodo, decidem deitar-se sobre uma toalha no chão, pois julgaram que era hora do 'casal' dormir. Maria divide seu travesseiro com Juca que, mergulhado nos cabelos da prima, decide dar-lhe um beijo na nuca. De repente chega a Tia Velha, que abre a porta com espantoso barulho. Ela é a figura castradora, responsável por destruir aquele ambiente de paz e sublimação. Juca não considera que sua ação seja tão terrível, não encontrando imediata razão que justifique o olhar condenável da Tia Velha. A tia é, então, a responsável por introduzir na mente do garoto a primeira noção do que é certo e do que a sociedade condena.

Desta forma Juca considera Maria o seu primeiro grande amor, mas, pouco depois dos 15 anos, já na puberdade, ele se envolve com outras garotas e elimina de sua mente, ainda que temporariamente, todos os pensamentos que se relacionam às suas grandes experiências amorosas anteriores aos seus 15 anos. Depois de certo tempo passou a gostar de estudar (talvez fruto da vivência que teve com o 'amigo' Frederico Paciência) e arranjou duas namoradas, Violeta, a namorada oficial, e Rose, que era 'pra de noite'. Já Maria com o tempo foi mudando sua imagem, parecendo tomar a direção inversa da de Juca, que era tido como louco, mas passou a valorizar os estudos e aos poucos mais centrado. Uma transposição de destinos ocorreu, então, pois ela passou a viver extravagâncias e aventuras, teve alguns relacionamentos com homens muito ricos, ao nível de sua família e foi morar no exterior. Maria tornou-se um objeto sexual nunca superado para Juca, até onde se pôde acompanhá-lo.

O conto se encerra com o retorno de Maria ao Brasil. Juca descobre isso, termina com Violeta e decide visitar seu grande amor durante um jantar que a família dela realizaria para alguém que não é informado ao leitor; sua intenção era só deixar um cartão, mas chega muito cedo e ao ser conduzido por uma empregada até uma saleta, depara-se com Maria.

Lá todos seus desejos são reavivados e Maria, num vestido preto imortaliza sua imagem na alma de Juca. Infelizmente seu objeto sexual nunca pôde ser alcançado e aquele vestido apenas refletiu o estado de mulher amadurecida tornando-se um fetiche que jamais seria esquecido pelo pobre Juca.

Considerações finais

A análise dos contos de gênero autobiográfico auxilia na compreensão da grandeza constituinte do homem. Este trabalho é ainda mais potencializado quando uma obra ao nível de *Contos novos*, fruto do trabalho de um dos maiores escritores brasileiros, estudioso da psicanálise, se configura como referência para a observação e constatação de como os estudos freudianos são tão importantes e eficientes no campo dos estudos literários.

Esta breve pesquisa não permite, considerando a primeira grandeza dos elementos propostos para estudo, evidenciar todos os aspectos psicanalíticos da obra em questão, entretanto, não era o intuito esgotar todas as possibilidades de análise.

Contudo, espera-se que este trabalho tenha conseguido nortear o caminho que deve ser traçado pela relação entre a psicanálise e os estudos literários. Verifica-se, assim, que o pensamento de Freud e a inteligência de Mário de Andrade ainda estão muito presentes na sociedade contemporânea.

Na próxima parte da pesquisa será feito o cotejamento dos contos selecionados da obra *Contos novos* com os textos de Dante Moreira Leite e Bakhtin, já mencionados, visando uma discussão mais teórica sobre o encontro de literatura e psicanálise e o valor estético conferido aos textos em primeira pessoa.

Referências

ANDRADE, Mário de. *Contos Novos*. 17 ed. Belo Horizonte: Itatiaia, 1999.

CARVALHO, Alfredo Leme Coelho de. *Foco Narrativo e Fluxo de Consciência:* questões de teoria literária. São Paulo: Pioneira, 1981.

FIORIN, José Luiz. *Elementos de análise do discurso.* 14ed. São Paulo: Contexto, 2008.

FREUD, Sigmund. *Três ensaios sobre a Teoria da sexualidade.* Tradução de Paulo Dias Corrêa. Rio de Janeiro: Imago, 1997.

FREUD, Sigmund. *Totem e tabu e outros trabalhos.* Volume XIII. 1913-1914. CD-ROM.

RABELLO, Ivone Daré. *A caminho do encontro:* uma leitura de Contos Novos. São Paulo: Ateliê Editorial, 1999.

Estudo da atividade antiproliferativa de derivados de iridóides isolados da família Rubiacea do Cerrado e da Mata Atlântica

Paula Roberta Nunes[a] e Lídia Andreu Guillo[a]
[a] Universidade Federal de Goiás – UFG – Goiânia/Go

email: paularoberta_bio@yahoo.com.br

Palavras chaves: iridóides, melanoma, β-glicosidase.

INTRODUÇÃO

A família Rubiaceae pertence às angiospermas e possui distribuição cosmopolita. No Brasil ocorrem cerca de 130 gêneros e 1500 espécies, correspondendo a segunda maior família em espécies do país (SOUZA, 2005). Os estudos com Rubiaceae têm demonstrado que essa família é rica em iridóides além de inúmeros outros compostos. Vários iridóides têm sido isolados de espécies dos diferentes gêneros investigados tais como *Galianthe, Molopanthera* e *Psychotria.* Particularmente, o extrato bruto e as frações da espécie *Galianthe brasiliensis* os quais foram submetidos à avaliação da atividade antiproliferativa frente a culturas de células tumorais humanas de melanoma (UACC62), mama (MCF7), pulmão (NCI460), leucemia (K562), ovário (OVCAR), próstata (PCO3), cólon (HT29), rim (786-0) e mama resistente (NCIADR), apresentaram efeito citostático (inibição de crescimento) e efeito citotóxico (morte celular) com boa seletividade para algumas das linhagens estudadas. O fracionamento cromatográfico das frações ativas levou ao isolamento de iridóides entre outras substâncias (MOURA *et al,* 2006).

Iridóides glicosilados são produtos do metabolismo secundário apresentando como característica o anel ciclopentapirano (Figura 1) (COSSY, 1989; HARBORNE, 1998). O esqueleto molecular dos iridóides começou a ser compreendido somente a partir de 1958 nos trabalhos de O. Halpem e H. Schmid (EL-NAGGAR, 1980). O número e a natureza dos iridóides encontrados no Reino Vegetal são indicativos da complexidade das vias envolvidas na sua biossíntese. Em quimiossistemática, os iridóides representam um marcador importante em classificação vegetal, filogenia e evolução (DINDA *et al,* 2007).

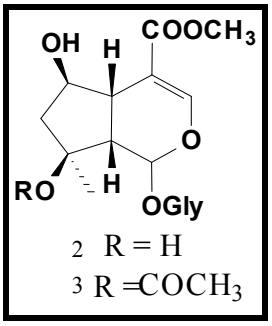


Figura 1 – Esqueleto iridano. A forma deglicosilada (aglicona) não apresenta glicose (Gly).

Os iridóides desempenham no vegetal, um papel importante de proteção contra predadores, principalmente os herbívoros, isso devido ao fato de serem amargos ou venenosos (HEGNAUER, KOOIMAM, 1978).

Vários autores demonstraram que os iridóides apresentam propriedades biológicas, tais como antiviral, antimicrobiana, antitumoral, hemodinâmica, colerética (age na vesícula biliar), vasoconstritora, hepatoprotetora e antiinflamatória (TAKEDA *et al*., 1980; ISHIGURO *et al*., 1988; HOUGHTON *et al*., 1989; BRESCHI *et al*., 1992; RECIO *et al*., 1994; KAPADIA *et al*., 1996; BERMEJO *et al*., 2002).

Segundo a literatura, as agliconas dos iridóides também desempenham diversas atividades biológicas como antialérgica, anti-artrite, antibactericida, anticancerígena, anticoagulante, antifúngica, antiinflamatória, antioxidante, antiprotozoária, antiviral e neuroprotora (DINDA *et al*., 2007). Ling *et al*. (2003) observaram que a reação *in vitro* entre os iridóides e a enzima β-glicosidase provoca uma mudança na coloração da solução, o que facilita o monitoramento da formação da forma aglicona desses compostos. Além disso, observaram que as formas deglicosiladas obtidas pela ação hidrolítica da β-glicosidase, apresentaram ação anti-inflamatória, inibindo especificamente enzimas importantes relacionadas ao processo inflamatório.

Fukuyama *et al*., 2004 observaram que alguns derivados de iridóides glicosilados e deglicosilados isolados, apresentaram atividade citotóxica moderada contra células HeLa, embora essa atividade não tenha sido observada em todos os derivados glicosilados isolados pelo autor. Nesses casos, o tratamento das células com concentrações da ordem de 100 μM não foi suficiente para induzir a citotoxicidade.

Outra atividade interessante dos iridóides é a sua ação antioxidante. Garcez *et al*., (2007), através de um ensaio *in vitro* de inibição da oxidação de β–caroteno, puderam constatar a atividade antioxidante de alguns iridóides glicosilados. Neste ensaio, a oxidação do β-caroteno foi observada pela descoloração da placa cromatográfica submetida à exposição de luz natural. Assim, os derivados de iridóides testados inibiram a oxidação do β-caroteno, caracterizando a sua ação antioxidante.

OBJETIVOS

Com base no vasto potencial biológico dos iridóides, este trabalho teve como objetivo analisar a atividade citotóxica de dez iridóides isolados e purificados por pesquisadores do Instituto de Química/UFG, de plantas da família Rubiacea. Cinco são compostos glicosilados e os restantes foram enzimaticamente deglicosilados pela ação hidrolítica da enzima β-glicosidase.

METODOLOGIA

Cultura e manutenção da linhagem celular

As células de melanoma humano da linhagem SK-MEL 37 utilizadas no experimento foram obtidas através da doação do Instituto de Câncer Memorial Sloan-Kettering, New York, USA. Essas células eram estocadas em nitrogênio líquido, depois formam descongeladas em frascos de cultura de 25 cm^2 contendo meio de cultura MEM completo (10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina-estreptomicina e 0,25 µg/mL de Fungizona) e incubadas a 5% de CO_2 e 37°C

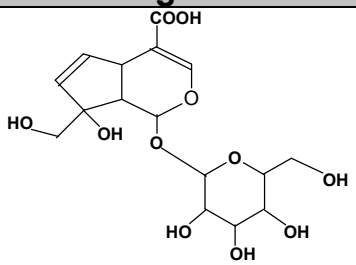
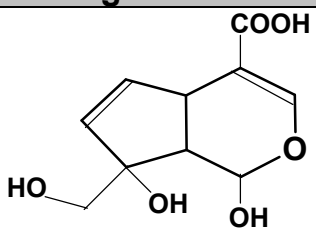
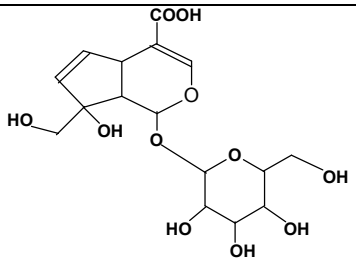
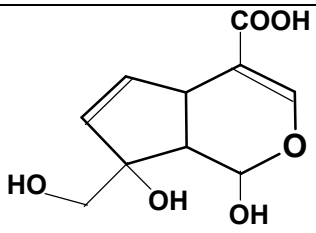
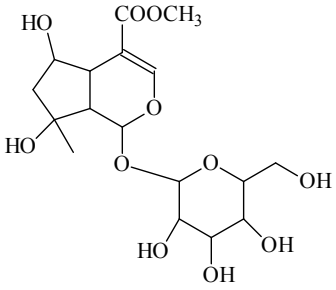
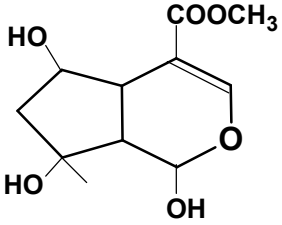
As células eram repicadas quando atingiam a confluência, com base no cálculo do tempo de duplicação, que já foi previamente calculado (30 horas). Desse modo, a taxa de crescimento está relacionada com o número de gerações que ocorrem por unidade de tempo em uma cultura em crescimento exponencial.

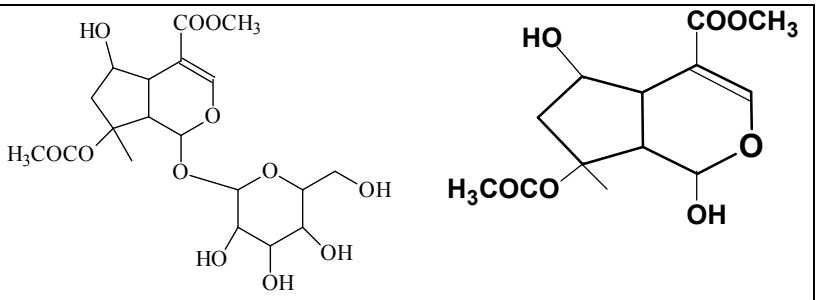
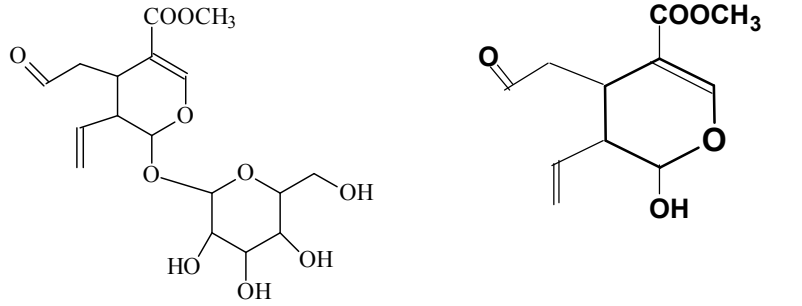
Isolamento dos iridóides

O isolamento dos iridóides utilizados neste estudo foi realizado no laboratório de Produtos Naturais do IQ/UFG, juntamente com Departamento de Química/UEM (Universidade Estadual de Maringá).

Os iridóides (3 mg) foram solubilizados com 20 µL de DMSO, seguindo-se da adição de 480 µL de etanol absoluto para obtenção da solução-estoque. A estrutura química, o peso molecular e a concentração estoque dos iridóides estão representados na Tabela 1. A estrutura dos componentes deglicosilados também pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 – Peso molecular, fórmula química e estrutural e concentração final dos iridóide

Características	Iridóides glicosilados	Agliconas
Nome: Monotropeína **Fórmula Molecular:** $C_{16}H_{22}O_{11}$ **Massa Molecular:** 390,34 **Concentração Estoque** 15 mM		
Nome: Sal de Monotropeína **Fórmula Molecular:** $C_{16}H_{22}O_{11}$ • HCl **Massa Molecular:** 426,84 **Concentração Estoque** 9,4 mM		
Nome: MPM1 **Fórmula Molecular:** $C_{17}H_{26}O_{11}$ **Massa Molecular:** 406,38 **Concentração Estoque** 9,8 mM		

Nome: MP5 **Fórmula Molecular:** $C_{19}H_{28}O_{12}$ **Massa Molecular:** 448,42 **Concentração Estoque** 13 mM	
Nome: Secologanina **Fórmula Molecular:** $C_{17}H_{24}O_{10}$ **Massa Molecular:** 388,37 **Concentração Estoque** 16 mM	

Avaliação do potencial citotóxico dos iridóides

Previamente aos ensaios de viabilidade celular, realizamos uma triagem com o objetivo de selecionarmos os iridóides que apresentaram atividade antiproliferativa significativa Para esse procedimento as células foram semeadas em placas de 9,6 cm^2 e tratadas com uma única concentração de 44 µM. Dessa forma a concentração de etanol se manteve a 0,5%. A seguir, as células foram incubadas a 37ºC e 5% de CO_2, sendo observadas e fotografadas ao final de 24, 48 e 72 horas de incubação.

Avaliação de viabilidade celular (Ensaio de MTT)

O método de MTT consiste na medida da atividade da desidrogenase mitocondrial, a qual é capaz de metabolizar o reagente 3-(4,5-dimetiltiazol) 2,5 difenil tetrazólico (MTT) em um composto insolúvel e colorido denominado formazan. A concentração desse produto é proporcional ao número de células existentes. A metodologia já foi otimizada em nosso laboratório através da parceria entre os laboratórios do ICB e do IQ/UFG (LEITE et al., 2004; VIEIRA et al., 2008).

As células da linhagem SK-MEL37 foram semeadas em placas de 24 poços. No dia seguinte, concentrações crescentes de drogas foram

adicionadas, incubando-se a seguir por 96 horas em incubadora de CO_2. Ao final do período adiciona-se a solução de MTT, deixando-se em incubação por 3 horas, para metabolização do reagente. A solubilização do reagente formazan foi feita com metanol puro, transferindo-se a seguir uma alíquota (100 µL) para uma placa de 96 poços para determinação da absorbância da solução em leitor de microplacas. Os valores obtidos são proporcionais ao número de células, sendo então possível a determinação do valor de IC_{50} (concentração necessária para a morte de 50% das células), através do programa GraphPad Prism, version 4.00 for Windows, San Diego, CA, www.graphPad.com. Esse valor permitirá avaliar o potencial terapêutico dos compostos (ULUKAYA, 2008).

Avaliação da atividade antioxidante dos iridóides

As células foram tratadas segundo o protocolo a seguir. Cinco placas de 9,6 cm^2 foram tratadas com iridóides com uma concentração única de 44 µM. Como controle positivo empregamos uma solução comercial de H_2O_2, a qual foi diluída dez vezes com água. Outras cinco placas foram tratadas com iridóides na concentração de 44 µM na presença de peróxido de hidrogênio. Após tratamento, as placas foram incubadas e observadas ao microscópio óptico após 24, 48 e 72 horas.

Tratamento dos iridóides com β-Glicosidase

A principal reação catalisada por β-glicosidases é a hidrólise de ligações β-glicosídicas em glicosídeos de baixa massa molecular. Desta forma, as β-glicosidases são enzimas capazes de hidrolisar dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos conjugados (COULON *et al*., 1998; BHATIA *et al*., 2002).

A solução estoque da enzima (Sigma Chemical Co. 100U) foi preparada por dissolução de 2 mg de sólido em 250 µL de água Milli-Q gelada e esterilizada, segundo especificações do fabricante. As soluções dos iridóides foram preparadas dissolvendo-se 20 µL da solução-estoque em 80 µL de água. A seguir retirou-se uma alíquota de 50 µL à qual foi adicionado 50 µL da solução-estoque da enzima. Assim, as concentrações finais no ensaio podem ser observadas na Tabela 2. A razão [iridóide] / [enzima] pode também ser

observada na Tabela 2. As amostras forma incubadas a 37º C em banho-maria por 48 horas.

A ação hidrólitica da β-glicosidase sobre os iridóides com a conseqüente formação das formas aglicona, foi notada através da mudança gradual da cor da solução original dos compostos, conforme descrito por Ling *et al*.,(2003).

Tabela 2 – Concentrações iniciais e finais dos iridóides no ensaio enzimático da β-glicosidase

Iridóides	Estoque (Concentação)	β-glicosidase (Concentração)	Final (Concentração)	Razão [Irid]/[Enz]
Monotropeína	15 mM	0,2 mM	100 µM	1 : 0,13
Sal de Monotropeína	9,4 mM	0,2 mM	62 µM	1 : 0,21
MPM1	9,8 mM	0,2 mM	65 µM	1 : 0,20
MP5	13 mM	0,2 mM	86 µM	1 : 0,15
Secologanina	16 mM	0,2 mM	107 µM	1 : 0,12

Ao final da incubação, as amostras foram centrifugadas e: 1) o sobrenadante foi retirado e adicionado diretamente às células, previamente semeadas (semi-confluentes); 2) o precipitado foi dissolvido em 2 µL de DMSO, adicionando-se 100 µL de meio completo. A seguir a solução foi adicionada diretamente às células; 3) o precipitado e o sobrenadante foram solubilizados em 100 µL de meio completo e toda a solução foi adicionada diretamente ás células.

Resultados

Estudos de viabilidade celular

A triagem prévia na presença de iridóides glicosilados na concentração de 44

µM demonstrou que os cinco compostos testados não apresentaram atividade antiproliferativa, conforme demonstrado na figura 2 a seguir

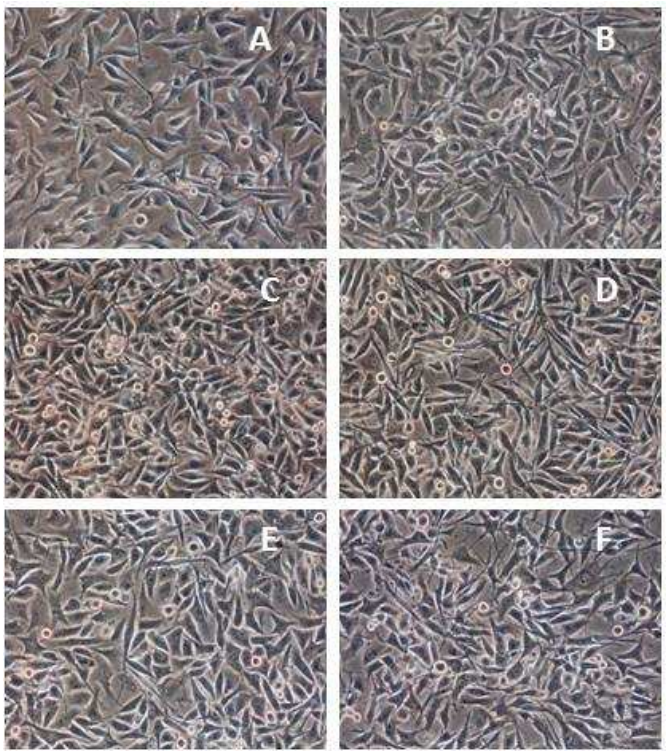


Figura 2 – Triagem dos iridóides glicosilados na concentração única de 44 µM. As células foram tratadas e estas observadas durante 72 horas de incubação. (A) Controle; (B) Monotropeína; (C) MP5; (D) Sal de monotropeína; (E) Secologanina; (F) MPM1. Ampliação 200X.

Tratamento com peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um metabólito extremamente deletério, porque ao ser metabolizado é convertido em radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). O H_2O_2 tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{++}. Assim, é altamente tóxico para as células e a sua toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro (PIGNATELLO, 2006), como ocorre, por exemplo, na hemocromatose transfusional (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Para comprovarmos se os iridóides testados apresentavam atividade antioxidante, os compostos foram adicionados às células no momento do tratamento com H_2O_2. Os resultados podem ser observados na figura 3 abaixo.

Como observado, a presença de iridóides intensificou a morte celular (comparar Figura 3 D com B, por exemplo). Tal resultado, que foi

completamente inesperado uma vez que é bem conhecida a ação antioxidante dessa classe de compostos, merece ser mais detalhadamente estudado.

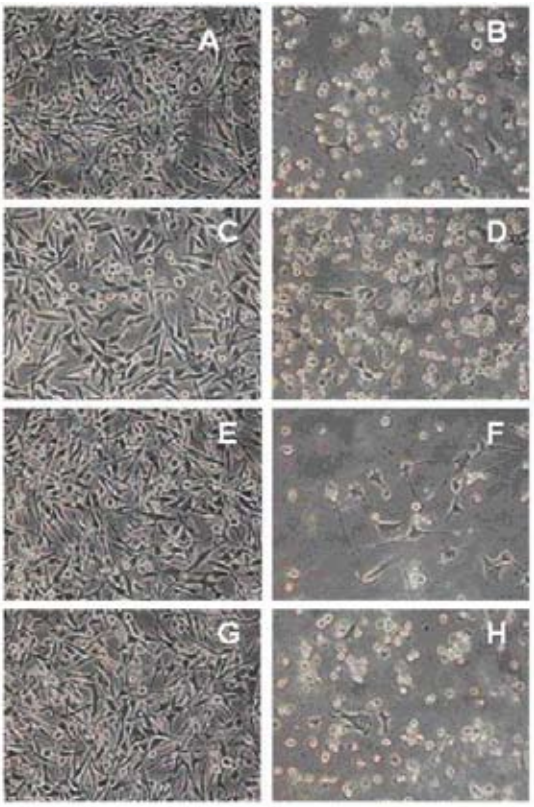


Figura 3 – Ação sinergística de iridóides na presença H_2O_2. (A) Controle; (B) Controle de peróxido de hidrogênio; (C) Secologanina; (D) Secologanina com H_2O_2; (E) Sal de monotropeína; (F) Sal de monotropeína com H_2O_2; (G) MP5; (H) MP5 com H_2O_2.

Tratamento de iridóides com β-glicosidase

O tratamento enzimático dos compostos foi monitorado por cromatografia TCL, confirmando a presença de forma aglicona dos cinco iridóides. Esse trabalho foi realizado no IQ pela Profa. Lucilia Kato e Cecília Maria Alves de Oliveira.

A ação da enzima também pôde ser monitorada através da formação de derivados coloridos (LING *et al*., 2003) como observado na figura 4.

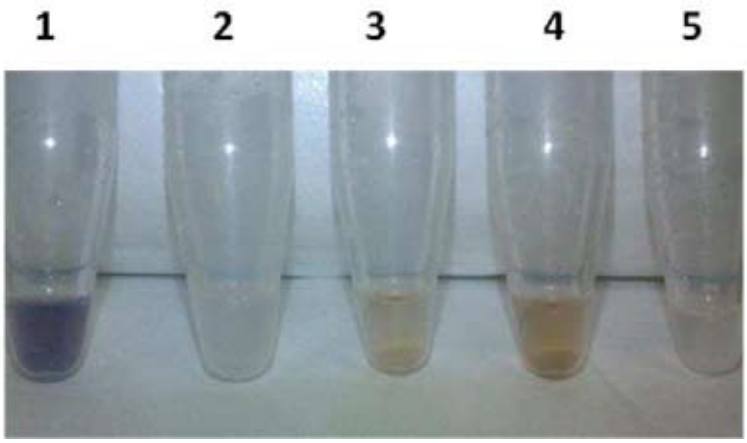


Figura 4 – Ação da β-glicosidase sobre iridóides. (1) Monotropeína, (2) Sal de monotropeína, (3) MP5, (4) MPM1 e (5) Secologanina.

A incubação das células com o sobrenadante obtido após a reação dos iridóides com a β-glicosidase, não apresentou uma atividade antiproliferativa significativa. Por outro lado, os precipitados solubilizados (ver Matériais e Métodos, item tratamento dos iridóides com β-glicosidase, ensaio 2) de monotropeína e MPM1 apresentaram atividade antiproliferativa, (Figura 5 B e D, respectivamente). Também observou-se uma dependência em relação ao tempo de incubação (Gráfico 1).

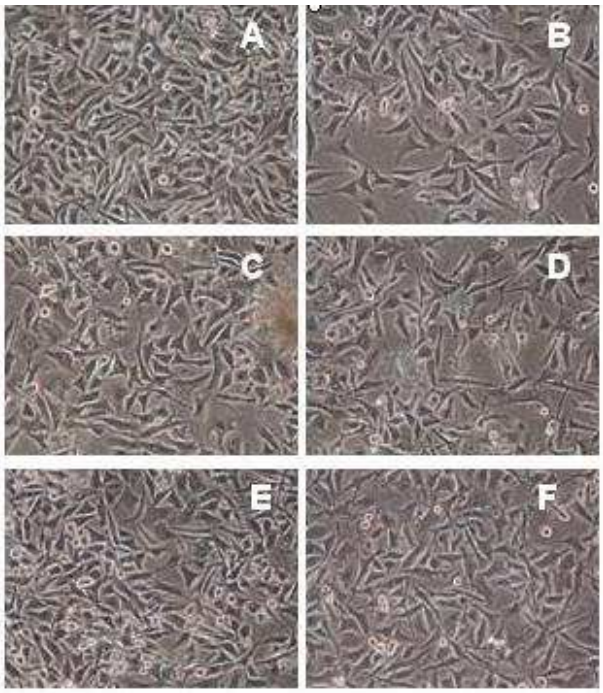
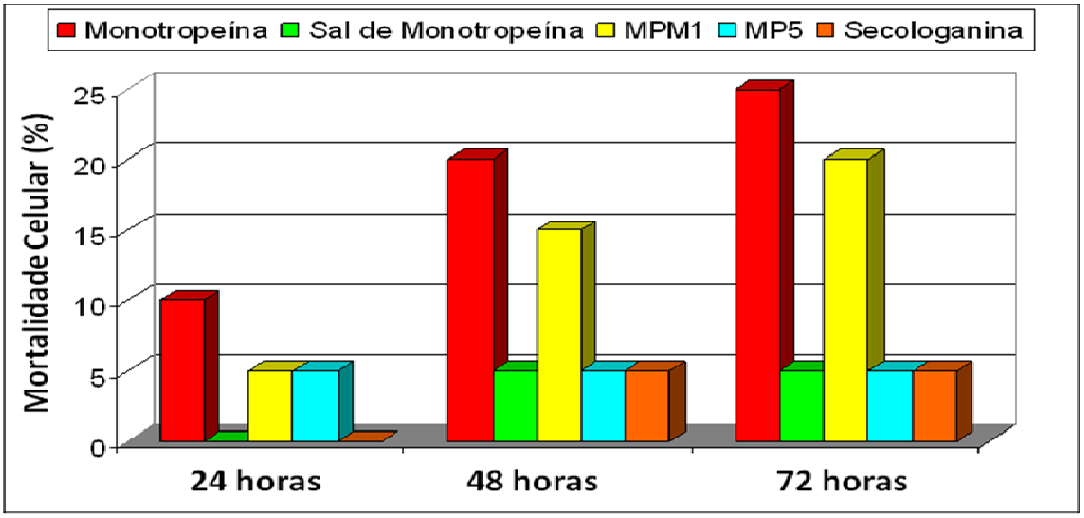


Figura 5 – Ação dos iridóides deglicosilados em 72 horas de incubação. (A) Controle; (B) Monotropeína; (C) MP5; (D) MPM1; (E) Secologanina; (F) Sal de monotropeína. Aumento de 200X.

Idêntico resultado foi observado ao tratarmos as células com o precipitado e o sobrenadante resultantes da ação hidrolítica da β-glicosidase (ensaio 3). Os demais iridóides apresentaram pequena porcentagem de mortalidade (como pôde ser observado no Gráfico 1 abaixo).

Gráfico 1 – Porcentagem da mortalidade celular em 24, 48 e 72 horas de tratamento com iridóides deglicosilados.



CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que os cinco iridóides glicosilados isolados, não apresentaram atividade antiproliferativa sobre células de melanoma humano.

A ação antioxidante dessa classe de compostos não foi confirmada em nossos experimentos. Ao contrário, foi observado uma intensificação do processo oxidativo provocado H_2O_2, fato inusitado e que merece melhor estudo.

Uma vez que o sobrenadante resultante da ação hidrolítica de β-glicosidase não apresentou ação antiproliferativa, constatamos que a atividade biológica estava presente no precipitado obtido dos iridóides monotropeína e MPM1. Além disso, a atividade antiproliferativa era tempo-dependente.

Com esta abordagem, foi possível verificarmos a importância das formas deglicosiladas dessa classe de compostos. Uma vez que os iridóides deglicosilados também ocorrem *in vivo*, é possível que sejam também responsáveis pela ação biológica que se atribui à Família Rubiácea. Ainda, o fato de que apenas dois dos cinco compostos isolados apresentaram atividade, indicam uma seletividade das células de melanoma humano sobre compostos que apresentam grupos hidroxila no anel ciclopentano. Esses resultados são importantes para os estudos de estrutura-atividade dessa classe de compostos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BERMEJO, P.; ABAD, M. J.; DÍAZ, A. M.; FERNANDEZ, L.; DE SANTOS, J.; SANCHEZ, S.; VILLAESCUSA, L.; CARRASCO, L.; IRURZUN, A. Antiviral Activity of Seven Iridoids, Three Saikosaponins and One Phenylpropanoid Glycoiside Extracted from *Bupleurum rigidum* and *Scrophularia scorodonia*. **Planta Medica**, Struttgart, v. 68, p. 106-110, 2002.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β-glucosidases: Cloning, Properties and Application. **Critical Reviews Biotechnology,** Philadelphia, v. 22, p. 375-407, 2002.

BRESCHI, M. C. *et al.* Vasoconstrictor Activity of 8-0-Acetylhapagide from *Ajuga reptan*. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 55, n. 8, p. 1145-1148, 1992)

COSSY, J. A. Short Acess to Iridoid Precursors, **Tetrahedron Letters**, Amsterdam, v. 30, n. 37, p. 4113-4116, 1989.

COULON, S. *et al*. Purification and Characterization of na Intracellular β-glucosidase from *Lactobacillus casei* ATCC 393. **Applied. Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 74, p. 105-114, 1998.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally Occurring Secoiridoids and Bioactivity of Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids. A review, part 2. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 55, n. 5, p. 689-728, 2007.

EL-NAGGAR. L.; BEAL, J. L. Iridoids A Review. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 43, n. 6, p. 649-707, 1980.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: Conceitos, Doenças Relacionadas, Sistema de Defesa e Estresse Oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n. 1, p 61-68, 1997.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MAHMOUD, T. D.; FIGUEIREDO, P. O. Novos Constituintes Químicos das Cascas do Caule de *Tabebuia heptaphylla*. **Química Nova,** v. 30, n. 8, p. 1887-1891, 2007.

HARBONE, J. B. **Phytochemical Methods**, 3ª Ed. Chapman & Hall, London, 1998, p. 302.

HEGNAUER, R.; KOOIMAN, P. Die systematische Bedeutung Von iridoiden Inhaltsstoffen im Rahmen Von Wettstein's Tubiflorae. **Planta Medica** Stuttgart, v. 33, n. 1, p. 1-33, 1978

HOUGHTON, P.; HIKINO, H. Anti-Hepatotoxic Activity of Extracts and Constituents of Buddleja Species. **Planta Medica** Stuttgart, v. 55, p. 123-126, 1989.

ISHIGURO, K.; YAMAKI, M.; TAKAGI, S.; IKEDA, Y.; KAWAKAMI, K.; ITO, K.; NOSE, T. Studies on Iridoid-Related Compouds. V: Antitumor Activity of Iridoid Dervs, Periodate Oxidation Products. **Journal of Pharmacobiodyn**, v. 11, p. 131-136, 1988.

KAPADIA, G. J.; SHARMA, S. C.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; UEDA, S. Inhibitory Effect of Iridoids on Epstein-Barr vírus Activation by a Short Term

in vitro Assay for Antitumor Promoters. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 102, p. 223-226, 1996.

LEITE. V.C.; FERREIRA-SANTOS, R.; CHEN CHEN, L.; GUILLO, L.A. Psoralen Derivatives and Longwave Ultraviolet Irradiation are Active *In Vitro* Against Human Melanoma Cell Line. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 76, p. 49-53, 2004.

LING, S.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Effects of Iridoids on Lipoxygenase and Hyaluronidase Activities and Their Activation by β-Glucosidase in the Presence of Amino Acids. **Biol. Pharm. Bull**., v. 26, n. 3, p. 352-356, 2003.

MOURA, V. M.; SANTOS, D. P.; SANTIN, S. M. O. Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (RUBIACEAE). **Química. Nova**, May/June 2006, vol.29, no.3, p.452-455.

PIGNATELLO, J. J.; OLIVEROS, E.; MACKAY, A. Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 1, 2006.

RECIO, M. D. C.; GINER, R. M.; MÁNEZ, S.; RÍOS, J. L. Structural Considerations on the Iridoids as Anti-Inflammatory Agents. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 60, p. 232-234, 1994

SOUZA, V. C & LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**.** Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum**, 2005.

TAKEDA, S.; YUASA, K.; ENDO, T.; ABURADA, M. Pharmacological Studies on Iridoids Compounds II: Relationship Between Strutures and Choleretic Action of Iridoid Compounds. **Journal of Pharmacobiodyn**, v. 3, p. 485-492, 1980.

ULUKAYA, E., OZDIKICIOGLU, F., ORAL, A., Y., DEMIRCI, M. The MTT Assay Yields a Relatively Lower Result of Growth Inhibition than the ATP Assay Depending on the Chemotherapeutic Drugs Tested. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 232-239, 2008.

VIEIRA, C.R., MARQUES, M.F., SOARES, P.R., MATUDA, L., de OLIVEIRA, C.M., KATO, L. Da SILVA, C.C., GUILLO, L.A. Antiproliferative Activity of *Pterodon pubescens* Benth. Seed oil and its Active Principle in Human Melanoma Cells. **Phytomedicine**, v. 15, p. 45-50, 2008.

Estimativa da resposta à prova tuberculínica com o derivado protéico purificado (PPD) em pacientes com artrite reumatóide

Mayara Couto Sardinha
Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brasil
e-mail: mayarasardinha@yahoo.com.br

Palavras-chave: prova tuberculínica, artrite reumatóide

INTRODUÇÃO

Estima-se que 50 milhões de brasileiros são infectados pelo bacilo da tuberculose (TB). A taxa anual de incidência notificada no Brasil em 2002 foi de 44,5 por 100.000 habitantes, no Estado de Goiás 21,34 e em Goiânia 23,5 para o mesmo período (Ministério da Saúde, DATASUS 2005). Cerca de 5% de todos os indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis* vão desenvolver tuberculose ativa nos dois primeiros anos após a infecção. Os outros 95% dos indivíduos expostos vão conter a doença via uma resposta imune celular.

A efetividade desta resposta imune depende, em parte, da habilidade de produzir um perfil apropriado de citocinas, incluindo o Fator de Necrose Tumoral alpha (TNFα). Essa citocina pró-inflamatória apresenta um importante papel na patogênese da tuberculose, estando envolvida no aumento da capacidade dos macrófagos em fagocitar e destruir micobactérias e na formação dos granulomas que seqüestram as micobactérias e previnem sua disseminação.

No entanto, em várias doenças onde a resposta inflamatória encontra-se alterada, o aumento na produção e liberação do TNFα, entre outras citocinas inflamatórias, são a chave de sua fisiopatogenia, como acontece na Artrite reumatóide (AR). Nesses casos, drogas que inibem o TNFα vêm sendo desenvolvidas e utilizadas para neutralizar os efeitos deletérios desta citocina, com comprovada eficácia. Todavia, desde o início de seu uso, centenas de casos de tuberculose pulmonar e extra-pulmonar já foram notificados.

Várias diretrizes e sugestões vêm sendo publicados no intuito de padronizar o diagnóstico e o manejo da tuberculose infecção latente (TBIL) em pacientes que usarão agentes anti-TNFα em diversos países. A utilização da prova tuberculínica (PT) para identificação de TBIL em pacientes com AR tem sido bastante questionada, pois tais pacientes apresentam resposta imune celular deficiente, e

freqüentemente estão em uso de drogas imunossupressoras, podendo haver prejuízo na interpretação do exame.

Decorrente do aumento da incidência e da severidade de infecções tuberculosas após o início do uso dos anti-TNFs no tratamento da AR, a identificação de casos de ITBIL passou a ser obrigatória antes do início da terapêutica. Para se atingir este fim, é necessário realizar a história clínica completa (com tratamento ou quimioprofilaxia anteriores ou contato intradomiciliar ou institucional com TB), radiografia de tórax e a prova tuberculínica (PT) com o derivado protéico purificado (PPD).[1,2,3]

Utilizado desde 1930 para determinar o risco de infecção pelo *M. tuberculosis,* o PPD contém uma mistura de antígenos que induz a uma reação de hipersensibilidade tardia, dependente da migração de células T $CD4^+$ produtoras de INF-γ para o local da injeção do antígeno. Apesar de suas conhecidas limitações na sensibilidade e na especificidade, continua sendo utilizado como critério *standard* para o diagnóstico de tuberculose infecção latente (TBIL). [4]

Um grande complicador para o diagnóstico prévio de TBIL nos portadores de AR é a anormalidade da função celular imune observada nesses doentes. Existe uma diminuição da responsividade de células mononucleares periféricas, o que acarreta prejuízo para hipersensibilidade cutânea tardia e para o reconhecimento de antígenos, como é o caso do PPD. Não se sabe exatamente o mecanismo para essa alteração, mas já foi demonstrado que esta pode ser ocasionada pela deficiência da produção de IL-2 ou exposição crônica ao TNF. Um trabalho recente demonstrou que o número de células T $CD4^+$ está diretamente relacionado com a magnitude da resposta ao PPD. As células T regulatórias (TReg) ($CD4^+CD25^+$), que tem papel fundamental na prevenção da auto-imunidade, apresentam diminuição em número e função na AR. [5,6]

OBJETIVO

Avaliar a resposta à PT em pacientes portadores de artrite reumatóide.

METODOLOGIA

Foi realizado um estudo transversal em que foram incluídos 22 pacientes com diagnóstico de artrite reumatóide selecionados do ambulatório de reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás ou encaminhados por

médicos especialistas em reumatologia, do serviço público ou privado, ao programa de medicação de alto custo do Estado de Goiás (Centro de Medicação de alto custo - Juarez Barbosa/ SES-GO) para iniciarem o uso de anti-TNFs.

Foram incluídos no estudo, pacientes com idade igual ou maior a 18 anos e que concordaram a submeter-se à PT, assinando o termo de consentimento informado. Foram excluídos do estudo casos de gravidez suspeita ou confirmada, sorologia positiva para HIV e não comparecimento para realização ou leitura da PT.

Foi realizada a PT com aplicação de 100 µl PPD Rt 23 intradérmico no terço médio do antebraço esquerdo.



Figura 1: Técnica de inoculação do PPD, realizado 4 dedos abaixo da dobra do cotovelo, aproximadamente.

A leitura da indução foi realizada com 48 e 72 horas com o método de palpação do diâmetro transverso máximo, e o resultado expresso em milímetros de acordo com parâmetros estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (0 a 4 mm, negativo; ≥ 5, positivo).



Figura 2: Leitura do PPD com régua milimetrada na área do maior diâmetro da indução.

RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 22 pacientes, sendo 90,9% (20) do sexo feminino e 9,1% (2) do sexo masculino. A média de idade foi de 51,18 anos (±13,89; mínimo de 20 e máximo de 81 anos). O tempo médio de diagnóstico da artrite reumatóide foi de 13,95 anos (± 9,5). De todos os pacientes, 95,4% (21) faziam uso de prednisona, com uma dose média de 5,95 mg/dia (± 1,85). Com relação ao metotrexato (MTX), 81,8% (18) estavam em uso, com uma dose média de 11,63 mg/semana (± 4,9). Apenas 45,5% (10) estavam em uso de cloroquina, com uma dose média de 262,5 mg/dia (± 43,3). Na tabela 1 estão resumidas as variáveis clínicas:

Tabela 1 (descrição das variáveis)

Variáveis	Média ± DP (desvio-padrão)
Idade	51,18 ± 13,89
Tempo de diagnóstico (em anos)	13,95 ± 9,5
Dose de MTX, em mg/semana	11,63 ± 4,9
Dose de prednisona em mg/dia	5,95 ± 1,85
Dose de cloroquina em mg/dia	262,5 ± 43,3

Na tabela 2 é possível observar a freqüência relacionada aos resultados do PPD nesta amostra de paciente

Tabela 2

PPD	
Reator	Não-reator
4,5% (1)	95,5% (21)

DISCUSSÃO

Pacientes com artrite reumatóide (AR) apresentam uma incapacidade de produção de resposta adequada ao PPD, mesmo em indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis,* tornando o teste inapropriado para o reconhecimento das formas

latentes nesses pacientes.[7] Algumas autoridades recomendam, inclusive, que pacientes com AR e PPD negativo, mas que tenham grande risco clínico ou epidemiológico para infecção tuberculosa, sejam empiricamente tratados para TBIL antes do início da terapia com uma droga biológica.[8]

A frequência de diagnóstico de TBIL pelo PPD em pacientes com AR encontrada em nosso estudo (4,5%) foi menor que a encontrada em pessoas normais, de acordo com descrições da literatura e de outros estudos. Isso poderia dar a falsa impressão de ser a AR um fator protetor para TBIL. No entanto, esse fato ocorre, provavelmente, ou devido a pouca responsividade do PPD na AR ou pelo número de resultados falsos positivos do PPD em pessoas normais (reação cruzada com outras micobactérias ou com a vacina BCG).

Para título de comparação, em um estudo desenvolvido no Peru,[9] onde a TB é endêmica, o PPD foi realizado em um grupo de pacientes com AR e em um outro de voluntários imunocompetentes, pareados por sexo e idade. Foi considerado positivo um resultado $\geq$ 5 mm no grupo AR e $\geq$ 10 mm no grupo imunocompetente. Um resultado < 5 mm após 72 horas foi considerado negativo, nos dois grupos. Foi identificada uma positividade de 71% do PPD no grupo imunocompetente contra 29% no grupo com AR. Todos os pacientes do grupo AR utilizavam doses menores que 7,5 mg/dia de corticosteróide, o que reconhecidamente, não suprime a hipersensibilidade cutânea tardia. Essa discrepância de resultados foi associada à anormalidade da imunidade celular da AR. Em outro estudo realizado na Turquia, área onde a prevalência de TB é relativamente elevada, foi observada uma baixa positividade do PPD (29,8%) quando comparado com pacientes portadores de espondilite anquilosante (65,9%), artrite gotosa (68,8%) e osteoartrite (63%).[10]

Provenzano, Ferrante e Simon[11] avaliaram 69 pacientes italianos portadores de doença inflamatória articular crônica, que iriam se submeter ao tratamento com anti-TNF. Durante a triagem para TBIL foram encontrados 2,9% de pacientes com história prévia de TB tratada, 8,7% de PPD positivo e alterações radiográficas compatíveis com seqüela de TB em 20,3%, demonstrando a falha do PPD em identificar todos os pacientes portadores de TBIL, tornando a prática da realização da radiografia de tórax obrigatória.

Bahr *et al.*[12] investigaram o tipo de HLA na AR estabelecida e sua relação com quatro tipos de testes cutâneos para micobactérias (tuberculina, leprosina A, escrofulina e vaccina), injetados no antebraço, em uma população árabe. Para isso, foram analisados três grupos de pacientes: AR estabelecida (46), infecção tuberculosa ativa (111) e pessoas saudáveis (79). A responsividade aos testes cutâneos para micobactérias foi significativamente menor no grupo de pacientes com AR e está associada ao haplótipo DR7, o que não ocorreu nos outros dois grupos.

Estes e outros estudos apontam a necessidade de métodos diagnósticos da TBIL mais sensíveis e específicos em pacientes com AR que serão submetidos a tratamento com agentes anti-TNFα. As novas pesquisas visam avaliar a resposta imune celular a proteínas codificadas por genes ausentes no BCG e a resposta humoral a novos antígenos do *M. tuberculosis* que têm sido identificados. Um exemplo seria o antígeno HspX recombinante do *M. tuberculosis,* alvo de estudos na identificação da TBIL. Os resultados destes testes devem ser comparados aos obtidos através do PPD.

CONCLUSÃO

Apesar de amplamente aceito, o procedimento para triagem antes do uso do anti-TNF tem sido criticado, pois em várias situações não é capaz de identificar a TBIL. Dentre os problemas descritos temos a possível incerteza do paciente sobre a história médica de contato com TB, a falta de sinais radiográficos específicos de TBIL, além das dificuldades já descritas na utilização do PPD. Desse modo, o uso desses testes pode levar tanto à falta da quimioprofilaxia, devido à baixa sensibilidade do teste cutâneo na AR, quanto ao tratamento desnecessário (no caso de PPD falsamente positivo).[13]

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ormerod L.P., Milburn H.J., Gillespie S., Ledingham J., Rampton D.: BTS recommendations for assessing risk and managing *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease in patients due to start anti-TNFa treatment. Thorax 60: 800-5, 2005.

2. Provenzano G., Ferrante M.C., Simon G.: TB screening and anti-TNF a treatment. Thorax 60: 612-5, 2005.
3. Mangini C., Melo F.A.F.: Artrite reumatóide, terapia imunossupressora e tuberculose. Revista Brasileira de Reumatologia 43: XI-XV, 2003.
4. Furin J.J., Johnson J.L.: Recent advances in the diagnosis and management of tuberculosis. Curr Op Pulm Med 11: 189-94, 2005.
5. Kingsley G.H., Pitzalis C., Panay G.S.: Abnormal lymphocyte reactivity to self-major histocompatibility antigens in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 14: 667-73, 1987.
6. Marques, C.D.L., Duarte, A.L.B.P., Cavalcanti, F.S., Carvalho, E.M.F., Gomes, Y.M**.:** Abordagem diagnóstica da tuberculose latente na artrite reumatóide. Revista Brasileira de Reumatologia. Volume 47, n°6. São Paulo, 2007.
7. Kingsley G.H., Pitzalis C., Panayi G.S.: Abnormal lymphocyte reactivity to self-major histocompatibility antigens in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1987;14(4):667-73.
8. Furin J.J., Johnson J.L.: Recent advances in the diagnosis and management of tuberculosis. Curr Opin Pulm Med 2005;11(3):189-94.
9. Ponce de León D., Acevedo-Vazquez E., Sánchez-Torres A., Cucho M., Alfaro J., Perich R.: Attenuated response to purified protein derivate in patients with rheumatoid artritis: study in a population with high prevalence of tuberculosis. Ann Rheum Dis 2005;64:1360-1.
10. Köker I.H., Pamuk Ö.N., Karlikaya N., Tunçbilek N., Cakir N.: A low prevalence of purified protein derivative test positivity in Turkish patients with rheumatoid arthritis. Association with clinical features and HRCT findings. Clin Exp Rheumatol 2007;25(1): 54-9.
11. Provenzano G., Ferrante M.C., Simon G.: TB screening and anti-TNF-α treatment. Thorax 2005;60(10):612-5.
12. Bahr G.M., Sattar M.A., Stanford J.L., Shaaban M.A., Al Shimali B., Siddiqui Z.: HLA-DR and tuberculin tests in rheumatoid arthritis and tuberculosis. Ann Rheum Dis 1989;48(1):63-8.
13. Dinser R., Fousse M., Sester U., Albrecht K., Singh M., Köhler H *et al.* Evaluation of latent tuberculosis infection in patients with inflammatory arthropathies before treatment with TNF-α blocking drugs using a novel flow-cytometric interferon-γ release assay. Rheumatology 2008;47(2):212-218.

Caracterização da isocitrato liase recombinante do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*

Karine Martins de Oliveira[1], Maristela Pereira[2*].

Instituto de Ciências Biológicas II - Universidade Federal de Goiás

***Endereço para correspondência:** Profa. Dra. Maristela Pereira.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular; Instituto de Ciências Biológicas II; Universidade Federal de Goiás. CEP: 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil.
Tel: 55 62 3521-1110.
E mail: [1]karine.m.oliveira@hotmail.com, [2]mani@icb.ufg.br

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose, *Paracoccidioides brasiliensis*, isocitrato liase

1 INTRODUÇÃO

1.1 O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e a Paracoccidioidomicose (PCM)

O fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da micose sistêmica Paracoccidioidomicose (PCM) (ALMEIDA, 1930), desenvolve-se sob a forma de levedura em meio de cultura a 36°C e nos tecidos infectados, e sob a forma de micélio, em meio de cultura à temperatura de 22°C e no meio ambiente (KANETSUNA *et al*., 1972).

As colônias micelianas apresentam-se macroscopicamente como colônias pequenas, duras, planas, irregulares, de coloração bege, cobertas por micélio aéreo e curto que freqüentemente aderem-se ao ágar (BRUMMER *et al.,* 1993). As colônias leveduriformes apresentam-se macroscopicamente com coloração creme, de aspecto cerebriforme, não aderidas ao meio e com crescimento evidente após sete dias de incubação a 37°C (CARBONELL & RODRIGUES, 1965). As células leveduriformes apresentam morfologia oval ou alongada, em diferentes tamanhos (4

a 30 µm), contendo múltiplos núcleos (2 a 5 por célula), nucléolo e cromatina evidentes (LACAZ, 1994).

Durante a infecção, o fungo *P. brasiliensis*, sob a forma de levedura, encontra-se intracelularmente em macrófagos, onde se multiplica por brotamento múltiplo, formando o foco inflamatório (BRUMMER *et al*., 1989). A infecção se inicia com a inalação de propágulos da fase miceliana do fungo (McEWEN *et al*., 1987), o qual alcança o epitélio dos alvéolos pulmonares, onde se diferenciam para a forma patogênica de levedura (BRUMMER *et al*., 1993). A partir dos pulmões, o fungo pode se disseminar por todo o corpo, através da corrente sangüínea ou linfática (FRANCO, 1989).

O progresso da patologia e a diversidade das formas clínicas dependem dos fatores imunológicos do hospedeiro (FRANCO, 1989) e dos diferentes níveis de virulência dos diversos tipos de isolados do fungo (SAN-BLAS & NIÑO-VEGA, 2001). Emagrecimento, febre, palidez, aumento do volume dos gânglios linfáticos, lesões na pele, tosse e dispnéia são os sintomas mais comumente observados. Esse quadro clínico varia com a forma clínica (aguda ou crônica) em que o paciente se encontra (PANIAGO *et al*., 2003).

A resposta imune celular é o principal mecanismo de proteção contra a infecção (CALICH *et al*., 1998). Assim, os macrófagos devem desempenhar um papel central na patogênese da doença, tornando necessária a investigação de mecanismos que governam a fagocitose e a manutenção de *P. brasiliensis* no interior dos mesmos, para o entendimento da relação patógeno-hospedeiro.

A PCM causa a morte, principalmente, em homens adultos, trabalhadores de área rural, em idade produtiva, de camada social de baixa renda, e em pacientes com deficiência imunológica. Antes da puberdade, a infecção ocorre com a mesma freqüência nos sexos masculino e feminino. Após este período, a frequência da PCM passa a ser maior nos indivíduos do sexo masculino (MARTINEZ, 1997). Este fato tem sido explicado pela ação protetora dos hormônios estrógenos na mulher adulta (CLEMONS *et al*., 1990) e pelo menor contato com as fontes de infecção. O trabalho com o solo é fator ocupacional importante para predisposição a PCM (MARQUES *et al*., 1983).

A severidade da doença, o local da lesão e a contra-indicação para o uso de determinada medicação, baseado no histórico prévio de falha ou reação de hipersensibilidade são os parâmetros considerados na escolha do antifúngico a ser

utilizado na terapia (YASUDA, 2005). O tratamento da PCM é lento, iniciando com uma dosagem agressiva de agentes antifúngicos, e se prolongando por meses ou anos, causando a freqüente desistência do paciente (MENDES *et al*., 1994; HAHN *et al*., 2003). O surgimento de isolados resistentes às várias classes de antifúngicos disponíveis (HAHN *et al*., 2003), mesmo utilizando-se terapia combinada (YASUDA, 2005), e a alta toxicidade comprovada têm complicado o tratamento de pacientes (CORTI *et al*., 2003). Assim, torna-se relevante a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

1.2 Isocitrato Liase

Para muitos organismos, a fonte de carbono preferencial é a glicose. Esta pode ser convertida em um açúcar contendo cinco carbonos, tais como ribose e desoxirribose, através da via pentose fosfato ou ser catabolisada para acetil-CoA através da glicólise. O acetil-CoA entra para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Figura 1), onde é convertido através de oito passos enzimáticos, em intermediários que alimentam numerosas vias, incluindo as vias de biossíntese de aminoácidos, ácidos graxos e glicose (LORENZ & FINK, 2002). O TCA resulta na geração de moléculas produtoras de energia, e também atua como reservatório de precursores metabólicos essenciais para a síntese de aminoácidos, ácidos graxos e açúcares (HAMEL & APPANNA, 2001).

No interior dos macrófagos há uma limitação de glicose (SELITRENNIKOFF, 2003). Assim, na busca de novas fontes de carbono, fungos e muitos outros microrganismos procariotos e eucariotos utilizam etanol, acetato e ácidos graxos. Para utilização destes compostos formados por dois carbonos é requerido um ciclo ausente em mamíferos, o Ciclo do Glioxalato (CG) (Figura 1) (NAKATA, 2002).

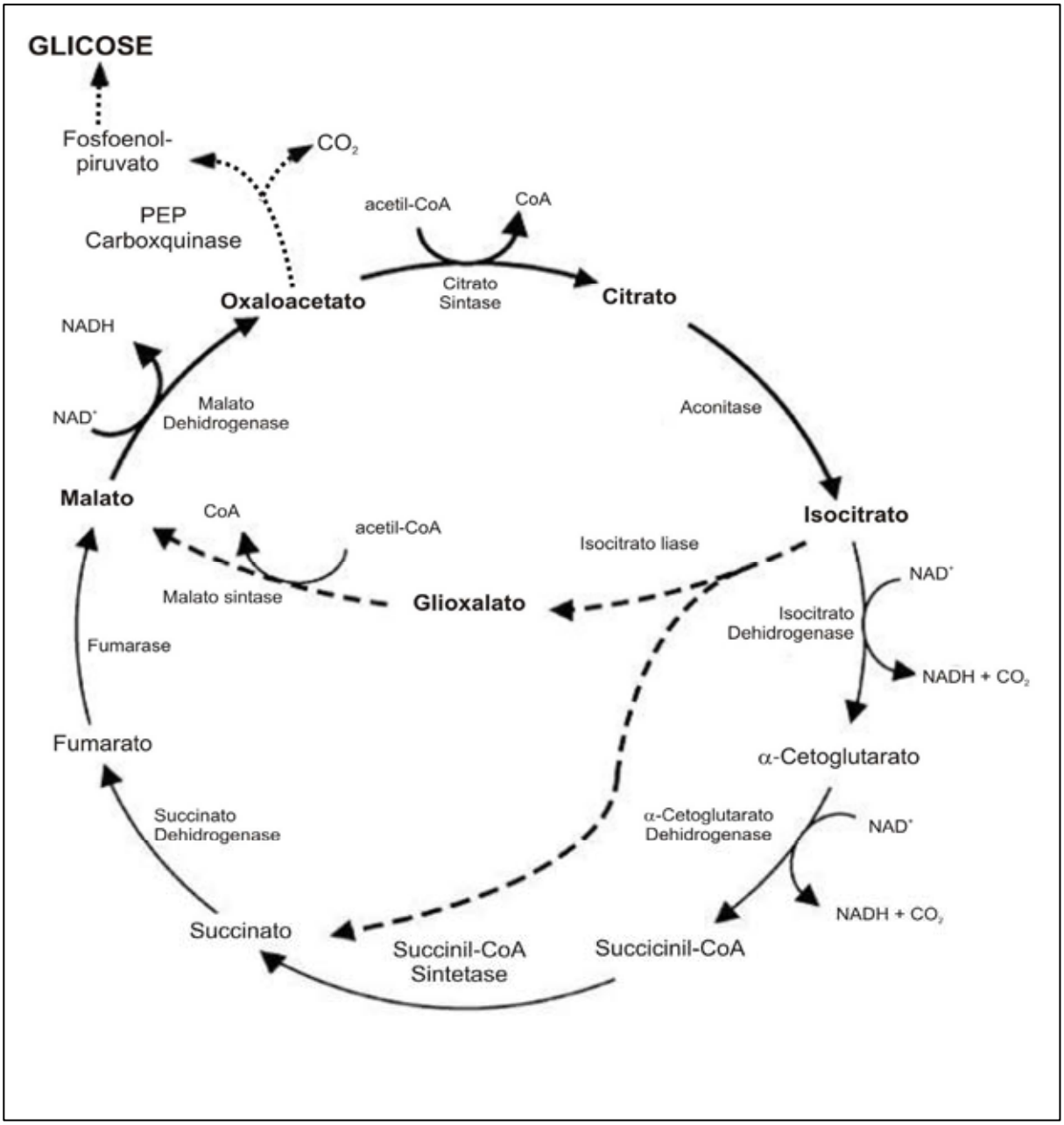


Figura 1 – Esquema representativo do ciclo do ácido tricarboxílico, ciclo do glioxalato e gliconeogênese. Estão evidenciados os passos enzimáticos básicos no ciclo do ácido tricarboxílico (linhas finas), o qual é comum para todos os organismos; passos no ciclo do glioxalato (linhas tracejadas), que é comum para microrganismos e plantas, e os passos compartilhados pelos dois ciclos (linhas grossas) e a reação inicial de gliconeogênese (linhas sombreadas). Fonte: LORENZ & FINK (2002).

O CG é uma via alternativa para o TCA que permite a oxidação de acetato (acetil-Coa), para formação de ácidos dicarboxílicos (succinato, malato e oxalacetato) (FLAVELL & WOODWARD, 1970). Neste processo participam enzimas comuns ao TCA e também as especificas do CG, a isocitrato liase (ICL) e a malato sintase (MLS). A enzima ICL catalisa a reação de clivagem do isocitrato a succinato e glioxalato. Em seguida, a enzima MLS condensa o glioxalato com acetil-CoA formando o malato (KORNBERG, 1966), o qual é convertido em oxalacetato, seguindo-se as etapas enzimaticamente idênticas às do TCA resultando na regeneração do isocitrato (LORENZ & FINK, 2002).

A ausência do CG em mamíferos e o fato da ICL ser uma enzima chave nesse ciclo, elegem essa enzima um importante alvo fungo-específico para o desenho racional de antifúngicos. Nesse sentido, torna-se importante a obtenção e caracterização da enzima ICL recombinante de *P. brasiliensis*.

1.3 Transcriptomas de *P. brasiliensis*

Vários projetos transcriptomas de *P. brasiliensis* têm sido desenvolvidos no sentido de identificar um maior número de genes expressos. GOLDMAN *et al*. (2003) identificaram 4.692 genes expressos em leveduras de Pb18 após infecção em camundongos. Esses genes foram categorizados funcionalmente em genes envolvidos com resposta a estresse (1%), metabolismo celular (8%), metabolismo de proteínas (4%), síntese de RNA (2%), estrutura celular (5%), divisão celular (1%) e proteínas hipotéticas (60%).

Um total de 25.511 clones derivados de bibliotecas de cDNAs das fases miceliana e leveduriforme foram sequenciados, resultando em 6.022 grupos que representam cerca de 80% do genoma total do isolado Pb01. Após categorização pelo COG (categorias de ortólogos funcionais), concluiu-se que 29% desses genes estão envolvidos no metabolismo celular, 12% na transcrição, 10% na síntese de proteínas, 9% na produção de energia e 4% no controle da organização celular (FELIPE *et al*., 2005).

O perfil transcricional de P. brasiliensis durante a diferenciação morfológica de micélio para levedura foi avaliado por BASTOS *et al*. (2007). Vários genes potencialmente relacionados com a síntese de membrana e parede celular mostraram-se aumentados durante a diferenciação celular de micélio para levedura,

sugerindo que *P. brasiliensis* favorece o remodelamento da membrana e da parede celular nos estágios iniciais da morfogênese. Durante a transição também foi verificada a presença de transcritos que codificam enzimas que participam do ciclo do glioxalato (CG) como a isocitrato liase (ICL) e malato sintase (MLS), malato desidrogenase, citrato sintase e aconitase, sugerindo que a transição morfológica em *P. brasiliensis* é mediada pela ativação de vias metabólicas alternativas que influenciam na adaptação ao ambiente, o que provavelmente garantiria a sobrevivência do fungo dentro do hospedeiro.

DERENGOWSKI *et al*. (2008) observaram a indução de genes em *P. brasiliensis* recuperados a partir de macrófagos murinos. Esses genes codificam para as enzimas isocitrato liase e malato sintase do ciclo do glioxalato, e fosfoenolpiruvato carboxiquinase a enzima chave e regulatória da gliconeogênese mostrando que o patógeno é capaz de utilizar compostos de dois carbonos para a síntese *de novo* de glicose. A co-regulação de genes do CG e da via da gliconeogênese observada por DERENGOWSKI *et al*. (2008) é consistente com a importância dessas vias no fornecimento de energia a partir de compostos de dois carbonos e metabolismo de ácidos graxos (LORENZ *et al*. 2002; BARELLE *et al*., 2006). Em *P. brasiliensis*, o gene da isocitrato liase é induzido durante a infecção em modelos murinos, indicando que o ciclo do glioxalato pode ser induzido em células leveduriformes durante o processo de infecção (COSTA *et al*., 2007).

Várias vias que fornecem substratos para o ciclo do glioxalato são induzidas em células leveduriformes de P. brasiliensis. A enzima isocitrato liase redireciona o fluxo metabólico utilizando etanol e acetato como fonte com dois carbonos para gerar oxaloacetato, que pode levar à produção de glicose (FELIPE *et al*., 2005).

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo obter a proteína recombinante isocitrato liase do fungo *P. brasiliensis* (*Pb*ICLr), purificá-la em grande quantidade, e em seguida, caracterizá-la determinando pH e temperatura ótimos de atividade da enzima, bem como avaliar o efeito de íons e os parâmetros cinéticos da proteína recombinante.

3 METODOLOGIA

3.1 Expressão heteróloga da ICL de *P. brasiliensis* e purificação da proteína recombinante

A bactéria E. coli foi transformada de acordo com CRUZ et al, (em preparação), com o vetor pET32a ligado ao gene que codifica a ICL (pET32a-*Pb*ICL), crescendo em meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL) a 37°C até uma densidade óptica de 0.6 em 600 nm. A síntese da proteína recombinante foi iniciada pela adição de isopropil-β-D-tiogalactopiranosideo (IPTG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) até uma concentração final da cultura em crescimento de 1mM. Após 2h a 37 °C com o shaker a 200rpm, as células bacterianas foram arrastadas por centrifugação a 10000 rpm e a lise foi alcançada com o uso de tampão fosfato salino (PBS). O pellet bacteriano foi então ressuspendido em (PBS) (50 µL de PBS por 1mL de cultura). As células de E. coli foram incubadas por 30 min com 100 µg/mL de lisozima e lisadas por extensas sonicações. A amostra foi então centrifugada a 4°C, 8000 rpm por 15 min e o sobrenadante, o qual continha a fração protéica solúvel, foi coletado. A proteína ICL recombinante com a cauda de histidina foi purificada usando Ni-NTA Spin Kit (Qiagen Inc.,Germantown, MD) de acordo com as especificações do fabricante.

3.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade da ICL foi determinada de acordo com EBEL et al. (2006), com algumas modificações. As reações foram feitas a 30°C, em tubos de ensaio de 1mL contendo: 2 mM treo-D,L-isocitrato, 2 mM MgCl2, 10 mM fenilhidrazina HCl, 2 mM ditiotreitol, e 50 mM de tampão Tris em pH 7.0. A formação do produto glioxalato-fenilhidrazona foi acompanhada a 324 ηm usando-se um coeficiente de extinção de 16.8 $mM^{-1}cm^{-1}$. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a formação de 1 µmol de glioxilato-fenilhidrazona por minuto usando-se treo-D,L-isocitrato como substrato. As atividades específicas foram dadas como U/mg de proteína.

3.3 Determinação do pH e temperatura ótimos

Os ensaios com a isocitrato liase foram realizados como descrito no item anterior, mas tampões diferentes foram usados no lugar de 50 mM de tampão Tris (pH 7.0). Incluindo o tampão acetato em pHs 5.0, 6.0; tampão citrato/fosfato em pHs 5.0, 6.0 e 7.0; tampão fosfato em pHs 6.0, 7.0 e 8.0; e tampão Tris em pHs 7.0, 8.0 e 9.0. Os efeitos da temperatura sobre a enzima recombinante isocitrato liase de *P. brasiliensis* (*Pb*ICLr) serão avaliados medindo-se a atividade da enzima em diferentes temperaturas (25°C a 45°C) em tampão Tris (pH 7.0).

3.4 Efeito de íons metálicos sobre a atividade da *Pb*ICLr

Para se investigar o efeito de íons metálicos sobre a atividade da PbICLr, as proteínas foram purificadas usando-se um tampão isento de Mg2+. Os ensaios com a ICL foram realizados tanto com diferentes íons metálicos, como com uma combinação de MgCl2 em uma concentração de 5mM. Os metais usados foram: MnCl2, CaCl2, BaCl2, NiCl2, HgCl2 e ZnCl2. Em uma outra frente, o efeito do citrato sobre a *Pb*ICLr foi avaliado como um possível inibidor. Usando-se o citrato em concentrações variando de 25mM a 100mM enquanto os outros componentes foram mantidos constantes.

3.5 Determinação da constante de Michaelis

O valor do Km para a ICL foi determinado pelo aumento de concentração do isocitrato de 0,5mM para 3,75mM no ensaio, enquanto todos os outros componentes permaneceram constantes (pH 7.0 e temperatura 30°C). Os valores do K_m e da $V_{máx}$ foram determinados usando-se o duplo-recíproco de Lineweaver-Burke (SEGEL, 1975).

4 RESULTADOS

4.1 Expressão, purificação e detecção da proteína recombinante *Pb*ICL

O cDNA que codifica *Pb*ICL foi subclonado no vetor de expressão pET-32a para obtenção da proteína de fusão recombinante em células de *E. coli* BL21 (C43). A proteína não está presente no extrato bruto de E. *coli* já que não carregam o vetor de expressão (Figura 2, linha 1). Após a indução com IPTG, uma proteína recombinante de 73 kDa foi detectada no lisado bacteriano (Figura 2, linha 2). Os seis resíduos de histidina fusionados na região N terminal da proteína recombinante foi utilizado para purificar a proteína por afinidade, a partir do lisado celular, em resina de níquel. A proteína recombinante foi eluída e analisada em SDS-PAGE (Figura 2, linha 3).

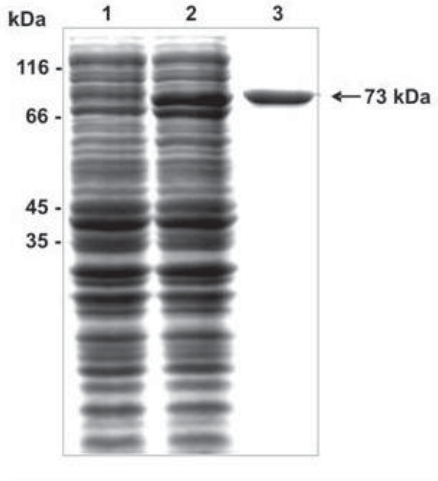


Figura 2 – Expressão heteróloga e purificação de *Pb*ICL recombinante. Análise de SDS-PAGE da recombinante *Pb*ICL obtida a partir de células de E. *coli* BL21, contendo o plasmídeo pET-32a-*Pb*ICL, crescidas a 37°C para A_{600} de 0.6, obtidas antes (linha1), após 1h de incubação com 1mM IPTG (linha2). As células foram lisadas e *Pb*ICL purificada em resina de níquel (linha3). Os tamanhos moleculares são indicados à esquerda.

4.2 Atividade enzimática de *Pb*ICLr

Para avaliar a atividade da recombinante *Pb*ICL, uma alíquota da eluição contendo 20 µg de *Pb*ICL purificada em condições nativas, foi dialisada em água. O

ensaio de atividade da enzima foi realizado imediantamente. A enzima apresentou uma atividade na presença de treo-D,L-isocitrato correspondente a 6,2 U/mg.

4.3 Determinação do pH e temperatura ótimos de *Pb*ICLr

A atividade enzimática de *Pb*ICLr é pH dependente. Quatro diferentes tampões foram utilizados com o pH variando de 5 a 9. O pH ótimo para o ensaio de atividade da *Pb*ICLr foi de 7,0 com o tampão Tris (Figura 3). E a temperatura ótima para atividade da enzima foi de 30 °C em pH 7,0 (Figura 4).

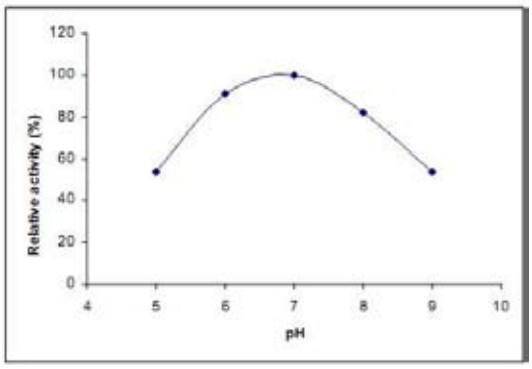


Figura 3 – Efeito do pH sobre a atividade enzimática da ICL recombinante de P. *brasiliensis*. Tampão fosfato/citrato (5,0 – 7,0), tampão fosfato (6,0 – 8,0), tampão Tris (7,0 – 9,0). Os resultados são valores médios de três repetições.

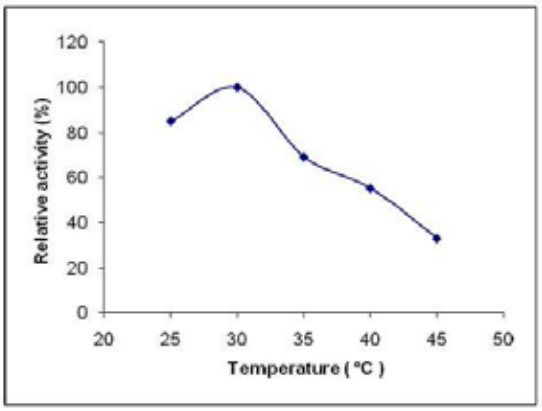


Figura 4 – Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da ICL recombinante de P. *brasiliensis.* Os resultados são valores médios de três repetições.

4.4 Efeito dos íons metálicos sobre a atividade de *Pb*ICLr

A presença do íon Mg^{2+} é essencial para a atividade catalítica da ICL, sendo considerado um metal-ativador dessa enzima. A atividade de *Pb*ICLr foi avaliada na presença de cátions divalentes. O Mg^{2+} a 2mM foi o cátion mais eficaz. O Mn^{2+} foi capaz de substituir o Mg^{2+} produzindo 63% do obtido com a atividade na presença de Mg^{2+}. Já os íons Ca^{2+}, Ba^{2+}, Ni^{2+}, Hg^{2+} e Zn^{2+} não proporcionaram um aumento significativo na atividade de *Pb*ICLr (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeitos de íons metálicos na atividade enzimática de *Pb*ICLr

	Atividade (U)	Atividade específica (%)
$MgCl_2$	$1{,}24 \times 10^{-3}$	100
$MnCl_2$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	29,8
$BaCl_2$	$5{,}50 \times 10^{-4}$	4
$CaCl_2$	$1{,}30 \times 10^{-4}$	0,96
$ZnCl_2$	0	0
$NiCl_2$	0	0
$HgCl_2$	0	0

U = 1µmol/min

1 U é definido pela formação de 1 µmol de glioxalato-fenilhidrazona (produto) por minuto usando isocitrato como substrato. Os resultados são valores médios de três repetições.

Uma variedade de combinações de íons metálicos foi utilizada para estudar sua capacidade inibitória sobre a atividade de *Pb*ICLr. Os cátios estavam numa mistura de concentração equimolar com o magnésio. Ca^{2+} e Ba^{2+} não tiveram qualquer efeito inibitório, enquanto que todos os outros íons inibiram a atividade para abaixo da sensibilidade do ensaio.

4.5 Determinação da constante de Michaelis

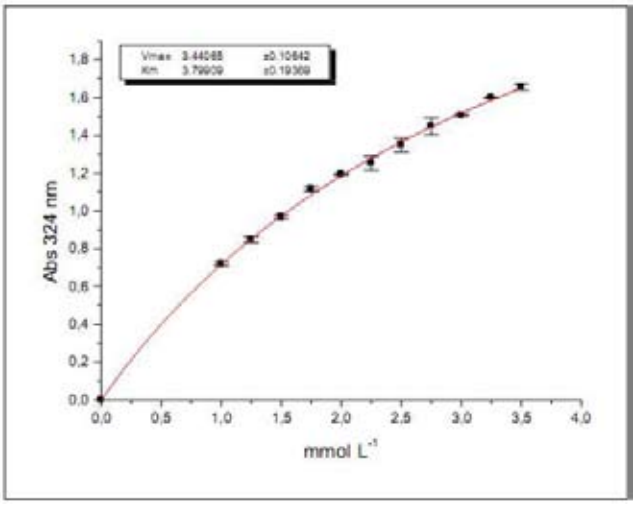


Figura 5 – Determinação da constante de Michaelis-Menten. O Valor de K_m da *Pb*lCLr foi dado pela mudança de concentração de treo-D,L-isocitrato de 0,5mM para 3,75mM, na avaliação da atividade, com todos os outros componentes permanecendo constantes (Mg^{2+}, 5mM, pH 7,0 e temperatura 30°C).

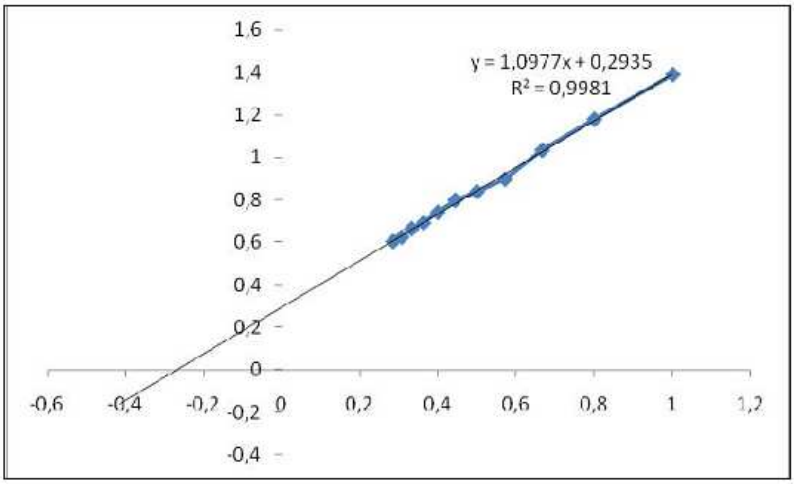


Figura 6 - Determinação da constante de Michaelis-Menten. Os valores de K_m e $V_{máx}$ foram determinados usando-se o duplo-recíproco de Lineweaver-Burke.

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi realizada a expressão heteróloga e a caracterização da *Pb*ICL recombinante, incluindo a avaliação dos parâmetros cinéticos da enzima.

Os parâmetros cinéticos de *Pb*ICL recombinante foram determinados mostrando que a enzima é mais ativa na temperatura de 30°C e pH 7,0. A presença de íons Mg^{2+} é conhecida por ser essencial na atividade de isocitrato liase (KHAN *et al.,*1992). Nós também demonstramos a importância que o íon Mg^{2+} possui nos ensaios de atividade, mostrando que em sua ausência, a *Pb*ICL recombinante não possui atividade. Os valores de K_m e V_{max} foram de 3.8 mM e 3.4 mM/min/mg respectivamente.

Sabe-se que para a isocitrato liase de C. *glutamicum* o Mn^{2+} pode substituir parcialmente o Mg^{2+} (REINSCHEID *et al*.,1987). Em M. *avium* e M. *tuberculosis* a ICL tem características semelhantes à cinética de *Pb*ICLr, mostrando temperatura e pH ótimo de 30°C e 6,8 respectivamente, e também usa o íon metálico Mg^{2+} (BENTRUP *et al*.,1999).

A obtenção da proteína recombinante *Pb*ICL ativa (6,2U/mg) permitirá futuros estudos para avaliar inibidores em potencial para *Pb*ICL, além de garantir mais análises comparativas entre a *Pb*ICL e outras ICLs.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho possibilitou concluir que a enzima *Pb*ICL recombinante é expressa em sua forma solúvel pela bactéria E. *coli*, apresentando uma massa molecular de 73 kDa. Nos ensaios de atividade, a enzima clivada apresentou atividade específica de 6,2 U/mg.

Os parâmetros cinéticos da *Pb*ICL recombinante foram avaliados, demonstrando que essa enzima possui uma atividade máxima a uma temperatura de 30°C e um pH de 7,0. Demonstramos também que a *Pb*ICL recombinante é uma enzima metalo-dependente, necessitando do íon Mg^{2+} para sua atividade.

Os resultados acima possibilitarão ensaios para a busca de compostos com capacidade inibitória para essa enzima.

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidioico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. **Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 5, p. 125-141, 1930.

BENTRUP KHZ, MICZAK A, SWENSON DL, RUSSEL DG. **Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in Mycobacterium avium and Mycobacterium tuberculosis** 181:7161-7167, 1999.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.

BRUMMER, E.; HANSON, L.H.; RESTTREPO, A.; STEVENS, D.A. Intracelular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction f multiplication of by activated macrophages. **Infect. Immun**, v. 57, p. 2289-2294, 1989.

CALICH, V.L.; VAZ, C.A.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* nfection. **Res. Immunol**. 149: 407-417, 1998.

CARBONELL, L.M.; RODRÍGUEZ, J. Transformation of mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures and in experimental inoculations. **Journal f Bacteriology**, v. 90, p. 504-510, 1965.

CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. Interactions of mammalian steroid hormones with *Paracoccidioides brasiliensis*: estradiol receptor binding and mediation of cellular functions. **Interciencia**.15: 206-208, 1990.

COSTA, M.; BORGES, C.L.; BAILÃO, A.M.; MEIRELLES, G.V.; MENDONÇA, Y.A.; DANTAS, S.F.I.M.; FARIA, F.P.; FELIPE, M.S.S.; MOLINARI-MADLUM, E.E.W.I.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; FIUZA, R.B.; MARTINS, W.S.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M.A. Transcriptome profiling of Paracoccidioides brasiliensis yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction **Microbiology** 153: 4194-4207, 2007.

CRUZ, A. H. S. **Caracterização e expressão heteróloga da isocitrato liase de *Paracoccidioides brasiliensis*.** 2007. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

DERENGOWSKI, L.S.; TAVARES, A.H.; SILVA, S.; PROCÓPIO, L.S.; FELIPE, M.S.; SILVA-PEREIRA, I. Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. **Medical Mycology**. 46: 125 – 134, 2008.

EBEL, F.; SCHWIENBACHER, M.; BEYER, J.; HEESEMANN, J.; BRAKHAGE, A.A.; BROCK, M. Analysis of the regulation, expression, and localization of the isocitrate lyase from Aspergillus fumigatus, a potential target for antifungal drug development. **Fungal Genetics and biology**. 43:476-489, 2006.

FELIPE, M.S; *et al*. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem** 280(26):24706-24714, 2005.

FLAVELL, R.B.; WOODWARD, D.O. The concurrent regulation of metabolically related enzymes. The Krebs cycle and glyoxylate shunt enzymes in Neurospora. **Eur J Biochem**. 17: 91-284, 1970.

FRANCO, M.; SANO, A.; KERA, K.; NISHIMURA, K.; TAKEO, K.; MIYAJI, M. Clamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 31:151-157, 1989.

GOLDMAN, G.H.; MARQUES, E.r.; RIBEIRO D.C.; BERNARDES L.A.S.; QUIAPIN A.C.; VITORELLI P.M.; SAVOLDI M.; SEMIGHINI C.P.; OLIVEIRA. *et al*. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen Paracoccidioides brasiliensis yeast phase: identification of putative homologues of Candida albicans virulence and pathogenicity genes. **Eukaryot Cell**. 2:34-48, 2003

HAHN R.C.; MORATO CONCEIÇÃO Y.T.; SANTOS N.L.; FERREIRA J.F.; HAMDAN J. S. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**. 46: 342-347, 2003.

HAMEL, R.D.; APPANNA, V.D. Modulation of TCA cycle enzymes and aluminum stress in Pseudomonas fluorescens. **Journal of Inorganic Biochemistry**. 87:1-8, 2001.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L.M.; AZUMA, I.; YAMAMURA, Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 110, p. 208-218, 1972.

KORNBERG, H.L. The role and control f the Glyoxylate Cycle in Escherichia coli. **Biochemistry Journal**. 99: 1-11, 1966.

LACAZ, C.S. Paracoccidioides brasiliensis: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In: Franco, M.; Lacaz, C.S.; Restrepo-Moreno, A. and Del Negro, G. (Eds), Paracoccidioidomycosis. **CRC Press**, p. 13-25, 1994.

LORENZ, M. C.; FINK, G.R. Life and Death in a Macrophage: Role of the Glyoxylate Cycle in Virulence. **Eukaryotic cell**. 1: 657-662, 2002.

MARQUES, S.A.; FRANCO, M.F.; MENDES, R.P.; SILVA, N.C.A.; BACCILI, C.; CURCELLE, E.D.; FERACI, A.C.M.; OLIVEIRA, C.S.; TAGLIARINI, J.V.; DILLON, N.L. Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). **Ver. Inst. Méd. Trop. São Paulo**. 25: 87-92, 1983.

MARTINEZ, R. Blastomicose-Sul-Americana (Paracoccidioidomicose)-Etioepidemiologia e Ecologia. **Tratado de Infectologia**. 2ª Edição. Ed Ateneu, p. 1082, 1997.

McEWEN, J. G.; RESTREPO, B.I.; SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A. Nuclear staining of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med.Vet. Mycol**. 25:343-345, 1987.

NAKATA, M.; SELITRENNIKOFF, C.P. A method to assay Glyoxilate cycle Inhibitors for Antifungals. **The Journal of Antibiotics**. 55: 602-604, 2002.

PANIAGO, A. M.; AGUIAR, J. I.; AGUIAR, E. S.; CUNHA, R. V.; PEREIRA, G. R.; LONDERO, A. T.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul]. **Rev Soc Bras Med Trop**. 36: 455-9, 2003.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. Paracoccidioides brasiliensis: virulence and host response. In: Cihlar, R. L., Calderone, R. A., eds. Fungal Pathogenesis: Principles and clinical applications. **New York:Marcel Dekker**.pp.205-226, 2001.

SEGEL, I.H. Enzyme Kinetics. **Wiley Interscience**, New York, N.Y, 1975.

SELITRENNIKOFF, C.P.; NAKATA, M. New cell wall for antifungal drugs. **Current Opinion In Investigational Drugs**. 4: 200-205, 2003.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Pharmacological management of paracoccidioidomycosis Review). **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 6, n. 3, p. 1-13, 2005.

Avaliação clinico - laboratorial e histopatológica do fígado de cães para a determinação da acurácia de provas bioquímicas que avaliam a função hepática.

Nícollas Alexandre Gomes Rocha[1], Edismauro Garcia Freitas FILHO[2] Jéssica Ribeiro MAGALHÃES[2] Edismair Carvalho GARCIA[2] Cecília Nunes Moreira Sandrini[3]
Universidade Federal de Goiás – Camus Jataí
e-mails: nicollasrocha@gmail.com, cissanm@yahoo.com.br

1-Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária, UFG/CAJ.
2-Técnico em Patologia Animal, UFG/CAJ.
3- Professor Adjunto do Curso de Medicina Veterinária, UFG/CAJ. Universidade Federal de Goiás – Campus Jataí - BR 364, km 192, Zona Rural, Jataí-GO, CEP:75800-000

Palavras-chave: fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, especificidade.

INTRODUÇÃO

Na avaliação clínica do fígado de pequenos animais os testes laboratoriais nem sempre são conclusivos podendo existir uma hepatopatia grave sem elevações significativas da atividade sérica enzimática e, ao contrário, a função hepática pode estar normal na presença de valores enzimáticos elevados. Portanto, a realização de exames histopatológicos produz a avaliação mais precisa quanto ao funcionamento do órgão. Como na rotina o clínico utiliza com mais freqüência os exames laboratoriais, o conhecimento da acurácia dos testes utilizados é fundamental para o êxito do diagnóstico (MEYER & HARVEY, 2004).

Os testes enzimáticos são largamente utilizados como indicadores dos efeitos de substâncias químicas ou tóxicas sobre o fígado. A interpretação dos resultados das análises laboratoriais é complexa, pois tais enzimas não são específicas dos tecidos, podendo estar alteradas por doenças ou lesões em outros órgãos (GOMES, 2004).

A interpretação adequada do perfil bioquímico sanguíneo implica na utilização de valores de referência adaptados para as condições geográficas, de manejo, de raça, de alimentação e do próprio laboratório que realiza as dosagens. Dentro dos parâmetros sanguíneos, a atividade enzimática é a que apresenta maior variabilidade. A maioria dos valores de referência disponível é de autores estrangeiros, o que limita a adequada aplicação do perfil bioquímico sanguíneo em caninos no Brasil (GONZALEZ et al., 2001). A interpretação das análises

laboratoriais depende do conhecimento dos valores normais e intervalos de referência na população sem doença (GOMES, 2004).

No caso do fígado, os testes laboratoriais podem alertar para a presença de uma alteração hepatocelular, estase biliar ou disfunção metabólica, mas nunca são suficientes para determinar a exata natureza da lesão. Na exploração hepática, a bioquímica clínica reflete uma alteração em um dado momento; mas os testes não revelam as causas nem a distribuição da lesão (MEYER & HARVEY, 2004).

As provas de avaliação da integridade celular se refletem no aumento na atividade plasmática de uma enzima que ocorre principalmente por lesão, ruptura ou necrose das células do órgão ou tecido que contém tal enzima, ou pela diminuição de sua excreção. Como as enzimas não são encontradas em um único órgão, a especificidade pode ser melhorada com a determinação de mais de uma enzima (KERR, 2003). Para cães as enzimas que devem ser consideradas na avaliação da integridade do fígado são a alanina aminotransferase (ALT) e a fosfatase alcalina (FA) e utilizada na rotina clínica conjuntamente com a avaliação da enzima não-específica aspartato aminotransferase (AST) (ANDERSON, 1992; KERR, 2003). A dosagem da bilirrubina indica o grau de capacidade excretora do fígado. Ela é um subproduto da quebra da molécula heme, em sua forma inicial não é solúvel em água por isso, quando esta no plasma, encontra-se ligada à albumina. É transportada via sistema reticulo-endotelial ao fígado, onde é conjugada com o ácido glicurônico e outras substâncias e transformada em solúvel. O conjugado de bilirrubina é excretado na bile, e ela e seus pigmentos associados (principalmente a estercobilina) são responsáveis pela cor acastanhada das fezes.

O aumento da bilirrubina direta no soro indica colestase, mas não é especifico, no entanto sua elevação sangüínea vai produzir bilirrubinúria que em quase todas as espécies, exceto no cão, é diagnóstico de colestase. Elevações séricas da bilirrubina indireta, livre ou não-conjugada são observadas na hemólise, enfermidade hepática e colestase é a principal causa de icterícia. A maior parte da bilirrubina (80%) é produzida pela degradação da hemoglobina proveniente da destruição natural dos eritrócitos. Uma pequena porcentagem (20%) é derivada do catabolismo de varias hemoproteínas hepáticas (mioglobina, citocromo p450) e da superprodução de heme pela medula óssea. A bilirrubina não é encontrada normalmente na urina dos animais domésticos e quando ocorre bilirrubinúria é pela

presença de bilirrubina conjugada que é hidrossolúvel (FRENCH, et al., 1999; KERR, 2003)

São múltiplas as qualidades que caracterizam os métodos diagnósticos, para alguns é mais indicado a avaliação de métodos quantitativos, como precisão e exatidão, enquanto outros refletem, com mais nitidez, a performance dos métodos qualitativos, como sensibilidade e a especificidade (CORTES, 1993). Portanto, quanto maior o conhecimento sobre a acurácia dos testes utilizados com relação à presença ou ausência de alterações histológicas hepáticas, especialmente nos casos onde não é possível a realização de exames de maior precisão, mais acertadamente e com maior segurança o clínico alcançará o diagnóstico definitivo (GOMES, 2004).

A acurácia de um teste é determinada pela avaliação de sua sensibilidade, especificidade e o valor de precisão, sendo que este último combina a prevalência com a especificidade. A comparação entre os resultados de um teste permite o estabelecimento de quatro categorias de resultados: verdadeiramente positivos (VP) e verdadeiramente negativos (VN), falso positivos (FP) e falso negativos (FN) (CORTES, 1993).

A especificidade é um atributo do teste empregado no rastreamento, definido pela probabilidade de resultado negativo no caso da doença estar realmente ausente. É calculada a partir da fórmula: VN/(VN+FP)*100 (FORATTINI, 1992).

A sensibilidade é um atributo do teste, definido pela probabilidade de resultado positivo no caso de a doença estar realmente presente. É calculada a partir da fórmula: VP/(VP+FN)*100 (FORATTINI, 1992).

O valor de precisão é um tipo de teste que combina a prevalência da doença em uma determinada população, com a especificidade e a sensibilidade do teste laboratorial utilizado para diagnosticá-la (SHULTZ, 1996). O valor preditivo pode ser negativo (VPN) e reflete a proporção de resultados verdadeiros no conjunto de resultados negativos. E ainda, o valor preditivo pode ser positivo (VPP) e indica a proporção de resultados verdadeiros no conjunto de resultados positivos. São calculados a partir das fórmulas: VPN = VN/(VN+FN)*100 e VPP = VP/(VP+FP)*100 (CORTES, 1993).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a acurácia de alguns testes laboratoriais na detecção de alterações laboratoriais hepáticas em cães. Determinar a sensibilidade, especificidade e valor de precisão positivo e negativo das atividades séricas da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e as dosagens de bilirrubinas total quanto à capacidade em detectar alterações histológicas hepáticas. Foram relacionados os resultados obtidos na bioquímica sérica com as alterações histológicas do fígado dos animais. Bem como os resultados do exame clínico dos mesmos com a bioquímica clínica e as possíveis alterações histopatológicas. Foram analisadas as principais alterações histológicas no fígado dos cães participantes do experimento.

3. METODOLOGIA

3.1 . Animais e Delineamento experimental

Foram avaliados 56 cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses que forem encaminhados para as aulas práticas de patologia do Curso de Veterinária da UFG – Campus Jataí. Os animais foram incluídos no projeto sob forma de uma amostra aleatória simples, não tendenciosa, onde todos os animais que foram utilizados para as aulas foram incluídos até se chegar ao total de 60 cães. Para cada animal foi preenchida uma ficha de identificação, com a organização do maior número de informações possíveis, dentre elas: identificação dos animais, quanto ao sexo, raça, idade, exame físico (temperatura, freqüências cardíaca e respiratória, tempo de reperfusão capilar, estado de hidratação, coloração das mucosas), suspeita clínica e exames complementares que foram realizados.

3.2. Coleta e processamento das amostras

Para a determinação do volume globular, fibrinogênio, proteínas plasmáticas, hemograma e leucograma foram obtidos dois ml de sangue, por

punção da veia radial e/ou jugular, em tubo vacutainer® (® Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, Brasil) de 13X75 mm, descartáveis, de vidro, com tampa e anticoagulante EDTA (ácido etilediaminotetracético, sal dissódico) a 10% em solução aquosa. Foram utilizadas agulhas 25X8, descartáveis para coleta de sangue. Os tubos foram colocados imediatamente sob refrigeração e as determinações foram realizadas dentro de no máximo 12 horas.

Para a realização das provas bioquímicas foram coletados 8 ml de sangue em tubo vacutainer® de 13X75 mm(® Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, Brasil), descartáveis, de vidro, siliconizado, com tampa e sem anticoagulante. Após a retração do coágulo e obtenção do soro, os tubos foram centrifugados. Em seguida, o soro foi separado por aspiração, dividido em alíquotas, mantido sob refrigeração, no máximo por seis horas e congelado a -20^{o}C, para posteriores análises. Os parâmetros laboratoriais avaliados foram: atividade sérica enzimática da AST, ALT e FA, bilirrubina total, bilirrubina direta e bilirrubina indireta.

As contagens de hemácias e de leucócitos foram obtidas em câmara de Neubauer. O volume globular foi obtido pela técnica do microhematócrito e a concentração de hemoglobina pelo método da cianometemoglobina (JAIN, 1993).

As análises bioquímicas no soro foram determinadas ou tiveram seus valores corrigidos para a temperatura de 37^{o}C; utilizando-se reagentes comerciais Labtest®. Para a leitura das reações foi utilizado analisador bioquímico automático (espectrofotômetro) marca Bioplus®, modelo Bio-2000 IL – A. e espectrofotômetro digital modelo 35D, marca Coleman®. A atividade da AST foi determinada pelo método ultra-violeta (UV) otimizado, sem piridoxal fosfato, a ALT pelo método cinético utilizando-se como substrato glutamil-p-nitroanilida, A FA pelo método de hidrólise da p-nitrofenil fosfato em meio acalino, as concentrações de bilirrubina total e direta pelo método colorimétrico direto (Jendrassik-Grof) e a bilirrubina indireta foi obtida pelo cálculo da diferença entre a bilirrubina total e direta.

O exame histopatológico foi realizado nos 60 animais, após a realização das aulas de patologia na qual foi obtido o laudo da necropsia e a coleta de fragmentos do fígado. Estes fragmentos foram fixados em formalina a 10% tamponada, clivados 24 horas após a coleta, quando o fixador for trocado. Após 24 horas, foram lavados em água corrente e transferidos para unicassetes, onde

permaneceram estocados em álcool a 70%. As amostras foram processadas de acordo com o método convencional de histopatologia. Os fragmentos foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina (LUNA, 1968).

3.3 Avaliações da acurácia dos testes bioquímicos

Para verificar a acurácia dos testes laboratoriais empregados foram determinados a sensibilidade, especificidade e o valor de precisão de cada um deles (FORATINNI, 1992; CORTES, 1993).

A comparação entre os resultados das provas bioquímicas com os achados histopatológicos permitiu o estabelecimento de quatro categorias de resultados: verdadeiramente positivos (VP) e verdadeiramente negativos (VN), falso positivos (FP) e falso negativos (FN). Os resultados verdadeiramente positivos e negativos foram aqueles que apresentaram concordância entre a histopatologia e as dosagens enzimáticas séricas. Falso positivos foram aqueles que apresentaram elevação no valor dos testes laboratoriais com histologia hepática normal e falso negativos, aqueles que mostraram alteração histopatológica sem elevação dos valores dos testes laboratoriais (FORATTINI, 1992; CORTES, 1993).

Na avaliação histopatológica, foram considerados como amostras positivas para a histopatologia, aqueles cortes histológicos de fígado que revelarem alterações degenerativas, inflamatórias, regenerativas e/ou neoplásicas. Foram coletados de cada animal uma amostra de fígado da região do lobo diafragmático. No caso de ocorrência de alterações macroscópicas, foi coletado um fragmento que envolvia a lesão.

3.4. Análise estatística

Para o estudo dos dados histológicos que produziram resposta de caráter qualitativo, representando uma resposta de natureza categórica (escores), foi utilizado o estudo da dispersão de freqüência χ^2. Os resultados obtidos com a bioquímica clínica foram submetidos ao teste de normalidade. Considerando o comportamento das variáveis, pode realizar a análise paramétrica utilizando-se o teste *t* para os dados emparelhados ou independentes. As prováveis associações entre as variáveis foram verificadas pelo coeficiente de *Spearman* para correlação entre as ordenações. Para a realização das análises foi utilizado o programa

Sistema de Análises Estatísticas - SAEG. O nível de significância adotado em todas as análises será de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

3.5. Eutanásia dos animais

Todos os animais participantes do projeto foram submetidos aos procedimentos de rotina dos animais das aulas práticas de patologia, ou seja, foram eutanasiados com agentes intravenosos do tipo Tiopental sódico na dose de 75 mg/kg/IV. O tiopental tem como vantagem ser um anestésico tradicional, de efeito rápido conhecido e previsível e também um potente depressor do SNC. No momento que a inconsciência foi confirmada, foi utilizado um bloqueador neuromuscular como o cloreto de potássio a 20%, causando apnéia e assistolia respectivamente, que culminou com a morte do animal.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 56 animais observados, 58,92% (33/56) eram fêmeas e 41,1% (23/56) eram machos. Ao exame clínico revelou-se uma freqüência respiratória média de 32 ± 28 mrm, uma freqüência cardíaca de 114 ± 9 bpm e temperatura retal de 38,12 ± 3,08 ºC. Na avaliação do sistema locomotor 10,7% (6/56) apresentavam alterações, sendo 89,3% (50/56) íntegros. Quanto ao sistema digestivo, 92,85% (52/56) dos animais não apresentaram alterações. Apenas 1,8% (1/56) apresentaram alteração no sistema nervoso, provavelmente cinomose, o que foi confirmado posteriormente. 3,5% (2/56) dos animais apresentavam algum comprometimento do sistema respiratório, sendo 96,5% (54/56) sem alterações. 16,1% (9/56) apresentavam arritmia cardíaca e 84,35% (45/56) nenhuma modificação quanto ao sistema circulatório. Na avaliação do sistema genito-urinário 28,58% (16/56) apresentavam modificações e 71,4% (40/56) íntegros. 25% (14/56) tinham danificações nos pelos e anexos, sendo 75% (32/56) sem alterações.

Na avaliação da mucosa oral, 8,9% (5/56) apresentavam-se hipercoradas, 19,6% (11/56) hipocoradas e 71,4 % (40/56) normocoradas. Quanto a mucosas

conjuntivas, 12,5% (7/56) estavam hipercoradas, 17,85% (10/56) hipocoradas e 69,6% (39/56) normocoradas.

Na avaliação hematológica, obteve-se os seguintes valores na série vermelha hematócrito (36,21% ± 3,54%), hemácias (4,57x10^6/L ± 0,38 x10^6/L), fibrinogênio (307,76 g/dL ± 141,42 g/dL), proteínas totais (8,69 g/dL ± 1,56 g/dL), VCM (83,91 fL ± 22,27 fL), CHCM (31 g/dL ± 14,89 g/dL). Com relação à serie branca, leucócitos totais (14.438/µL ± 4985/µL), no leucograma diferencial, os linfócitos (2.939/µL ± 3.215/µL), monócitos (940/µL ± 1411), eosinófilos (432/µL ± 81) segmentados (7868/µL ± 217/µL), bastonetes (874/µL ± 656/µL), metamielócitos (0/µL ± 0/µL), plaquetas (267308/µL ± 36770/µL).

Quanto ao eritrograma, 60,7% (34/56) dos animais apresentaram anemia, 2,9% (1/34) era anemia microcítica normocrômica, 5,9% (2/34) era anemia microcítica hipocrômica, 11,7% (4/34) era anemia normocítica normocrômica, 20,6% (7/34) era anemia normocítica hipocrômica, 41,2% (14/34) era anemia macrocítica hipocrômica, 20,6% (7/34) era anemia macrocítica normocrômica, 33,9% (19/56) dos animais apresentaram trombocitopenia e 10,7% (6/56) apresentaram trombocitose. Segundo MEYER et al. (1995), as anemias que no presente estudo esteviveram em maior prevalência, do tipo normocítica hipocrômica e tipo macrocítica normocrômica, são altamente responsivas e regenerativas. Ainda, a causa mais comum de problemas hemostáticos encontrada pelos veterinários é a trompocitonenia, o que é confirmado pela baixa contagem de plaquetas. Uma das causas da monocitose tem-se a inflamação e necrose tecidual, o mesmo foi confirmado em nossos resultados.

Porém, segundo NELSON & COUTO (2006), há poucas alterações nas células sanguíneas que sugerem doença hepatobiliar. A microcitose com normocromia ou discreta hipocromia é bastante comum em caninos. A maioria dos animais acometidos com distúrbios hepáticos não é anêmico.

Quanto ao leucograma, 3,6% (2/56) dos animais apresentaram leucopenia, 78,6% (44/56) contagem de leucócitos normais e 21,4% (12/56) leucocitose. Quanto aos linfócitos, 12,5% (7/56) apresentaram linfopenia, 75% (42/56) contagem de linfócitos normais e 12,5% (7/56) linfocitose. Quanto à contagem de neutrófilos totais, 1,8% (1/56) apresentaram neutropenia, 89,2% (50/56) contagem normal e 8,9% (5/56) neutrofilia, sendo que 7,1% (4/56) apresentaram desvio regenerativo à esquerda, e 55,3% (31/56) de desvio

degenerativo, 3,5% (2/56) tiveram a contagem de segmentados reduzida, 10,7% (6/56) tiveram a contagem de segmentados aumentada e 89,2% (50/56) teve contagem dentro do normal considerado. Quanto aos monócitos 12,5% (7/56) monocitopenia, 26,7% (15/56) monocitose e 60,7% (34/56) contagem de monócitos normais. Evidenciou-se que 10,7% (6/56) apresentaram eosinofilia, 25% (14/56) apresentaram eosinopenia e 64,2% (36/56) contagem normal de eosinófilos. Ainda segundo NELSON & COUTO (2006), são esperadas poucas mudanças no leucograma de caninos com distúrbios hepáticos, exceto quando um agente infeccioso está presente.

Dentre as alterações macroscópicas presentes, os seguintes resultados foram encontrados, com degeneração hepática, 42,8% (24/56), congestão hepática 25% (14/56), fibrose hepática 5,35% (3/56), hepatite 5,35% (3/56), palidez 3,6% (2/56), infarto 1,8% (1/56), possível neoplasia de ductos biliares 1,8% (1/56), e órgãos sem nenhuma alteração digna de nota um total de 8,93% (5/56).

A atividade sérica da AST obteve os valores de 26,99U/L ± 14,96, e se mostrou alterada em 19,64% (11/56) dos animais, estes com alterações macroscópicas evidentes. Já 80,36% (45/56) dos animais mostraram a AST dentro dos padrões de referência para o cão. A AST mostrou sensibilidade de 19,23%, especificidade de 75% na detecção de alteração patológica no fígado. O valor preditivo positivo do teste foi de 90,1% e o valor preditivo negativo foi de 6,67 % (Tabela 1).

A enzima AST está presente em uma ampla variedade de tecidos, mas as maiores quantidades estão encontradas nas células do músculo cardíaco e esquelético e no fígado. No diagnóstico das doenças hepáticas, a determinação sérica da ALT é preferível (Bush, 2004).

Já a ALT apresentou os valores de atividade sérica de 33,9U/L ± 16,4. Não estando alterada em nenhum animal com alterações macroscópicas no fígado; 91,1% (51/56) dos animais que apresentaram alterações macroscópicas, não tiveram alterações nos resultados bioquímicos da ALT.

A ALT mostrou sensibilidade de 0% (zero) e especificidade de 100% na detecção de alteração patológica no fígado. O valor preditivo positivo do teste foi de 0% (zero) e o valor de preditivo negativo foi de 5,35% (Tabela 1).

A ALT estará aumentada no soro quando houver degeneração ou necrose do fígado; nestes casos ocorre extravasamento da enzima do citoplasma do

hepatócito para o sangue. MEYER et al. (1992) acrescentaram que a ALT estará aumentada no soro também por processos que alterem a permeabilidade de membrana dos hepatócitos, como agressão por toxinas e hipóxia.

Tabela 1 – Números de amostras com e sem alterações bioquímicas e histológicas para o cálculo da acurácia dos testes AST e ALT

	AST			ALT		
Padrão Resposta	Alterada	Normal	Total	Alterada	Normal	Total
Com alteração microscópica	10	42	52	0	53	53
Sem alteração microscópica	1	3	4	0	3	3
Total	11	45	56	0	56	56

A FA apresentou a atividade sérica média de 36,7U/L ± 26,5. Quanto a animais com alterações macroscópicas e bioquímicas, foi observado que 10,7% (6/56) se encaixavam nessa descrição. Animais somente com alterações nos valores bioquímicos foram de 3,58% (2/56); Já aqueles sem alterações tanto macroscópicas quanto bioquímicas foram um total de 71,4% (40/56) e com FA normal e alteração macroscópica foi de 14,3% (8/56).

A Fosfatase Alcalina (FA) mostrou sensibilidade de 18,86%, e especificidade de 100% na detecção de alteração patológica no fígado. O valor preditivo positivo do teste foi de 100% e o valor preditivo negativo foi de 6,52% (Tabela 2).

Como a variação dos níveis de fosfatase alcalina no soro (FAS) é relativamente estreita, esta enzima tem importante papel como indicador de mau-funcionamento hepático em cães. A fosfatase alcalina é uma enzima de indução, ou seja, para que sua atividade sérica esteja aumentada, é necessário que haja um aumento da sua produção tecidual. Isto ocorre após estímulos como estase biliar e

indução por certas drogas. Necrose hepática aguda leva a aumentos mínimos nos valores de fosfatase alcalina, enquanto que a obstrução biliar intra ou extra-hepática leva a aumentos bastante significativos (MILNE, 1985).

A bilirrubina total teve os seguintes médios de 0,5mg/dl ± 0,8, a direta de 0,3mg/dl ± 0,6, e a indireta de 0,2mg/dl ± 0,3. Quanto à bilirrubina total, 14,3% (8/560) dos animais tiveram seu resultado alterado se comparado com os valores de referência, já 87,5% (48/56) tiveram resultados bioquímicos normais, 3,6% (2/56) tinham alterações macroscópicas e 10,7% (6/56) não às tinham.

A Bilirrubina mostrou sensibilidade de 72,72%, especificidade de 100% na detecção de alteração patológica no fígado. O valor preditivo positivo do teste foi de 100% e o valor preditivo negativo foi de 93,75% (Tabela 2).

A dosagem da bilirrubina indica o grau de capacidade excretora o fígado. O aumento da bilirrubina direta no soro indica colestase, mas não é especifico, no entanto sua elevação sangüínea vai produzir bilirrubinúria que em quase todas as espécies, exceto no cão, é diagnóstico de colestase. Elevações séricas da bilirrubina indireta, livre ou não-conjugada são observadas na hemólise, enfermidade hepática e colestase é a principal causa de icterícia (KERR, 2003).

Tabela 2 – Números de amostras com e sem alterações bioquímicas e histológicas para o cálculo da acurácia dos testes FA e bilirrubina

	FA			**Bilirrubina**		
Padrão Resposta	Alterada	Normal	Total	Alterada	Normal	Total
Com alteração microscópica	10	43	53	8	3	11
Sem alteração microscópica	0	3	3	0	45	45
Total	10	46	56	8	48	56

De acordo com nossa metodologia, foi adotado um nível de significância de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$), então só serão descritos os resultados que estão

dentro dessa margem. Analisamos as seguintes variáveis: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total (BIT), bilirrubina direta (BID), bilirrubina indireta (BII), degeneração hepática (DEG), necrose hepática (NEC), fibrose hepática (FIB), hepatite (INF), hiperplasia de ducto biliar (HIP), arquitetura histologia hepática (ARH), macroscopia do fígado (MAF), hemorragia hepática (HEP), número de hemácias (HEM), hematócrito (HTT), hemoglobina (HBB), VCM, CHC (CHCM), número de leucócitos (LEU), linfócitos (LIN), monócitos (MON), eosinófilos (EOS), neutrófilos segmentados (SEG), neutrófilos jovens (BAS), número de plaquetas (PLQ), fibrinogênio (FIG), proteínas totais (PPT), freqüência respiratória (FR), freqüência cardíaca (FC), temperatura (TEM), sistema locomotor (SN), sistema digestório (SD), sistema nervoso (SN), sistema respiratório (SR), sistema circulatório (SC), pele a anexos (PA), sexo (SEX), pesquisa de hematozoários (PHM), sistema geniturinário (SGU), mucosa oral (MO) e mucosa conjuntiva (MC).

Foram então analisadas e relacionadas enzimas do perfil bioquímico hepático, possíveis alterações histológicas do fígado (alterações histopatológicas), perfil hematológico (células brancas e vermelhas), além dos sinais clínicos e possíveis alterações presentes quando realizado o exame físico (quadro 1).

QUADRO 1 – Correlações de *Spearman* que apresentaram-se significativas (p<0,05)

Variável	Variável com correlação significativa
AST	ALT, FA, BIT, BID, BII, COM, HEM, CHC, MON, EOS, BAS, FIB, PPT, FR, SD, PA
ALT	AST, FA, BIT, BII, CHC, MON, EOS, BAS, FR, SD SGU, PA
FA	AST, ALT, BIT, BID, ARH, MAF, CHC, LIN, EOS, BAS
BIT	AST, ALT, FA, BID, BII, MAF, LEU, LIN, MC
BID	AST, ALT, FA, BIT, BII, INF, HIP, MAF, MC
BI	AST, ALT, BIT, LEU, LIN
DEG	LEU, LINF, SEG
NEC	ARH, LEU, PLQ, MO
FIB	ARH, SGU, MO, MC
INF	BID, COM, LEU, FC,
HIP	BID, ARH, MAF, LIN, PPT,
HER	HEM, PPT, PHM

COM	AST, INF, LIN, MON, FIB, PPT, PHM
ARH	FA, NEC, FIB, HIP, MAF, MON, BAS, FC, MO
MAF	FA, BIT, BID, ARH, MON, SD
HEM	AST, HER, HTT, HBB, VCM, MON, EOS, BAS PLQ
HTT	HEM, HBB, SEG, BAS, PLQ, SD,
HBB	HEM, HTT, CHC
VCM	HEM, MON, FIB, SEX
CHC	AST, ALT, FA, MAF, HBB, SD, PA
LEU	BIT, BII, DEG, NEC, INF, LIN, MON, SEG, FIG, SC
LIN	FA, BIT, BII, DEG, HIP, COM LEU, EOS, PHM, SC, SGU
MON	AST, ALT, FA, COM, ARH, HEM, VCM, LEU, BAS, FIB, FR, SL
EOS	AST, ALT, FA, HEM, LINF, BAS
SEG	DEG, HTT, LEU, PLQ, SD, SN
BAS	AST, ALT, FA, MAF, HEM, LEU, EOS, FR, SD, SC, PA
PLQ	AST, ALT, FA, ARH, HEM, HTT, LIN, EOS, FR, SD, SC, PA
FIG	AST, COM, LEU, MON, EOS, PPT, MO
PTT	AST, INF, HIP, HEP, COM, FIG
FR	AST, ALT, MON, PLQ
FC	INF, ARH, SD, MO
TEM	BAS
PHN	HEP, COM, LIN, SGU
SL	MON, SN
SD	AST, ALT, MAF, HTT, VCM, BAS, FC, SN, PA
SN	SEG, SL, SD
SR	LEU, SEG
SC	LIN, BAS
SGU	FA, INF, LIN, PHM
PA	AST, ALT, CHC, BAS, SD
MO	NEC, FIB, ARH, MON, FIG, FC, MO, MC
MC	BIT, BII, FIB, PA, SEX
SEX	VCM, MC

Segundo COLES (1986), a dosagem de alanina aminotransferase (ALT) é de valor para a detecção de doenças hepáticas em cães. Esta enzima está presente

em grande quantidade no citoplasma dos hepatócitos. A pequena quantidade existente no soro é decorrente da substituição fisiológica de algumas células do tecido hepático, com a subseqüente liberação da enzima. O aumento da atividade sérica reflete anormalidade das células hepáticas. A ALT estará aumentada no soro quando houver degeneração ou necrose do fígado; nestes casos ocorre extravasamento da enzima do citoplasma do hepatócito para o sangue. MEYER et al. (1992) acrescentaram que a ALT estará aumentada no soro também por processos que alterem a permeabilidade de membrana dos hepatócitos, como agressão por toxinas e hipóxia. O que foi dito acima, não foi visto em nosso experimento, já que tanto a AST, quanto a ALT, não tiveram correlação significativa com degeneração e necrose.

A fosfatase alcalina é ligada à membrana celular e pode ser encontrada em uma variedade de tecidos, sendo que cada tecido produz uma diferente isoenzima, separáveis por eletroforese. Com uma meia vida maior que as demais, as isoenzimas originárias do sistema hepatobiliar e dos ossos são as únicas de importância diagnóstica. Geralmente os aumentos de atividade sérica são de origem hepatobiliar, com exceção de animais em crescimento ou com patologias ósseas (MILNE, 1985; MEYER et al., 1992a). A fosfatase alcalina é uma enzima de indução, ou seja, para que sua atividade sérica esteja aumentada, é necessário que haja um aumento da sua produção tecidual. Isto ocorre após estímulos como estase biliar e indução por certas drogas. Necrose hepática aguda leva a aumentos mínimos nos valores de fosfatase alcalina, enquanto que a obstrução biliar intra ou extra-hepática leva a aumentos bastante significativos (MILNE, 1985; COLES, 1986b). Sobre o que foi relatado sobre a FA, logo acima, nosso experimento concordou, já que existe correlação significativa entre FA, Bilirrubina total e direta, e estas estão ligadas a distúrbios hepatobiliares.

5 CONCLUSÃO

Foi possível concluir que os testes fosfatase alcalina (FA) e alanina aminotransferase (ALT) apresentaram uma alta especificidade e uma baixa sensibilidade, indicando que quando não ocorrem alterações em seus valores, provavelmente não estará presente uma alteração hepática. Já a bilirrubina apresentou uma acurácia superior e seus resultados estavam correlacionados a distúrbios hepatobiliares neste estudo. Portanto, como nenhum teste é 100% eficaz,

o clínico deve lançar mão preferencialmente do conjunto de enzimas FA e ALT e se possível associar a dosagem de bilirrubina na pesquisa de alterações hepáticas em cães.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, V. N. Veterinary Gastroenterology. Liver and Biliary tract. 2. ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. 873 p.

BUSH, B. M. Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais, São Paulo: Roca, 2004. 160p.

COLES, E. H. Veterinary clinical pathology. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986b. Cap. 7: Liver function, p. 129-151.

CORTES, J. A. Epidemiologia conceitos e princípios fundamentais. São Paulo: Varela, 1993. 227p.

FORATTINI, O. P. Ecologia epidemiologia e sociedade. São Paulo: Artes Médicas, 1992. 529p.

GOMES, A. Testes enzimáticos hepáticos na prática da medicina do trabalho. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho, Belo Horizonte**, v.2, n.1, p.30-35, 2004.

GONZALEZ, F. H. D.; CARVALHO, V.; MOLLER, V. A.; DUARTE, F. R. Perfil bioquímico sangüineo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**. **UFRGS,** Porto Alegre, n.29, p.1-6, 2001.

JAIN, N.C. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417p.

KERR, G. M. Exames laboratoriais em Medicina Veterinária. 2.ed. São Paulo: Roca. 2003, 434 p.

LUNA, L. G. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.

MEYER, D. J., COLES, E. H., RICH, L. J Veterinary laboratory medicine. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992a. Cap. 5: Hepatic test abnormalities, p. 55-70.

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and diagnosis. 3.ed. Cambridge: Elsevier Saunders, 2004, 351p.

MILNE, E. M. The diagnostic value of alkaline phophatase in canine medicine: a review. **Journal Small Animal Practice**, v. 26, p. 267-278, 1985.

NELSON, R. W.; COUTO, C, G. Medicina interna de pequenos animais. 3.ed. Elsevier Editora, 2006, 1324p.

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Spiranthera odoratissima* A. ST. HIL.

Beatriz Abdallah Chaibub[1], José Realino de Paula[1*].
[1] LPPN- Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brasil.
E-mail: pjrpaula@gmail.com
Palavras-chaves: Concentração Inibitória Mínima, Plantas Medicinais, Rutaceae

INTRODUÇÃO

A família Rutaceae possui aproximadamente 150 gêneros e 1500 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas, principalmente América tropical, Sul da África e Austrália (PIRANI, 1982). Devido à presença de óleos essenciais, os membros dessa família são fortemente aromáticos. Economicamente essa família se destaca como fonte de frutas cítricas e plantas ornamentais (PERVEEN; QAISER, 2005).

A *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil., conhecida popularmente como manacá, pertence a família Rutaceae. Esse subarbusto é encontrado na região de Cerrado e utilizado popularmente como depurativo do sangue, nas afecções renais e hepáticas (chá das folhas) (SALLES; REIS; ZURLO, 1977), para dores de estômago, dores de cabeça, dores musculares, disfunções hepáticas e para estimular o apetite (chá da raiz) (SILVA, 1998). Em Goiás, as raízes da *S. odoratissima* são utilizadas na forma de chá ou tintura para o tratamento de reumatismo (PAULA et al., 1999; TRESVENZOL et al., 2006).

Estudos prévios mostraram atividade antiinflamatória e analgésica em camundongos para a fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *S. odoratissima* (MATOS et al., 2003) e ação depressora geral da atividade motora e queda do número de contorções para o extrato etanólico bruto das raízes. Esses resultados indicam a presença de compostos com propriedades analgésicas, intiinflamatórias e depressoras do SNC, o que dá suporte ao uso popular dessa planta no tratamento do reumatismo (MATOS et al., 2004).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química do óleo essencial e a atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato etanólico bruto da *S. odoratissima* contra bactérias Gram positivas esporuladas e não esporuladas, bactérias Gram negativas e contra o fungo *Candida albicans.*

3 METODOLOGIA

3.1 Material botânico

As folhas de *S. odoratissima* foram coletadas na região de Senador Canedo – GO (16º45'45,2''sul, 49º07'06,8''oeste, a 762m de altitude), em dezembro de 2007. O material botânico foi identificado pelo Profº. Dr. José Realino de Paula da Universidade Federal de Goiás e a exsicata depositada no herbário desta instituição sob registro UFG/30275.

As folhas foram dessecadas à temperatura ambiente e trituradas em moinho de facas.

3.2 Preparação do óleo essencial e do extrato etanólico bruto

Para a extração do óleo essencial, 150 g das folhas pulverizada foram submetidas à hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por 3 horas. Após a extração o óleo foi acondicionado em frasco âmbar e guardado em freezer para posterior análise.

O extrato etanólico bruto foi obtido por maceração em etanol 95% na proporção de 1:5 e concentrado em rotaevaporador a 40˚C.

3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

3.3.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados como cepas padrões para o teste de atividade antimicrobiana foram os seguintes: *Bacillus cereus* ATCC 14576, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Micrococcus roseus* ATCC 1740, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12229,

Serratia marcences ATCC 14756, *Enterobacter cloacae* HMA/FTA 502, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27483, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* NTC 2010. Os microrganismos estavam armazenados em ágar inclinado sob refrigeração (4ºC).

Para a ativação das respectivas culturas procedeu-se o repique em caldo Casoy, incubando por 24 horas a 37ºC. Após a turvação, foi feito um novo repique em ágar Casoy inclinado e os tubos incubados a 37ºC por 24 horas. Esses inóculos foram usados para a preparação da suspensão bacteriana em solução salina.

3.3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método da diluição em ágar conforme recomendação do NCCLS 2003.

Para a preparação das placas, 500 mg do extrato etanólico bruto e do óleo essencial foram solubilizados em 2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) e submetidos a diluições seriadas 1:2 por mais oito tubos, de modo que se obteve, após a adição de 19 mL de ágar Muller-Hinton a 50ºC, placas com concentração variando de 12,5 mg/ml a 0,098 mg/ml para extrato etanólico bruto e óleo essencial. Placa contendo DMSO e placa somente com o meio de cultura, preparadas nas mesmas condições, foram utilizadas como controles.

As suspensões bacterianas preparadas com as colônias das 15 cepas selecionadas foram preparadas em solução salina estéril 0,9%. A turvação das suspensões foi ajustada de acordo com o padrão da escala de 0,5 McFarland e os inóculos microbianos aplicados com o auxílio do inoculador de Steers (STEERS; FOLTZ; GRAAVES, 1959). Em seguida, as placas foram incubadas a 37˚C por 24 horas. Foi considerada CIM a menor concentração do extrato etanólico bruto e do óleo essencial que inibiu o desenvolvimento das bactérias e do fungo.

3.4 Análise da composição química do óleo essencial

O óleo essencial foi submetido à análise cromatográfica, em fase gasosa, acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) em aparelho SHIMADZU QP5050A. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida (CBP–5; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), fluxo 1 mL/min de Hélio, como gás de arraste, aquecimento com temperatura programada (60 ^{0}C /2min; 3 ^{0}C min^{-1}/240 ^{0}C; 10^{0}C min^{-1}/280 ^{0}C; 208^{0}C/10min) e energia de ionização de 70 eV. O volume de injeção de 1 µL da amostra diluída em CH_2Cl_2 na proporção de 1:5. Os componentes químicos do óleo essencial foram identificados por comparação dos espectros de massa e índices de retenção com os descritos na literatura para os componentes mais comuns de óleos essenciais (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados através da co-injeção de uma mistura de hidrocarbonetos C9 – C22 e com a utilização da equação de Van Den Dool e Kratz (1963).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento

O rendimento do óleo essencial das folhas de *Spiranthera odoratissima* foi de 2,3 % e o do extrato etanólico bruto de 32,5%.

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

O óleo essencial das folhas de *S. odoratissima* apresentou CIM de 0,195 a 3,125 mg/ml para as bactérias Gram positivas; CIM variando de 6,25 a 12,5 mg/ml para as bactérias Gram negativas e CIM de 1,562 mg/ml para o fungo *Candida albicans* (Tabela 1).

O extrato etanólico bruto das folhas de *S. odoratissima* inibiu o crescimento do *S. epidermidis* na concentração de 0,098 mg/ml; do *M. roseus* na concentração de 0,391 mg/ml; do *B. cereus* e da *C. albicans* na concentração de 0,781 mg/ml; do *M. luteus* , do *B. subtilis,* da *P. aeruginosa* (27483) e da *P. aeruginosa* (9027) na concentração de 1,562 mg/ml. Os demais microorganismos foram inibidos na concentração de 3,125 a 12,5 mg/ml (Tabela 1).

Observou-se que o óleo essencial de *S. odoratissima* mostrou melhor atividade antimicrobiana contra *M. roseus* com CIM de 0,195 mg/mL, enquanto o extrato etanólico bruto foi mais ativo contra *S. epidermides* (CIM 0,098 mg/mL) e *M. roseus* (CIM de 0,391 mg/mL). Pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana foi verificada para bactérias Gram negativas. A atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto foi superior a do óleo essencial tanto para bactérias Gram negativas, Gram positivas e o fungo *C. albicans.*

Tabela 1: Concentração inibitória mínima em mg/mL do óleo essencial e extrato etanólico bruto das folhas de *S. odoratissima*.

MICROORGANSIMOS	ÓLEO ESSENCIAL	EXTRATO BRUTO
Bactérias Gram positivas		
Staphylococcus aureus subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 6538)	3,125	3,125
Staphylococcus aureus subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 25923)	3,125	3,125
Staphylococcus epidermidis (Winslow and Winslow) Evans (ATCC 12228)	3,125	0,098
Micrococcus roseus (1740)	0,195	0,391
Micrococcus luteus (ATCC 9341)	1,562	1,562
Bactérias Gram positivas esporuladas		
Bacillus cereus Frankland and Frankland (ATCC 14579)	3,125	0,781
Bacillus subtilis subsp. *spizizenii* Nakamura et al.(ATCC 6633)	3,125	1,562
Bactérias Gram negativas		
Enterobacter cloacae (HMA/FT 502)	12,5	3,125
Enterobacter aerogenes Hormaeche and Edwards (ATCC 13048)	12,5	3,125
Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC 11229)	12,5	3,125
Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC 8739)	12,5	12,5
Pseudomonas aeruginosa (27483)	6,25	1,562
Pseudomonas aeruginosa (Schroeter) Migula (ATCC 9027)	6,25	1,562
Serratia marcescens Bizio (ATCC 14756)	6,25	3,125
Fungo		
Candida albicans (NTC 2010)	1,562	0,781

A atividade antimicrobiana também foi avaliada em outras espécies da família Rutaceae. Novais e colaboradores (2003) verificaram que os extratos de *Esenbeckia grandiflora* e *Galipea simplicifolia* apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* com halos de inibição de 10 mm e 16 mm respectivamente. Guerreiro et al. (2005) concluíram que a fração hexânica obtido do caule de *Pilocarpus riedelianus* mostrou atividade contra *Candida krusei* com halo de 20 mm, contra *M. roseus*, halo de 16 mm, contra *B. subtilis*, halo de 13 mm e contra *S. aureus* , halo de 12 mm. Moola e colaboradores (2007) ao avaliaram os extratos de 17 espécies de *Agathosma e* verificaram que todos os extratos tiveram atividade para os microorganismos testados, com destaque para *Agathosma ovata* contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* e *Agathosma arida* contra *Candida albicans*. Mesquita e colaboradores (2008) testaram os extratos, frações e substâncias puras isoladas das folhas de *Murraya paniculata* contra *S. aureus* e *E. coli* e verificaram que o extrato hexânico bruto e a fração diclorometano apresentaram atividade contra *S. aureus*. Após o isolamento apenas a cumarina (hidrato de meranzina) mostrou fraca atividade (halo de inibição de 11 mm - 1000µg/disco) contra *S. aureus*.

4.3 Composição do óleo essencial

Na análise da composição química do óleo essencial das folhas de *S. odoratissima* foram detectados 28 compostos, sendo 25 identificados (95,96%). Verificou-se que 73,84% desses compostos são hidrocarbonetos sesquiterpênicos e 7,13% sesquiterpênios oxigenados. Os componentes majoritários foram: E-cariofileno (20,64%), γ-muuroleno (17,7%), biciclogermacreno (14,73%), δ-cadineno (13,40%), γ-cadineno (4,59%) e cubenol (3,12%). Os resultados da análise do óleo essencial das folhas de *S. odoratissima* com os respectivos teores de cada componente encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *S. odoratissima.*

CONSTITUINTE	IR	PORCENTAGEM (%)
δ-elemeno	1333	0,93
α-cubebeno	1346	1,09
α-copaeno	1372	2,05
β-cubebeno	1386	0,49
β-elemeno	1393	0,61
E-cariofileno	1416	20,64
β-copaeno	1425	0,60
α-trans-bergamoteno	1431	0,53
aromadendreno	1435	1,20
α-humuleno	1449	2,79
9-epi-E-cariofileno	1456	1,35
trans-cadina-1(6),4-dieno	1469	0,47
γ-gurjuneno	1472	2,91
γ-muuroleno	1477	17,7
β-selineno	1482	0,85
trans-cadina-1(6),4-dieno	1487	0,97
biciclogermacreno	1492	14,73
α-muuroleno	1495	2,02
γ-cadineno	1509	4,59
δ-cadineno	1519	13,4
trans-cadina-1,4-dieno	1527	0,34
α-cadineno	1533	0,55
β-germacreno	1552	1,35
epatulenol	1572	0,68
não identificado	1623	0,73
não identificado	1637	2,97

não identificado	1645	0,36
cubenol	1649	3,12
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		73,84
Sesquiterpenos oxigenados		7,13
Outros		19,03
Total		100

IR: Índice de Retenção

A análise do óleo essencial de outras espécies da família Rutaceae identificou componentes majoritários que diferem dos detectados para *S. odoratissima*. A composição química do óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum syncarpum* foi analisada em duas épocas do ano; com predomínio de limoneno (47,3%), α-felandreno (14,2%) e mirceno (10,8%) para as coletas de fevereiro; limoneno (23,1%), β-elemeno (12,6%) e espatulenol (11,4%) para as coletas de julho (VIEIRA et al., 2009). Santos e colaboradores (2008) detectaram sabineno (35,4%) e mirceno (34,1%) como os principais componentes do óleo essencial das folhas de *Triphasia trifolia*. Dentre os componentes majoritários encontrados para *Haplophyllum tuberculatum* estam β-felandreno (23,3%), limoneno (12,6%) e (Z)-β-ocimeno (12,3%) (AL-BURTAMANI et al., 2005). A presença de E-cariofileno e biciclogermacreno foi descrita em diversas espécies de *Piper*, da família Piperaceae (CYSNE et al., 2005; MESQUITA et al., 2005).

5 CONCLUSÃO

A realização desse trabalho permitiu analisar a atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato bruto das folhas de *S. odoratissima*, a partir da obtenção da concentração inibitória mínima contra os diversos microorganismos testados. A melhor atividade antimicrobiana foi encontrada para o extrato etanólico bruto, com melhor atividade contra bactérias Gram-positivas e o fungo *C. albicans*.

As folhas de *S. odoratissima* se mostraram boa fonte de óleo essencial e o E-cariofileno, γ-muuroleno, biciclogermacreno e δ-cadineno foram os compostos majoritários. Esses resultados justificam estudos futuros advindos dessa planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectrometry**. 4th ed. Carol Stream, Illnois – USA: Allured Publishing Corporation, 2007.

AL-BURTAMANI, S. K. S. et al. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. **Journal of Ethnopharmacology**, n.96, p. 107-112, 2005.

CYSNE, J. B. et al. Leaf essencial oils of four *Piper* species from the state of Ceará-Northeast of Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.16, n.6B, p.1378-1381, 2005.

GUERREIRO, G. et al. Sesquiterpenos do caule de *Pilocarpus riedelianus*. **Química Nova**, v.28, n.6, p.986-990, 2005.

MATOS, L. G. et al. Atividade analgésica e/ou antiinflamatória da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (manacá). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, supl., p.15-16, 2003.

MATOS, L. G. et al. Analgesic and anti-inflamatory activity of the ethanolic extract from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (manacá) roots. **Phytothetapy Research**, n.18, p.963-966, 2004.

MESQUITA, J. M. O. et al. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, p.6-12, 2005.

MESQUITA, S. G. et al. Constituintes químicos das folhas de Murraya paniculata (Rutaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.563-568, 2008.

MOOLA, A. et al. Biological activity and toxicity profile of 17 *Agasthoma* (Rutaceae) species. **South African Journal of Botany**, v.73, p.588-592, 2007.

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards. In: **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standarts, Publication M6-T, 2003.

NOVAIS, T. S. et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v.14, supl., p.05-08, 2003.

PAULA, J. R. et al. Contribuição ao Estudo Farmacognóstico de *Spiranthera odoratissima A*. St. Hil. IV Jornada Paulista de Plantas Medicinais, **Livro de Resumos** p. 84. UNAERP, Ribeirão Preto, 12 a 15 de outubro de 1999.

PERVEEN, A.; QAISER, M. Pollen Flora of Pakistan -Xlv. Rutaceae. **Pak. J. Bot**., v. 37, n.3, p. 495-501, 2005.

PIRANI, J. R. **A ordem Rutales na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. 1982. 244f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

SALLES, A. H.; REIS G. M. C.; ZURLO, M. A. **Horto Medicinal do Cerrado**. Brasília, 1977.

SANTOS, R. P. et al. Composição química e atividade biológica das folhas e frutos de *Triphasia trifólia*. **Química Nova**, vol. 31, n.1, p.53-58, 2008.

SILVA, S. R. **Plantas do Cerrado.** Brasília: FUNATURA, 1998.

STEERS, E.; FOLTZ, E. L; GRAAVES, V. S. An inocula replicating apparatus for continue testing of bacterial susceptibility to antibiotics. **Antibiot Chemother**, v.9, p. 307-311, 1959.

TRESVENZOL, L. M. et al. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, p.23-28, 2006.

VAN DEN DOLL, H.; KRATZ, P. D. J. A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas – liquid partition chromatography. **Journal Chromatography**, v.11, p.463-471, 1963.

VIEIRA, M. G. S. et al. Constituintes químicos voláteis das folhas e galhos de *Zanthoxylum syncarpum* Tull. **Química Nova**, vol. 32, n.2, p.391-394, 2009.

Campos Vetoriais Reversíveis no Plano

Kamila da Silva Andrade[1] **e João C. Medrado**[2] Instituto de Matemática e Estatística–UFG [1]ksandrade.mat@gmail.com e [2]medrado@mat.ufg.br

1 Introdução

Apresentamos aqui os objetivos, a metodologia e os resultados principais.

Consideremos no espaço de campos vetoriais definidos em $\boldsymbol{R}^2$ o conjunto Ω composto pelos germes de campos de vetores C^r-reversíveis em 0 de $\boldsymbol{R}^2$ com a topologia C^r para $r > 3$.

Dizemos que o campo de vetores X é $\phi-$reversível do tipo $(2, 1)$ se

$$D\phi(p).X(p) = -X(\phi(p))$$

para p em $\boldsymbol{R}^2, 0$, onde ϕ é uma involução e $\dim(\mathrm{Fix}(\phi)) = 1$.

Estudamos bifurcações genéricas de campos vetoriais reversíveis definidos no plano, ao redor de um ponto singular simétrico.

A técnica do estudo consiste em primeiro mudarmos as coordenadas ao redor da singularidade simétrica e então estudamos o contato entre as órbitas do campo vetorial e a subvariedade do $\boldsymbol{R}^2$ dada pelos pontos fixos da involução ϕ. Descrevemos o comportamento das singularidades estabelecendo uma relação entre estas e as que se originam do contato entre o campo de vetores e a curva simétrica original. A principal razão de usar esta técnica é que a teoria de contatos fornece poderosas ferramentas geométricas. Observamos ainda que este método também pode ser utilizado para campos vetoriais definidos em variedades em dimensões mais altas.

Apresentamos todos os diferentes tipos topológicos de singularidades simétricas no plano de campos de vetores de codimensão 0, 1 e 2, suas formas normais, seus respectivos desdobramentos e portanto, uma completa lista de modelos topológicos para todas famílias a dois parâmetros de campos vetoriais reversíveis.

Apresentamos ainda os retratos de fase destes campos em seus diagramas de bifurcação e demonstraremos os teoremas:

Teorema 1 (Singularidades Genéricas) *As formas normais de campos de vetores C^0-estruturalmente estáveis em Ω são:*

1. $X_{00}(x, y) = (0, 1/2)$;
2. $X_{01}(x, y) = (y, x/2)$;
3. $X_{02}(x, y) = (y, -x/2)$.

Teorema 2 (Classificação de Singularidades de Codimensão 1) *Em um espaço de famílias de 1-parâmetro de campos de vetores em Ω, um conjunto denso é formado por famílias tais que suas formas normais são:*

1. *As formas normais de campos de vetores listadas no Teorema 1;*
2. $X_\lambda(x,y) = (y, 1/2(\lambda + x^2))$;
3. $X_\lambda(x,y) = (\epsilon xy, 1/2(2\epsilon y^2 + x + \lambda))$ *com* $\epsilon = \pm 1$;
4. $X_\lambda(x,y) = (xy, 1/2(-y^2 + x + \lambda))$;
5. $X_\lambda(x,y) = (xy + y^3, 1/2(-x + y^2 + \lambda))$.

Teorema 3 (Classificação de singularidades de codimensão 2) *Em um espaço de famílias de 2-parâmetros de campos de vetores em Ω, um conjunto denso é formado por famílias tais que suas formas normais são:*

1. *As formas normais de campos de vetores listadas no Teorema 2;*
2. *Dove's Tail:* $X_{\alpha\beta}(x,y) = (y, \frac{1}{2}[bx^3 + \alpha x^2 + \beta x])$ *com* $b = \pm 1$;
3. *Sela-nó:* $X_{\alpha\beta}(x,y) = (-xy, \frac{1}{2}[-x + a(y^2 - x + \alpha)^2] + \beta)$ *com* $a = \pm 1$;
4. *Hopf:*

$$X_{\alpha\beta}(x,y) = (\beta y - y^3 + xy[\alpha + x^2 + (y^2 - \beta)^2], \frac{1}{2}[x + (y^2 - \beta)[\alpha + x^2 + (y^2 - \beta)^2]]);$$

5. *Nó-degenerado:* $X_{\alpha\beta}(x,y) = (xy + \alpha y^3, \frac{1}{2}[x + y^2 + \beta])$;
6. *Sela tangente:* $X_{\alpha\beta}(x,y) = (xy, \frac{1}{2}[\alpha x - y^2 + ax^2 + \beta])$ *com* $a = \pm 1$;
7. *Nó tangente:* $X_{\alpha\beta}(x,y) = (axy, \frac{1}{2}[\alpha x + by^2 \pm 3x^2 + \beta])$ *com* $a = 1$ *e* $b = 3$ *ou* $a = 3$ *e* $b = 1$.

2 Campos Vetoriais Reversíveis

Definição 4 *Dois campos de vetores* X_1 *e* X_2 *em* Ω *são* C^0*–equivalentes se existe um homeomorfismo que aplica as trajetórias de* X_1 *nas trajetórias de* X_2.

Definição 5 *Dizemos que o campo de vetores X é* $\phi-$*reversível se*

$$D\phi(p).X(p) = -X(\phi(p))$$

para p em $\mathbf{R}^2, 0$, *onde* ϕ *é uma involução, isto é,* $\phi \circ \phi = Id$.

Vamos trabalhar com as involuções que são germes de $C^\infty-$ difeomorfismos (em 0) $\phi : \boldsymbol{R}^2, 0 \to \boldsymbol{R}^2, 0$, satisfazendo

$$\phi \circ \phi = Id \text{ e } \det(D\phi(0)) = -1.$$

O conjunto $S = \text{Fix}\{\phi\}$ é uma curva integrável em $\boldsymbol{R}^2, 0$.

Usando o Teorema de Montgomery–Bochner, fixamos coordenadas em $\boldsymbol{R}^2, 0$ de tal forma que $\phi(x, y) = (x, -y)$. Denotamos por Ω o espaço dos germes de campos de vetores $\phi-$reversíveis em $\boldsymbol{R}^2, 0$ com topologia C^r para $r > 3$. Nestas coordenadas temos que $S = \{y = 0\}$.

Dado $X \in \Omega$ temos que todo ponto singular de X em S (conjunto fixado por ϕ) é chamado de singularidade simétrica (ou simplesmente singularidade) de X; caso contrário é uma singularidade assimétrica. Qualquer outro ponto em $\boldsymbol{R}^2, 0$ é um ponto regular de X.

Consideremos a seguir (u, v) um sistema de coordenadas em $\boldsymbol{R}^2, 0$, o conjunto $M = \{(u, v) \in \boldsymbol{R}^2, 0; v \geq 0\}$ e o conjunto χ de todos os C^r-campos de vetores em M dotado com topologia C^r e $r > 3$. Denotamos o bordo de M por S.

Definição 6 *Dois campos de vetores F_1 e F_2 (definidos em M), em χ são ditos C^0–equivalentes se existe um homeomorfismo em $\{v \geq 0\}$, (necessariamente preservando o bordo $\{v = 0\}$) que aplica trajetórias de F_1 em trajetórias de F_2.*

Definição 7 *Um ponto $p \in S$ é uma S–singularidade de $F \in \chi$ se $F(p)$ é tangente a S em p.*

Seja $h : \boldsymbol{R}^2, 0 \to \boldsymbol{R}$ definida por $h(u, v) = v$. Nestas coordenadas o conjunto $S-$singular de F em χ é determinado pelas equações:

$$h = 0 \text{ e } Fh = \nabla h.F = 0.$$

Observamos que $F^n h = FF^{n-1}h = \nabla(F^{n-1}h).F$.

Definição 8 *Dizemos que uma singularidade $p \in S$ é uma dobra de F se $h(p) = Fh(p) = 0$ e $F^2h(p) \neq 0$.*

Definição 9 *Dizemos que uma singularidade $p \in S$ é uma cúspide de F se $h(p) = Fh(p) = F^2h(p) = 0$ e $F^3h(p) \neq 0$.*

Lema 10 *F é estruturalmente estável em p se, e somente se, p é um ponto regular ou uma singularidade dobra de F. Além disso, suas respectivas formas normais são:*

1. $F(u, v) = (0, 1)$ *(caso regular);*
2. $F(u, v) = (1, \epsilon u)$ *com* $\epsilon = \pm 1$.

Denotamos por Σ_0 o conjunto de todos os elementos em χ que são estruturalmente estáveis em 0. Em [3] está demonstrado que Σ_0 é aberto e denso em χ.

Observação 11 *Mencionamos que se p é um ponto de dobra de F então* $F(p) \neq 0$. *Além disso, a condição* $F^2h(p) \neq 0$ *significa que as trajetórias de F passando por p são tangentes a* $S = \{v = 0\}$ *e o contato entre as curvas é quadrático. Esta tangência pode ser interna (quando* $F^2h(p) > 0$*) ou externa (quando* $F^2h(p) < 0$*).*

Em nosso contexto, as $S-$singularidades de F são primeiramente classificadas por:

1. $F(p) \neq 0$;
2. $F(p) = 0$, ou seja, p é ponto singular de F;

No primeiro caso, uma singularidade do tipo cúspide ocorre genericamente para famílias a um parâmetro de elementos de χ. Se p é uma singularidade de F do tipo cúspide então a trajetória do campo de vetores por p tem um contato cúbico com S (em p). Quando $F(p) = 0$ devemos ter uma reclassificação genérica envolvendo a hiperbolicidade do ponto singular, e então definimos uma $S-$singularidade de F de codimensão um.

Usamos extensivamente a técnica de Peixoto (ver [3]) para determinar homeomorfismos locais os quais são C^0-equivalências entre dois campos de vetores definidos ao redor da região do bordo em $\boldsymbol{R}^2$. Para C^0-equivalência entre duas famílias de tais campos de vetores não requeremos continuidade com respeito aos parâmetros.

Seja F um campo de vetores C^∞ em $\boldsymbol{R}^2$ parametrizado por (x, y) tal que $X(x_0, y_0) \neq (0, 0)$. Uma construção de fluxo tubular K_F em (x_0, y_0) consiste em uma suave mudança de coordenadas $K_F(x, y) = (u, v)$ em uma vizinhança de (x_0, y_0) tal que $K_F(x_0, y_0) = (0, 0)$ e nas novas coordenadas $X(u, v) = (1, 0)$. Sabemos que se G é uma pequena perturbação de F, então a aplicação $G \to K_G$ é diferenciável.

3 Singularidades genéricas

Na sequência deste trabalho, utilizamos a seguinte construção:

3.1 Uma construção

Seja $X \in \Omega$. Nas coordenadas (x, y) determinadas acima e utilizando a Definição 5 temos que, se $X = (f(x, y), g(x, y))$ e X é $\phi-$reversível então $f(x, y)$ é uma função par e $g(x, y)$ é uma função ímpar na variável y logo podemos escrever X na forma:

$$X(x, y) = (yf(x, y^2), 1/2g(x, y^2)).$$

No semiplano $y > 0$, considere

$$u = x \quad \text{e} \quad v = y^2.$$

Um simples cálculo mostra que nestas coordenadas X é transformado em:

$$\tilde{X}(u,v) = (\sqrt{v}f(u,v), \sqrt{v}g(u,v)) \text{ em } v > 0.$$

Segue que em $y > 0$, X é topologicamente equivalente à $F = F(X)$, onde

$$F(u,v) = (f(u,v), g(u,v)) \text{ para } v > 0.$$

Observação 12 *F pode ser $C^\infty-$estendido para uma vizinhança do 0. Pelas propriedades simétricas de X (com respeito à involução canônica) deduzimos o comportamento de $F(X)$ em $M, 0$ e assim, determinando completamente o comportamento de X em 0. Portanto, o problema inicial é trasformado em analisar o retrato de fase de F em M. Não fazemos distinção entre F e qualquer de suas extensões.*

Observação 13 *Em um ponto regular a trajetória de X é sempre ortogonal a S. Em um ponto singular de X, o contato entre uma variedade invariante e S decai por um fator $1/2$ em comparação com a órbita ou variedade invariante de $F(X)$ passando pelo mesmo ponto. Ilustramos este fato assumindo que $\{v = u^k, k > 0\}$ é uma variedade invariante de $F(X)$ na região $v \geq 0$, isto implica que a curva $y = x^{k/2}$ é uma variedade invariante de X em $y \geq 0$.*

Assumamos que $X(0) = 0$, isto implica que $g(0) = 0$. Assim podemos escrever

$$f(u,v) = a_0 + a_{10}u + a_{01}v + o(|(u,v)|^2)$$

e

$$g(u,v) = b_{01}u + b_{10}v + o(|(u,v)|^2).$$

Observe que $Fh(u,v) = g(u,v)$.
O seguinte lema caracteriza todas as singularidades de codimensão zero de X em Ω:

Lema 14 *Seja $X \in \Omega$ tal que $X(0) = 0$ e 0 é uma singularidade estruturalmente estável de $F(X)$. Então 0 é um ponto de sela (se $F^2h > 0$) ou é um centro (se $F^2h < 0$).*

Denotamos por v_0 o subconjunto de Ω constituído de elementos que são estruturalmente estáveis (em Ω).

Proposição 15 *$X \in v_0$ se, e somente se, $F(X) \in \sum_0$. Além disso, a forma normal para singularidades de codimensão zero é:*

$$X(x,y) = \left(y, \epsilon\frac{x}{2}\right) \text{ com } \epsilon = \pm 1.$$

Este resultado é ilustrado a seguir:

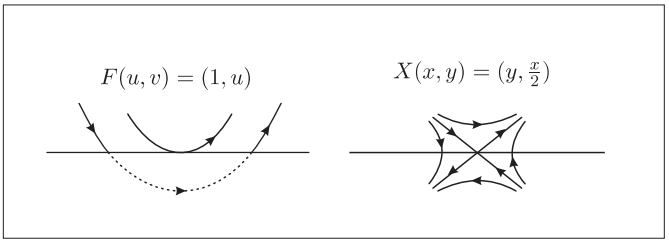


Figura 1. Singularidade de codimensão zero: sela.

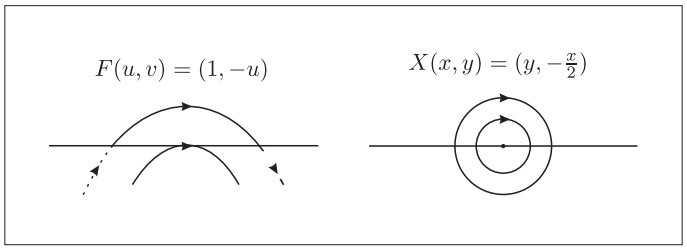


Figura 2. Singularidade de codimensão zero: centro.

3.2 Demonstração do Teorema 1

Temos que mostrar que as formas normais de campos de vetores C^0-estruturalmente estáveis em Ω são:

1. $X_{00}(x,y) = (0, 1/2)$;
2. $X_{01}(x,y) = (y, x/2)$;
3. $X_{02}(x,y) = (y, -x/2)$.

Prova:

A prova deste teorema segue diretamente da construção e do Lema 10, vejamos:

Do Lema 10 temos que:

1. $F(u,v) = (0,1)$ (caso regular);
2. $F(u,v) = (1, \epsilon u)$ com $\epsilon = \pm 1$.

Da construção temos que $x = u$ e $v = y^2$ e ainda que o campo vetorial $\varphi-$reversível é dado por

$$X = \left(yf(x,y^2), \frac{1}{2}g(x,y^2) \right).$$

Logo para o caso $F(u,v) = (0,1)$ temos:

$$X = \left(0, \frac{1}{2}\right)$$

e para o caso $F(u,v) = (1, \epsilon u)$ com $\epsilon = \pm 1$ temos:

1. Se $\epsilon = 1$ temos que $X = (y, \frac{x}{2})$.
2. Se $\epsilon = -1$ temos que $X = (y, -\frac{x}{2})$. ■

4 Singularidades de Codimensão 1

Consideremos os conjuntos $\chi_1 = \chi \setminus \Sigma_0$ e $\Omega_1 = \Omega \setminus \nu_0$ (a bifurcação dos conjuntos χ e Ω, respectivamente). Seja Σ_1 o subconjunto de χ_1 constituído pelos elementos que são estruturalmente estáveis com relação à χ_1.

O primeiro passo é encontrar formas normais para singularidades de codimensão 1 no bordo. Isto é feito nos lemas seguintes cujas provas estão em [3].

Damos uma idéia intuitiva da estratégia usada para classificar singularidades no bordo. Dado $F = (f, g)$ em χ tal que $g(0) = 0$, temos as seguintes possibilidades:

(i) $f(0) \neq 0$

(ii) $f(0) = 0$.

No caso (i) todas as formas normais podem ser obtidas do Lema da Forma Normal de Vishik em [4]. O caso (ii) não pode ocorrer em codimensão zero. As $S-$sigularidades de codimensão 1 são classificadas sob as seguintes condições:

(a) 0 é um ponto singular hiperbólico de F;

(b) os autovalores de $DF(0)$ são distintos;

(c) os autoespaços de $DF(0)$ são transversais a S, em 0.

As $S-$singularidades de codimensão 2 são caracterizadas por violações genéricas de cada uma das condições acima.

Lema 16 *[Lema de Classificação]* Σ_1 *é uma subvariedade de codimensão* 1 *de* χ_1. *Além disso, os elementos de* Σ_1 *são classificados a seguir:*

1. *S–singularidade cúspide (definição 9);*
2. *S–singularidade nó:* $F(0) = 0$, *os autovalores* (λ_1 *e* λ_2) *de* $DF(0)$ *são reais, distintos,* $\lambda_1\lambda_2 > 0$ *e os autoespaços são transversais a S em* 0*;*
3. *S–singularidade sela:* $F(0) = 0$, *os autovalores de* $DF(0)$ *são reais, distintos,* $\lambda_1\lambda_2 < 0$ *e os autoespaços são transversais a S em* 0*;*
4. *S–singularidade foco:* 0 *é um ponto singular hiperbólico de F e os autovalores de* $DF(0)$ *são* $\lambda = a \pm ib$, *com* $a, b \neq 0$.

Lema 17 *[Lema da Forma Normal] Uma família à 1–parâmetro F_λ, $\lambda \in (-\epsilon, \epsilon)$, do campo de vetores em χ, transversal à Σ_1 em F_0, tem as seguintes formas normais:*

1. *F_0 é uma S–singularidade cúspide: $F_\lambda(u, v) = (1, \lambda + u^2)$;*
2. *F_0 é uma S–singularidade nó: $F_\lambda(u, v) = (au, u + bv + \lambda)$ com $a = 1$, $b = 2$ (ou $a = -1$, $b = -2$);*
3. *F_0 é uma S–singularidade sela: $F_\lambda(u, v) = (u, u - v + \lambda)$;*
4. *F_0 é uma S–singularidade foco: $F_\lambda(u, v) = (u + v, -u + v + \lambda)$;*

O restante da seção será voltada para determinar resultados similares (Lemas 16 e 17) para sistemas reversíveis segundo uma correlação entre X e $F(X)$.

Em Ω definimos o subconjunto ν_1 da seguinte maneira: "$X \in \nu_1$ se a origem é uma singularidade genérica de codimensão 1 do correspondente $F = F(X)$". Isto significa que $X \in \nu_1$ se, e somente se, $F = F(X) \in \Sigma_1$.

Lema 18 *ν_1 é aberto e denso em Ω_1. Além disso, ν_1 é uma subvariedade de codimensão 1 de Ω:*

Proposição 19 *(i) X (em Ω_1) é estruturalmente estável com ralação à Ω_1 se, e somente se, $F(X)$ é estruturalmente estável com relação a χ_1;*

(ii) X é estruturalmente estável em Ω_1 se, e somente se, $X \in \nu_1$;

(iii) As formas normais de qualquer família a 1-parâmetro de elementos em Ω passando por $X_0 \in \nu_1$ e transversal a ν_1 são:

1. *tipo cúspide: $X_\lambda = (y, \frac{1}{2}(\lambda + x^2))$;*
2. *tipo nó: $X_\lambda = (xy, \frac{1}{2}(x + 2y^2 + \lambda))$ (ou $X_\lambda = (-xy, \frac{1}{2}(x - 2y^2 + \lambda))$);*
3. *tipo sela: $X_\lambda = (xy, \frac{1}{2}(x - y^2 + \lambda))$;*
4. *tipo foco: $X_\lambda = (xy + y^3, \frac{1}{2}(-x + y^2 + \lambda))$.*

O Teorema 2 é uma consequência imediata da Proposição 19 e é ilustrado nas figuras abaixo:

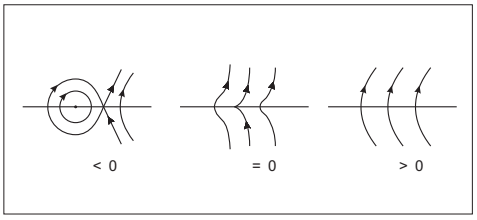


Figura 3. Singularidade de codimensão um: cúspide.

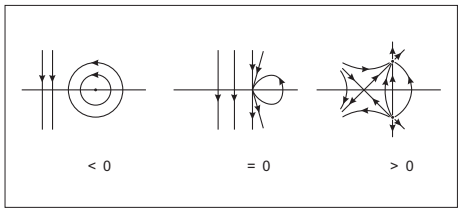


Figura 4. Singularidade de codimensão um: nó.

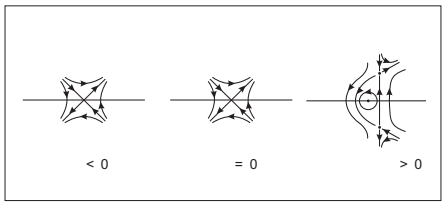


Figura 5. Singularidade de codimensão um: sela.

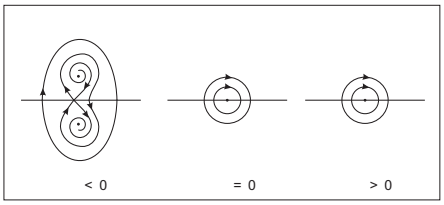


Figura 6. Singularidade de codimensão um: foco.

Observação 20 *No que segue, mensionamos alguns fenômenos globais que ocorrem genericamente para famílias a* 1*-parâmetro de campos de vetores definidos em variedades com bordo. Eles serão usados em sequência e mais detalhes são dados em [3].*

Uma bifurcação genérica de condimensão 1 *ocorre para F em χ se uma das seguintes situações são satisfeitas:*

(i) F tem uma trajetória a qual é tangente a S em exatamente dois diferentes pontos de dobra;

(ii) F tem uma separatriz de sela a qual é tangente a S em exatamente um ponto de dobra;

(iii) F tem uma trajetória periódica a qual é tangente a S em exatamente um ponto de dobra.

5 Singularidades de Codimensão 2

Começamos derivando preliminarmente formas normais de S-singularidades de codimensão 2 e então deduzimos os tipos topológicos de uma família a 2–parâmetros, genérica de campos de vetores em Ω.

Seja X em $\Omega_2 = \Omega_1 \setminus \nu_1$. Então o correspondente $F = F(X)$ está em $\chi_2 = \chi_1 \setminus \Sigma_1$ e vice versa.

Seja Σ_2 o subconjunto de χ_2 constituído pelos elementos de F tais que:

1. S–singularidade dove's tail:

$$F(0) \neq 0,\ Fh(0) = F^2h(0) = F^3h(0) = 0 \text{ e } F^4(0) \neq 0;$$

2. S–singularidade sela–nó: 0 é uma sela–nó de F e os autoespaços de $DF(0)$ são transversais a S em 0;

3. S–singularidade Hopf: $F(0) = 0$, 0 é uma singularidade Hopf de codimensão 1 de F;

4. S–singularidade nó–degenerado: $F(0) = 0$, os autovalores de $DF(0)$ são iguais a λ, $rank(DF(0) - \lambda Id) = 1$ e os correspondentes autoespaços são transversais a S em 0;

5. *S*–singularidade tangente hiperbólica: $F(0) = 0$, os autovalores de $DF(0)$ são reais e distintos, e tem uma variedade invariante tendo contato quadrático com S em 0. Além disso, os autovalores satisfazem: $\lambda_2 \neq 2\lambda_1$.

Observe que no caso (5) determinamos diferentes tipos topológicos de uma *S*–singularidade. Eles dependem principalmente da posição relativa da variedade invariante com respeito ao bordo e se a singularidade é uma sela ou um nó. Além disso, no caso nó temos que a separar quando a variedade invariante forte é tangente a S ou não.

Abaixo listamos alguns resultados, a maior parte provada em [5].

Lema 21 *(i)* Σ_2 *é aberto e denso em* χ_2*;*

(ii) F *é estruturalmente estável com relação à* χ_2 *se, e somente se,* $F \in \Sigma_2$*;*

(iii) Σ_2 *é uma subvariedade de codimensão 2 de* χ*;*

(iv) as formas normais de qualquer família a 2-parâmetros $F_{\alpha\beta}$ *transversal a* Σ_2 *em* F_{00} *são:*

1. *dove's tail:* $F_{\alpha\beta}(u, v) = (1, bu^3 + \alpha u^2 + \beta u)$ *com* $b = \pm 1$*;*
2. *sela-nó:* $F_{\alpha\beta}(u, v) = (-u, -u + a(v - u + \alpha)^2 + \beta)$ *com* $a = \pm 1$*;*
3. *bifurcação Hopf:*

$$F_{\alpha\beta}(u, v) = (\beta - v + u[\alpha + u^2 + (v - \beta)^2], u + (v - \beta)[\alpha + u^2 + (v - \beta)^2]);$$

4. *nó-degenerado:* $F_{\alpha\beta}(u, v) = (u + \alpha v, u + v + \beta)$*;*
5. *sela tangente:* $F_{\alpha\beta}(u, v) = (u, \alpha u - v + au^2 + \beta)$ *com* $a = \pm 1$*;*
6. *nó tangente:* $F_{\alpha\beta}(u, v) = (au, \alpha u + bv \pm 3u^2 + \beta)$ *com* $a = 1$ *e* $b = 3$ *ou* $a = 3$ *e* $b = 1$*;*

Consideremos agora os conjuntos: $\Omega_2 = \Omega_1 \setminus \nu_1$ e ν_2 o conjunto dos elementos X em Ω tais que 0 é uma *S*–singularidade de codimensão 2 de $F = F(X)$. Usando considerações similares como as feitas na última seção a seguinte proposição é uma consquência imediata do lema 21:

Proposição 22 *(i)* ν_2 *é aberto e denso em* Ω_2*;*

(ii) qualquer elemento de X *em* ν_2 *é estruturalmente estável em* Ω_2*;*

(iii) ν_2 *é uma subvariedade de codimensão 2 de* Ω_2*;*

(iv) qualquer aplicação $\eta : \boldsymbol{R}^2 \to \Omega$ *transversal a* V_2 *em* $X \in \nu_2$ *é* C^0*–equivalente a*

$$X_{\alpha\beta}(x, y) = (yf_{\alpha\beta}(x, y^2), g_{\alpha\beta}(x, y^2))$$

onde $F_{\alpha\beta} = (f_{\alpha\beta}, g_{\alpha\beta})$ *é uma das formas normais listadas no lema 21.*

A prova do teorema 3 é consquência direta da proposição 22.

Os diagramas de bifurcação de singularidades de codimensão 2 para campos de vetores reversíveis são ilustrados no final deste texto.

6 Considerações Finais

No projeto inicial, havíamos proposto trabalharmos com os campos vetoriais reversíveis do tipo (2,0), entretanto ao estudarmos o artigo referente aos reversíveis do tipo (2,1), vimos que algumas formas normais e diagramas de bifurcação estavam com algumas incorreções. Assim, decidimos corrigir estes pequenos erros, apresentando assim este artigo com as formas normais e diagramas de bifurcação corrigidos.

Esperamos ter a oportunidade neste próximo ano trabalharmos com os reversíveis do tipo (2,0).

Observamos ainda que devido a restrições em relação ao comprimento deste texto, omitimos algumas demonstrações.

Referências

[1] M. A. Teixeira, *Singularities of reversible vector fields*, Physica D **100** (1997), 101–118.

[2] L. Perko, *Differential equations and dynamical systems, Texts in applied mathematics*,Vol. 7, Springer–Verlag, New York. (1991)

[3] M. A. Teixeira, *Generic bifurcation in manifolds with boundary*, J. Differential Equations 25 (1977), 65–89.

[4] S.N. Vishik, *Vector fields near boundary of a manifold*, Vestnik Moskovskogo Universiteta Matematika 27 (1)(1972), 21–28.

[5] M. A. Teixeira, *Generic bifurcation of certain singularities*, Boll. Un. Mat. Italiana 25 (1979), 15–29.

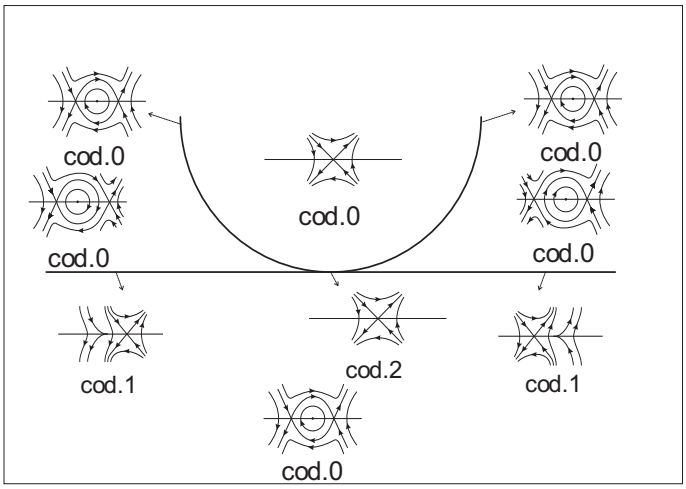


Figura 7. Dove!s Tail: tangência interna.

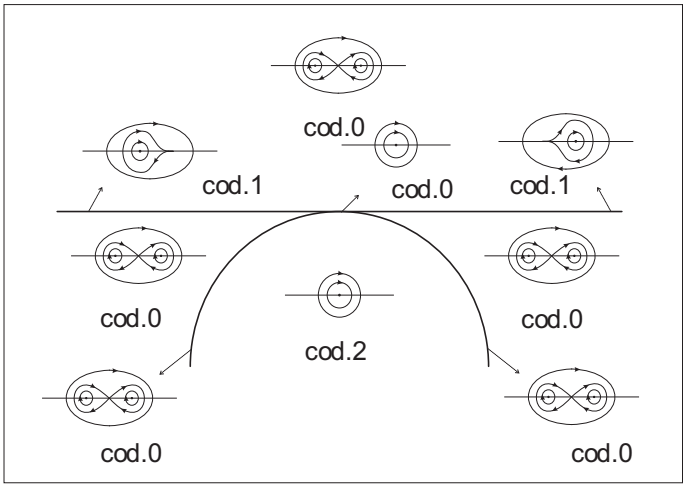


Figura 8. Dove!s Tail: tangência externa.

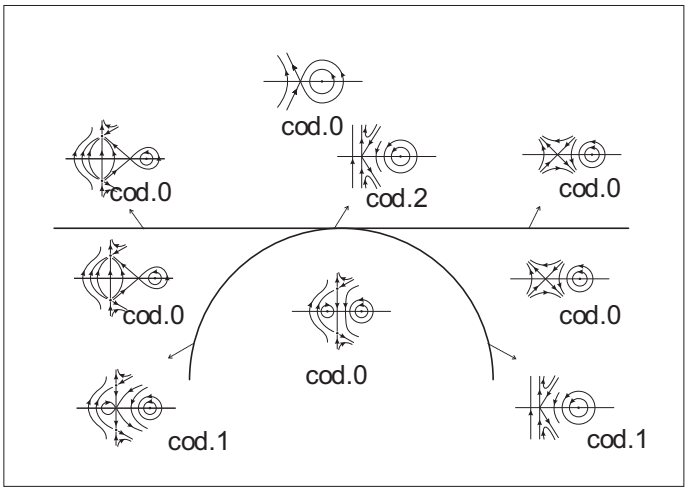


Figura 9. Sela-nó: meia sela interna.

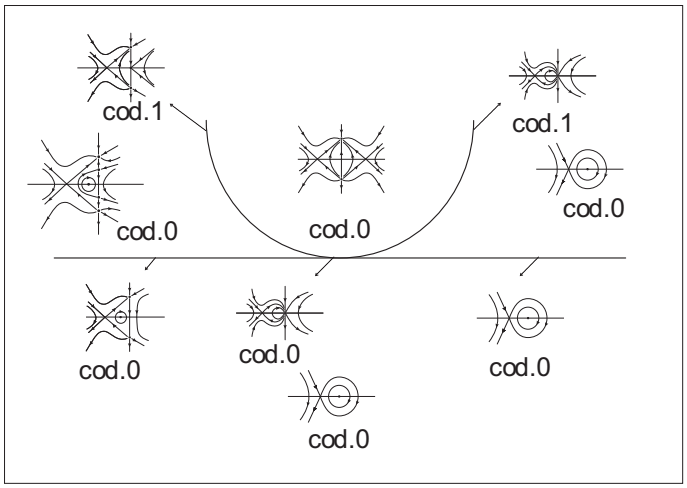


Figura 10. Sela-nó: meia sela externa.

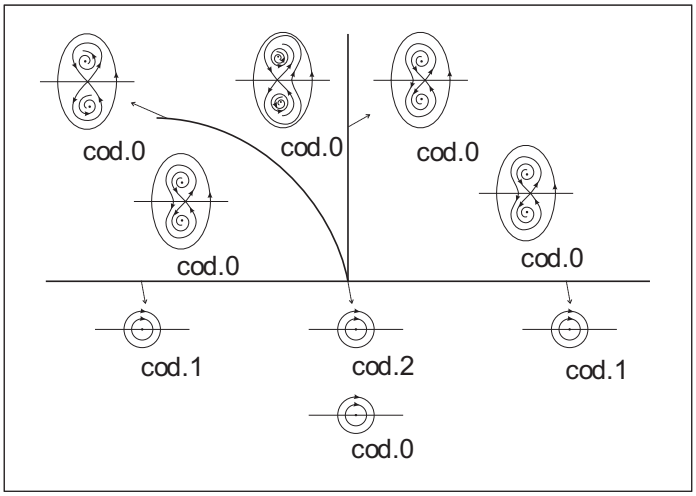


Figura 11. Bifurcação Hopf.

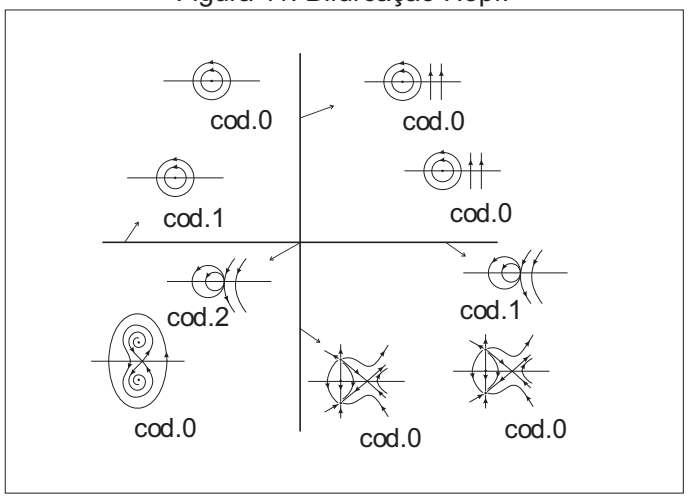


Figura 12. Nó-degenerado.

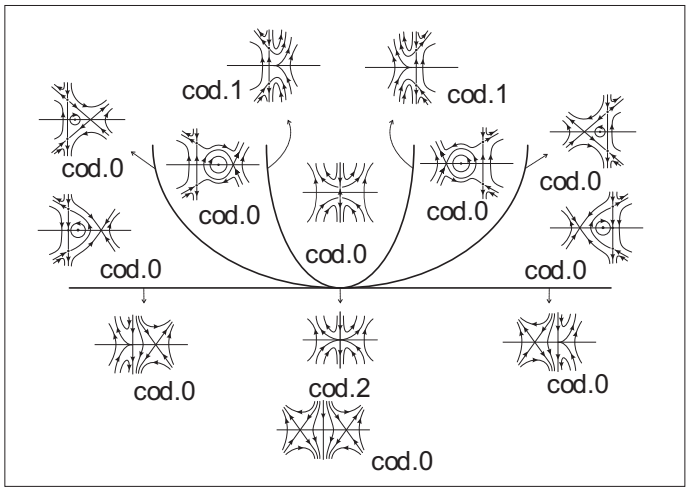


Figura 13. Sela tangente: tangência interna.

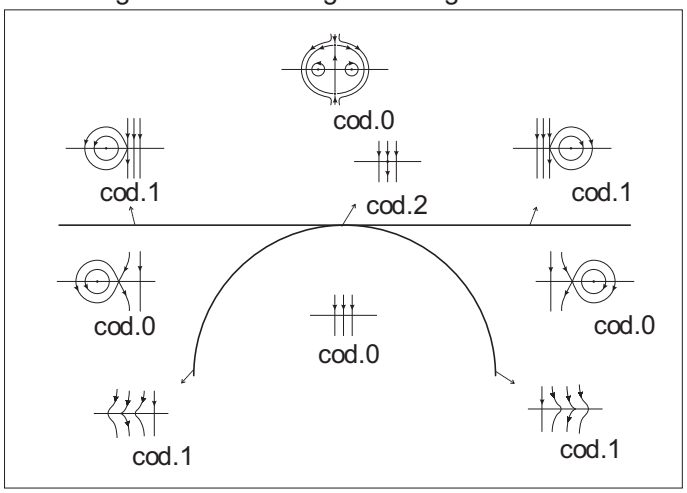


Figura 14. Sela tangente: tangência externa.

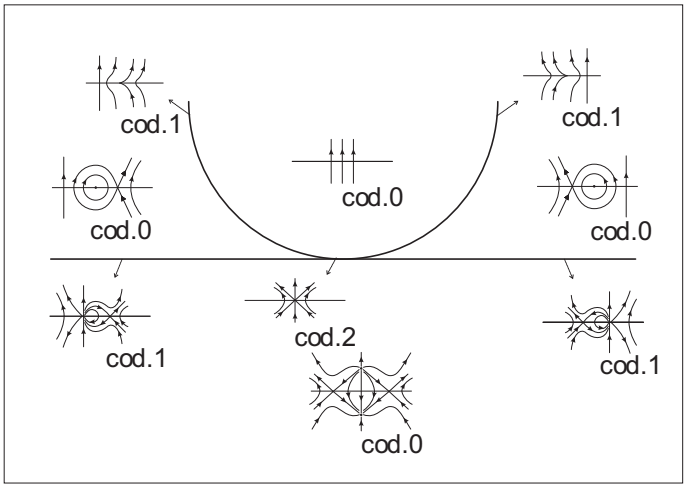


Figura 15. Nó tangente: variedade invariante fraca tangente externamente.

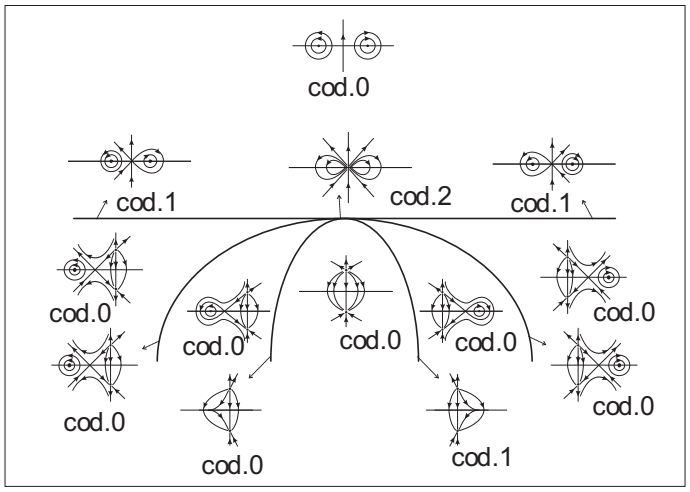


Figura 16. Nó tangente: variedade invariante fraca tangente internamente.

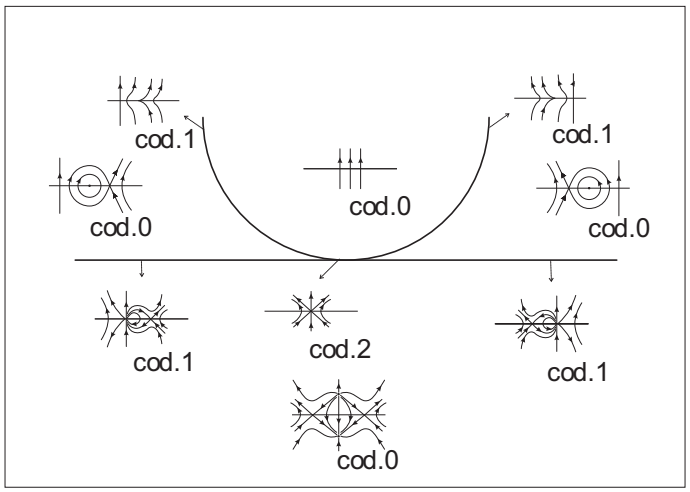


Figura 17. Nó tangente: variedade invariante forte tangente internamente.

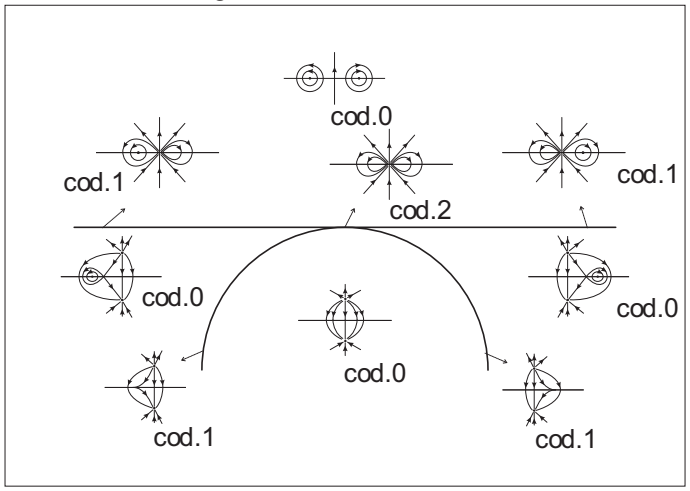


Figura 15. Nó tangente: variedade invariante forte tangente externamente.

USO DA TERRA E MAPEAMENTO DAS ÁREAS DEGRADADAS COM AREAIS NO SUDOESTE GOIANO

FREITAS, Douglas Siqueira[1]
SCOPEL, Iraci[2]

[1] – Graduando do curso de Agronomia da Universidade Federal de Goiás / Campus Jataí – E-mail: doug20106@gmail.com
[2] – Prof., Engº Agrº, Dr. em Ciências Florestais do curso de Geografia da Universidade Federal de Goiás / Campus Jataí – E-mail: iraciscopel@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Neossolos Quartzarênicos órticos; degradação do solo; formação de areais.

INTRODUÇÃO

O estado de Goiás possui considerável diversidade de classes de solo, entre as quais podem ser destacados os Neossolos Quartzarênicos órticos, que ocorrem em 15% da área total do estado e apresentam-se muito susceptíveis a processos erosivos, à degradação e, finalmente, à formação de manchas de solos descoberto, denominadas de “areais”. (SUERTEGARAY, 1998; SCOPEL; PEIXINHO; SOUSA, 2005).

Até meados do século XX, as áreas com ocorrência desse solo eram pouco exploradas ou utilizadas com pouca intensidade, devido à baixa fertilidade, à abundância de outras classes de solos, mais aptos às atividades agrícolas e, ainda, por esses solos não serem incluídos nos programas de incentivo governamental. A partir dos anos 70 a economia goiana, baseada numa estratégia do governo militar de estender o desenvolvimento econômico a outros locais, fora dos grandes centros, modificou sua estrutura no espaço agrário, apresentando aos poucos uma ocupação de toda a região, ensejando assim o uso dos Neossolos Quartzarênicos órticos (RQo).

Devido à exploração indiscriminada da vegetação e do solo nessas áreas, principalmente devido a atividades de criação extensiva de gado e de agricultura mecanizada, pode-se observar a ocorrência de processos, chamado por alguns pesquisadores de arenização (SUERTEGARAY, 1998; SCOPEL; PEIXINHO; SOUSA, 2005).

O termo foi usado originalmente no Rio Grande do Sul e adotado para algumas ocorrências semelhantes em outros estados.

> A formação de areais no Sudoeste de Goiás vem sendo pesquisada desde 2002 e, é importante destacar, como foi constatado, esse processo não ocorre nos mesmos moldes daquele do Rio Grande do Sul, onde foi denominado, com base em pesquisas geológico-geomorfológicas, de “arenização”. (SOUSA et al. 2007, p. 117).

Conforme Scopel et al. (2005), a formação de areais é caracterizada como um processo de rarefação da vegetação em áreas arenosas, associado a ações antrópicas, como o excesso de lotação do pasto com gado (superpastejo ou superpastoreio) e à falta de fertilização e manejo adequado, promovendo alterações nas propriedade naturais do solo e promovendo sua degradação, até o surgimento de manchas de areia, consequência do RQo exposto, ou seja, sem cobertura vegetal.

Os RQo são indicados para preservação ou, em circunstâncias bem determinadas, para uso com silvicultura ou pastagem. (SPERA et al., 1999). Entretanto, dado o desenvolvimento tecnológico atual e situações socioeconômicas locais, é possível pensar numa utilização agrícola mais intensiva dos RQo, situados em relevo plano e suave ondulado, desde que haja um cuidado especial.

A situação constatada mostra a necessidade de pesquisa e de geração de conhecimentos em solos arenosos e, inclusive, em recursos hídricos aí existentes. Considera-se importante a viabilização dos processos produtivos nesta classe de solos da forma menos danosa ao meio ambiente, com indicações de ações de uso e manejo da terra que possibilitem a recuperação da qualidade da água e dos solos, em particular, daqueles com manchas de areia ou solo exposto, que ocorrem na região sudoeste de Goiás.

Considerando a importância do Sensoriamento Remoto e dos sistemas de informações geográficas (SIGs), da fotointerpretação e/ou interpretação de imagens no monitoramento dos aspectos ambientais, possibilitando a análise multidimensional e integrada do espaço geográfico, com rapidez, eficiência e baixo custo, o objetivo deste trabalho é: avaliar diferentes métodos de tratamento e classificação de imagens em especial do Satélite Sino-Brasileiro de Recursos Terrestres (CBERS), a fim de realçar e mapear os areais e/ou possíveis áreas de arenização do Sudoeste Goiano.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a composição do mapa final mostrando as áreas de arenização no sudoeste goiano, foram adotados os seguintes procedimentos:

a) Obtenção das bases: a partir do Sistema de Informações Georeferenciadas do Estado de Goiás (SIEG), foram acessados dados como drenagem e limite municipal na escala de 1:250.000 das folhas SE22VA, SE22VB, SE22VC, SE22VD, SE22XA, SE22XC, SE22YA, SE22YB, SE22ZA (formato shapefile - .shp), que fazem a cobertura de todo o sudoeste goiano. Ainda no site do SIEG, foi encontrado um mapa exploratório de solos do estado de Goiás na escala de 1:1.000.000 (formato shapefile), utilizado posteriormente como filtro para identificação das áreas de arenização na região.

b) Processamento das imagens de satélite: as imagens foram importadas com bandas individualizadas, das quais foram utilizadas as bandas 2, 3 e 4 que, em composição monocromática, receberam tratamento de contraste por meio da opção “equalizar histograma”, do software SPRING 5.0.2, com o objetivo de diferenciar melhor todas as feições do terreno imageadas.

O uso das bandas 2, 3 e 4 do satélite CBERS é recomendado para mapeamentos de uso da terra por permitirem uma melhor diferenciação das feições de vegetação, áreas cultivadas e solo exposto. Em especial, a banda 4 é importante para o mapeamento do solo por imagear feições na faixa do infravermelho próximo, faixa em que os solos arenosos apresentam maior resposta espectral (FLORENZANO, 2002), sendo fundamental para a identificação de possíveis áreas de arenização. A técnica de equalização de histograma utilizada tem o objetivo de melhorar a imagem no seu

domínio espectral. Nesse sentido, a equalização do histograma da banda 4 foi fundamental para individualizar as áreas onde os teores de areia no solo são mais elevados.

Posteriormente, estas imagens foram recortadas de acordo com o limite de cada município e, pela ferramenta “mosaico”, agrupadas para compor a região do sudoeste goiano. Após o mosaico, a imagem foi classificada de forma supervisionada, indicando as áreas com valores entre 240 e 255 para níveis de cinza (na banda 4) como áreas de arenização. Este critério foi adotado a partir da observação de áreas que apresentam areais (pontos aferidos com GPS) e que apresentam tonalidades entre 240 e 255 para os níveis de cinza (áreas que apresentam-se na imagem com cor praticamente branca). Ao aplicar composição colorida, com atribuição da cor vermelha para a banda 2, verde para a banda 4 e azul para a banda 3 (2R4G3B), estas áreas apresentam-se em tons de verde claro, em conflito com as áreas ocupadas por cultivo de safrinha e/ou cobertura vegetal morta, sendo necessário o estabelecimento de um filtro para eliminar esta matriz de confusão.

c) Identificação das áreas de neossolo e composição do mapa final: Como forma de eliminar a confusão criada pela classificação supervisionada, utilizou-se como filtro o mapa exploratório de solos do estado de Goiás. No software ArcGis 9.1, o mapa base, em formato “.shp” foi reclassificado, criando-se um novo arquivo apenas com as áreas de ocorrência de neossolo, contendo apenas as classes Aqa e Aqd (Neossolos Quartzarênicos álico e distrófico). Os Neossolos Quartzarênicos Hidromórficos e as associações foram descartadas.

Este novo arquivo gerado foi exportado para o software SPRING 5.0.2 e, então, a imagem classificada na etapa anterior foi recortada de acordo com as áreas de ocorrência de neossolos, indicando assim as possíveis áreas de ocorrência de arenização na região do sudoeste goiano. O mapa final apresenta apenas duas classes temáticas: 1. Arenização e 2. Outros, que correspondem a todos os outros tipos de solo e uso da terra identificados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região do Cerrado brasileiro antes da década de 1970 não era muito explorada economicamente. Em função da baixa fertilidade dos solos e a indisponibilidade de técnicas, a ocupação desta região do Brasil era restrita. A partir desta década, iniciaram grandes mudanças no campo, como a modernização da agricultura, criação de políticas públicas que resultaram em disponibilização de vários recursos que contribuíram para a expansão da agricultura no Brasil. Fatores como a mecanização, o desenvolvimento de pesquisas e produtos como insumos, fertilizantes entre outros, possibilitaram a tornar os solos do Cerrado mais produtivo.

As primeiras terras ocupadas foram áreas de extensos chapadões que permitiu uma rápida mecanização, determinado pelo sistema, o qual oferecia políticas de créditos que possibilitaram aos produtores fazerem grandes investimentos sem correr riscos. Já as áreas consideradas inviáveis para atividades agrícolas, como as de ocorrências de areias, foram facilmente ocupadas pela pecuária. No entanto, mais tarde estas áreas a partir do uso de técnicas mecanização moderna, possibilitaram o seu uso para atividades agrícolas.

Esta possibilidade de aumento de produção e lucros fez, com que houvesse um acréscimo na especulação do preço da terra que antes tinha baixo valor. Isso gerou a ampliação de exploração agrícola que se estendeu para áreas de terras arenosas, nas quais, algumas culturas como a soja passaram a ser produzidas em larga escala em Neossolos Quartzarênicos.

Outro fator importante na ocupação do Cerrado, foi o uso do solo para pastagem que a partir da década de 1970, com a utilização de gramíneas resistentes como a branquiária, viabilizou sua implantação em diferentes condições. Porém, a falta de um manejo adequado e o pastejo intenso, causou o esgotamento do solo em pouco tempo de uso. Consequentemente, essa improdutividade impulsionou o abandono destas áreas, que já apresentavam em grande processo de degradação.

Assim, o fenômeno da formação de manchas de areias está relacionado com a retirada de vegetação provocando o desencadeamento dos processos de degradação. O solo descoberto ou esparsamente coberto por gramíneas possibilita processos

erosivos hídricos laminares e lineares, na época das chuvas associado aos fatores eólicos. Tal processo de degradação seria amenizado se existisse a vegetação nativa na região.

No intuito de se investigar as causas e a dimensão da área degradada, buscou-se entender melhor o problema a partir de realização de pesquisas a campo, a qual possibilitou observar que estas terras degradadas abrangem extensa área do sudoeste goiano, a qual já apresenta várias incisões lineares, voçorocas de grande porte, baixa capacidade para atividade de pastagem, assoreamento dos cursos d'água, solo exposto entre outros. Posteriormente, a utilização de recursos de Geoprocessamento e Sensoriamento Remoto facilitaram o mapeamento destas áreas degradadas.

Diante disso, os procedimentos realizados permitiram observar que os testes feitos com contrastes e diferentes composições apresentaram o mesmo nível de confusão, originando uma imagem com mais áreas de arenização do que realmente existem, atingindo uma área de 5784,83 km^2 (Figura 1). Para melhorar estas informações, foi necessário o cruzamento da imagem temática resultante com o mapa de RQo do sudoeste goiano.

É importante ressaltar que o mapeamento foi feito a partir da resposta espectral das areias, que apresentam alta reflectância na faixa do infra-vermelho próximo (banda 4 do sensor CCD do satélite CBERS), principalmente quanto à presença de quartzo e especificidades de reflectância em relação a óxidos de ferro, matéria orgânica e teores de água no solo. Ainda assim, existe perda de informação devido ao equivoco entre as manchas de areia e algumas áreas de safrinha colhidas no período seco recente, onde o solo encontra-se coberto por matéria vegetal seca, apresentando reflectância semelhante às areias.

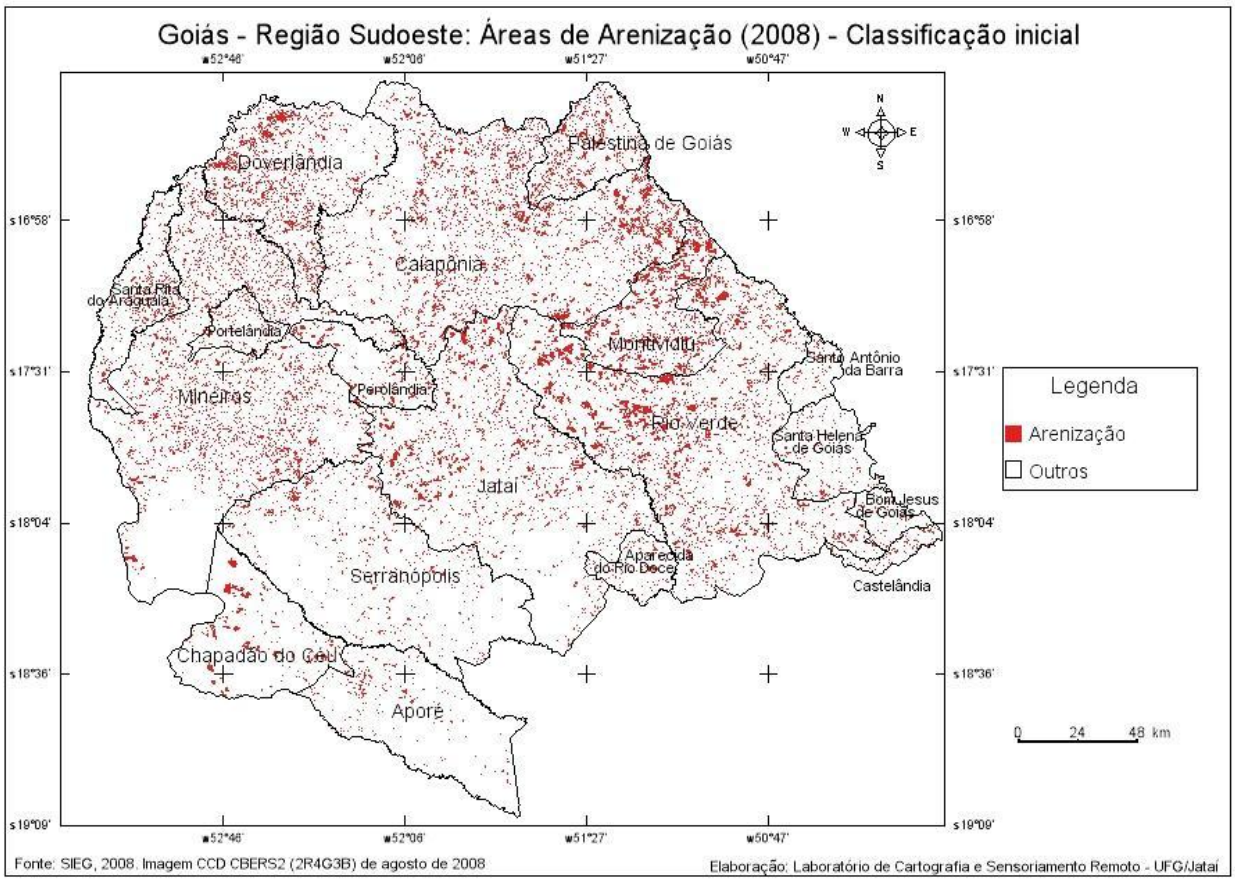


Figura 1: Mapa da área de ocorrência de manchas de areia. Elaboração: Laboratório de Cartografia e Sensoriamento Remoto, ano 2009.

O ideal para a delimitação destas áreas de arenização seria a utilização de imagens de satélite do período chuvoso, pois com a diferenciação das diferentes feições de vegetação, as áreas de solo exposto ficariam restritas, facilitando a identificação dos areais. Infelizmente, não estão disponíveis imagens do mesmo período para toda a área do sudoeste goiano e, além disso, algumas imagens apresenta grande quantidade de nuvens, o que dificulta a classificação. Dessa forma, optou-se por realizar o tratamento e classificação de imagens do período seco, visto que estavam disponíveis as imagens de toda a área para a mesma data no mês de agosto, não incorrendo no risco de cada imagem mapear feições de vegetação em estágios distintos de desenvolvimento.

Como forma de reduzir a confusão gerada na classificação inicial, a imagem temática gerada foi cruzada com o mapa de neossolos da região do sudoeste goiano, visto que as áreas de arenização ocorrem predominantemente em áreas que

apresentam esta classe de solos. Dessa forma, a imagem temática final apresenta apenas 611,2 Km² de áreas com Rqo descobertos ou com manchas de areia (figura 2), o que confirma que apenas a classificação das imagens de satélite não é suficiente para identificar estas áreas, fazendo com que muitos pesquisadores incorram em erro ao fazer tais afirmações.

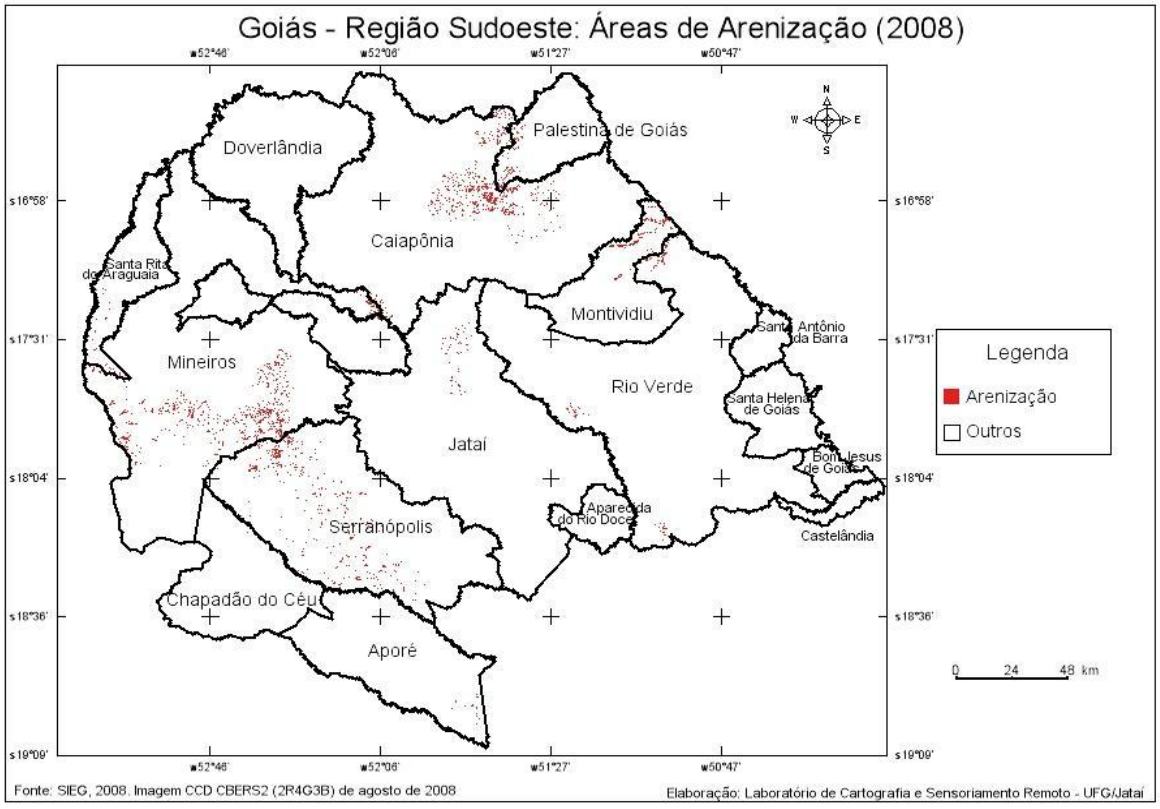


Figura 2: Mapeamento da área de ocorrência de arenização. Elaboração: Laboratório de Cartografia e Sensoriamento Remoto, ano 2009.

Como as comparações das imagens de satélite, pode-se observar que os processos de arenização têm-se intensificado com o passar dos anos, em áreas em que o substrato é arenoso e apresenta arenitos friáveis, com cobertura vegetal escassa. A deterioração vem aumentando, devido às diversas formas com que o homem atua no meio ambiente, seguido dos fatores naturais.

Para a recuperação destas áreas, estão sendo realizados trabalhos na bacia do Ribeirão Sujo, que visam a utilização de plantas nativas do cerrado e culturas com interesse agronômico.

CONCLUSÃO

A partir de trabalhos realizados nas manchas de areia encontradas na bacia do Ribeirão sujo como visto em trabalho anterior (SOUSA et al, 2007), foi possível realizar uma extrapolação destas para todo o sudoeste goiano com a utilização das imagens de satélite.

O procedimento para obtenção de imagens que abrangessem todo o sudoeste goiano foi dificultado pela presença da cobertura de nuvens no período chuvoso, o que foi resolvido pela utilização de um mosaico das imagens disponíveis. A imagem utilizada do período seco resultou num mapa com problemas, uma vez que superestimou as áreas de areais dado a semelhança das respostas espectrais obtidas dos Neossolos com as áreas de palhada da safrinha, colhida já no período seco. Esta confusão também foi verificada em trabalho anterior (SOUSA et al, 2007), o qual serviu de base para alguns dos procedimentos adotados.

A metodologia executada permitiu realizar o mapeamento das áreas degradadas, porém, é necessário compreender melhor a dinâmica do fenômeno de formação de areais para assim podermos propor tecnologias adequadas á contenção e recuperação dessas áreas. Ressaltando que já está sendo realizado procedimentos como experimentos em parte das áreas de ocorrência de areais (município de Serranópolis-GO) e, em casa de vegetação (figuras 3 e 4), a fim de observar o comportamento e desenvolvimento de algumas culturas como milho, arroz, sorgo, soja, cana, pastagem e milheto.



Figuras 3 e 4: Experimentos em campo e em casa de vegetação. Autor: Iraci Scopel, ano 2009.

A realização da pesquisa resultou em informações no que refere ao uso e manejo do solo, degradação e a formação de areais no Sudoeste de Goiás, alertando a comunidade sobre a exploração dos recursos naturais, possibilitando a conscientização mais crítica em relação a esse tipo de prática. Também, os resultados têm impulsionado o interesse em novas pesquisas sobre o assunto na região, pois o desafio de elaboração de tecnologias benéficas ao uso do solo pode oferecer a comunidade ações positivas no campo.

REFERÊNCIAS

SPERA, S. T.; REATTO, A.; MARTINS, E. de S.; CORREIA, J. R.; CUNHA, T. J. F. Solos areno-quartzosos no Cerrado: características, problemas e limitações ao uso. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1999. 48 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 7). .

SCOPEL, I et al. Análise das Chuvas no Centro-Sul de Goiás. In.: CONGR. BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 2., Anais.Campina Grande/PB, 1995.

SCOPEL, I.; PEIXINHO, D. M.; SOUSA, M. S (Coords.) A formação de areais e seu controle na região de Jataí e Serranópolis/GO. Relatório final do Projeto de Pesquisa/CNPq, nov.de 2005.

SCOPEL, I.; PEIXINHO, D. M.; SOUSA, M. S. A formação de areais e seu controle na egião de Jataí e Serranópolis/GO. Relatório final do Projeto. Jataí/GO: PROINPE/SECTECGO, 2005. 155 f.

SOUSA, M. S. As transformações da paisagem: contribuição ao estudo da formação de areais na bacia do Ribeirão Sujo, município de Serranópolis/GO. Dissertação (Mestrado em Geografia). Instituto de Estudos Sócio-ambientais/Universidade Federal de Goiás. Goiânia: 2005.

SOUZA, A. P. de et al. O geoprocessamento na construção de mapas temáticos: arenização no sudoeste do estado do Rio Grande do Sul. Sociedade Natureza, Uberlândia (MG), v. 8, n. 15, p.

SUERTEGARAY, D. Deserto grande do sul. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 1998. 109 p.

COMPARAÇÃO DO PERFIL DE ANTICORPOS ANTI- *Paracoccidiomicose brasiliensis* EM CAMUNDONGOS BALB/C IMUNIZADOS COM EXTRATO PROTÉICO FÚNGICO

Priscila Teixeira Ferreira da Silva[1] e Lucimeire Antonelli da Silveira[1]

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP)

Endereço eletrônico: prisufg@gmail.com

Palavras-chave: Adjuvantes imunológicos. Imunização. Anti – *P. brasiliensis*.

1. INTRODUÇÃO

As micoses sistêmicas impõem um problema sério e crescente de saúde pública, sendo uma importante causa de mortalidade e morbidade em todo mundo. O *Paracoccidioides brasiliensis* é um importante fungo endêmico, agente etiológico da paracoccodioidomicose (PCM), a mais prevalente micose sistêmica da América Latina (TAVARES, 2007) ocorrendo principalmente no Brasil, predominantemente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do país (CAMARGO & FRANCO, 2000).

O *P. Brasiliensis,* é um fungo dimórfico capaz de crescer como levedura nos tecidos infectados ou quando cultivado *in vitro* a 36°C, e como forma miceliana (infectiva) em condições saprobióticas no meio ambiente, ou quando cultivado em temperaturas inferiores a 28 °C (BAGAGLI et al*.,* 2006).

O dimorfismo em fungos está relacionado a alterações de componentes da parede celular. Em *P. Brasiliensis* a transição de micélio para levedura é um requerimento essencial para a ocorrência da PCM (MONICA, 2007).

A capacidade de *P. brasiliensis* causar micose com grande variedade de manifestações clínicas, desde formas localizadas até doença disseminada evoluindo para letalidade, depende provavelmente da relação entre a virulência do fungo, a habilidade deste em interagir com as estruturas do hospedeiro e invadi-las, e a resposta imunológica deste último (SILVA et al., 2005).

As respostas imunes adaptativas naturalmente desenvolvidas são direcionadas contra antígenos derivados de microrganismos patogênicos e outras substâncias imunogênicas. O ato de induzir uma resposta imune é conhecido como imunização. Imunizações experimentais são rotineiramente provocadas pela inoculação de antígeno no animal ou no homem (JANEWAY et al*.,* 2002).

Adjuvantes imunológicos são substâncias (emulsões, bactérias, lipossomas, etc) que quando associadas aos antígenos potencializam suas propriedades imunogênicas. Os adjuvantes podem amplificar a resposta imune humoral e/ou celular estimulando a expressão de co-estimuladores nas células apresentadoras de antígenos (APCs) e nos macrófagos, e secreção de citocinas tais como a IL-12 (ABBAS et al., 2005). Os adjuvantes de depósito liberam o antígeno lentamente retardando sua absorção e destruição, e consequentemente prolongam o tempo do estímulo imunológico. Adjuvantes de depósito comumente usados são compostos a base de alumínio, como o hidróxido de alumínio e o fosfato de alumínio, e as emulsões, como o adjuvante de Freund (NETO et al., 1991).

O hidróxido de alumínio forma agregados porosos que irão absorver o antígeno em seus espaços intersticiais promovendo imunopotenciação, justificando seu efeito de depósito (MÈNDEZ et al., 2006).

O adjuvante de Freund é uma emulsão água-óleo que se apresenta sob a forma completa, constituída por mistura de óleo mineral, agentes emulsificantes e micobactérias mortas, e forma incompleta que não possui constituintes bacterianos (NETO et al., 1991). O adjuvante incompleto de Freund, além de seu efeito de depósito, tem a capacidade de induzir processos inflamatórios, aumentando o infiltrado de células inflamatórias e/ou a capacidade de estimular as funções das células apresentadoras de antígeno (APC), potencializando a resposta das células T específicas (GUPTA et al., 1993).

Nesse plano de trabalho tivemos como meta a padronização de esquemas de imunizações de camundongos isogênicos Balb/c com extrato protéico do fungo associados a diferentes adjuvantes.

2. OBJETIVO

Comparar o perfil de anticorpos anti- *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos Balb/c imunizados com extrato protéico de fungo associados aos adjuvantes de Freund e ao hidróxido de alumínio.

3. METODOLOGIA

3.1. Cultivo de *Paracoccidioides brasiliensis*

O fungo *P. brasiliensis*, isolado *P. brasiliensis* 01, fornecido pela Professora Maria do Rosário Rodrigues Silva do Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP da Universidade Federal de Goiás, foi cultivado em 500mL de meio líquido Sabouraud. O meio Sabouraud líquido foi constituído de glicose 15g; peptona 5g; extrato de levedura 2,5g e BHI (Brain Heart Infusion) 0,5g; em 500mL de água destilada, que posteriormente foi esterilizado por autoclavagem durante 20 minutos sob temperatura de 121°C.

Logo após, os 500mL de meio líquido foram distribuídos em erlemeyers, que em seguida foram resfriados a temperatura ambiente. Flambou-se uma alça de níquel cromo e transferiu-se através desta, cerca de três colônias de *P. brasiliensis* oriundas de meio sólido; ágar Sabouraud, armazenados em estufa a 36°C do Laboratório de Micologia. Os procedimentos foram realizados de acordo com os padrões microbiológicos, respeitando rigorosamente as normas de biossegurança, tendo em vista a patogenicidade do fungo. Os erlemeyers contendo o fungo inoculado, com cerca de 200 mL de meio de cultura Sabouraud líquido, foram incubados em estufa a 36°C por 25 dias, e em outro erlemeyer contendo cerca de 100 mL de meio líquido, foi incubado em um agitador automático a 36°C e 135 rpm.

3.2. Obtenção do extrato protéico

Transferiu-se o meio líquido Sabouraud com o fungo crescido, após 25 dias de incubação, para tubos de centrífuga e realizou-se uma centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente (TA). O pellet obtido foi lavado com tampão fosfato salino (PBS) numa relação de volume 1:2 por três vezes. É importante ressaltar que a cada etapa de lavagem o pellet foi cuidadosamente ressuspendido. Em seguida, adicionou-se ao pellet, PBS volume a volume, sendo a amostra submetida a congelamentos e descongelamentos sucessivos, com posterior banho de ultrassom por 1 hora.

Logo após, a amostra foi centrifugada a 6000 rpm por 15 minutos, recuperou-se o sobrenadante como fonte de proteínas totais do *P. brasiliensis* e armazenou-se a - 20°C até o momento do uso.

3.3. Determinação das proteínas totais

Para determinação das proteínas totais foi utilizado *kit (BCA™ Protein Assay Kit -PIERCE)* e o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

Pipetou-se na microplaca, 25µL de diferentes diluições da substância padrão(albumina bovina) disponibilizado pelo *kit* e 25µL do extrato de *P. brasiliensis*, em duplicata. Em seguida adicionou-se 200 µL do Working Reagent (WR) em cada orifício da placa. O WR é constituído de 50 volumes do Reagente A e 1 volume do Reagente B, conforme recomendações do fabricante. Misturou-se a placa em *shaker* por 30 segundos, cobriu-a e a incubou a 37°C por 30 minutos.

Posteriormente, a placa permaneceu por alguns minutos a temperatura ambiente e mediu-se a absorbância próxima a 562 nm. À partir da leitura das densidades ópticas das diluições dos padrões construi-se uma curva para determinação da massa dos extratos protéicos de *P. brasiliensis* obtidos.

3.4. Antígenos e adjuvantes

O antígeno usado foi o extrato protéico bruto de *Paracoccidiodes brasiliensis*, e os adjuvantes utilizados foram o de Freund (Sigma) e o Hidróxido de alumínio (Peptgel – Laboratório Teuto Brasileiro S/A).

3.5. Animais

Os animais utilizados foram camundongos Balb/c, fêmeas, de 2 meses de idade, fornecidos pelo Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP da Universidade Federal de Goiás, e mantidos no Centro de Produção de Anticorpos Monoclonais do Centro Oeste – CEPRACO, onde foram realizados os procedimentos experimentais.

3.6. Esquema de Imunizações

Os camundongos foram divididos em três grupos compostos por 6 camundongos. As imunizações foram realizadas por via subcutânea, utilizando-se 20 µg de extrato protéico diluído em PBS 1X por camundongo, para todos os grupos, seguindo o esquema de imunização conforme Tabela 1.

O volume de adjuvante completo de Freund utilizado por camundongo estava em conformidade com o estabelecido pelo Guidelines for the Research Use of Adjuvants da Office of Animal Care and Use Staff (OACU), que preconiza o uso de volume menor ou igual 0,1 ml por essa via de imunização. O adjuvante de Freund com a solução antigênica foi homogeneizado em vórtex até adquirir uma coloração branca homogênea, conforme método de Flies e Chen (2003) modificado.

Tabela 1. Esquema de imunização utilizando adjuvantes de Freund e Hidróxido de Alumínio.

Dia	Grupo 1 Controle	Grupo 2 Adjuvante de Freund	Grupo 3 Hidróxido de alumínio
0	10-20µg Ag/cdg	10-20µg Ag + 50 µL Adjuvante de Freund Completo /cdg	10-20µg Ag + 180µg Hidróxido de Alumínio /cdg
7	10-20µg Ag/cdg	10-20µg Ag + 50µL Adjuvante de Freund Incompleto/cdg	10-20µg Ag + 180µg Hidróxido de Alumínio /cdg
21	10-20µg Ag/cdg	10-20µg Ag + 50µL Adjuvante de Freund Incompleto/cdg	10-20µg Ag + 180µg Hidróxido de Alumínio /cdg
28		Sangria de Prova	
35	10-20µg Ag/cdg	10-20µg Ag /cdg	10-20µg Ag /cdg
40		Sangria Total	

cdg: camundongo

Para obtenção do soro, as amostras sanguíneas foram centrifugadas a 1500rpm a 25 °C por 10min, após retração do coágulo. Os soros foram armazenados a - 20°C até a realização do ensaio de ELISA.

3.7. Titulação do soro dos animais - Técnica de ELISA

Para avaliar a eficiência do esquema de imunização, realizou-se a determinação do perfil de anticorpos pelo método de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indireto após o 40º dia.

Placas de 96 cavidades (*Corning Incorporated Costar, USA*) foram sensibilizadas com 50µl de solução de extrato protéico de *P. brasiliensis* na concentração 5µg/ml, 10µg/ml e 20µg/ml para padronização do ensaio e a 20µg/ml

nos ensaios de dosagem dos anticorpos produzidos pelos diferente grupos, e incubadas *overnight*, a 4ºC. Terminada a sensibilização, lavou-se com PBS e realizou-se o bloqueio dos sítios não sensibilizados da placa com PBS-leite 5%. Incubou-se durante 2 horas a 37ºC em câmara úmida. Em seguida, as placas foram incubadas por 1h à 37ºC com diluição seriada do soro dos animais, controle positivo (*pool* de soros imunes) e controle negativo (*pool* de soros não imunes). Posteriormente, as placas foram lavadas e incubadas com conjugado composto por anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (*Rabbit anti-Mouse IgG [H+L] HPR Conjugate, Zymax, USA*) na diluição 1:10000, 1:15000 , 1:20000 e 1:30000 nos ensaios de padronização, sendo novamente incubadas por 1h à 37ºC.

A seguir, as placas foram lavadas com PBS e incubadas com peróxido de hidrogênio (*Abbott*) e tetrametilbenzidina (TMB - *Abbott*) por 30 minutos. A reação foi bloqueada com HCl 2N e a leitura foi efetuada em aparelho de *ELISA* no comprimento de onda de 450 nm.

4. RESULTADOS

Foi observado um bom crescimento e desenvolvimento de *P. brasiliensis* em meio Sabouraud líquido, com 25 dias de cultivo.

No Gráfico 1 apresentado abaixo, relacionamos as densidades ópticas (DO) com a quantidade de proteínas presentes no extrato protéico de *P. brasiliensis*. Desta maneira, a partir da reta e equação obtida do gráfico, e com os valores de densidade óptica obtidos após ensaio de dosagem de proteínas, foi possível determinar a concentração de proteínas presente no extrato protéico de *P. brasiliensis* em µg/ml, correspondente aos diferentes *pellets* obtidos, como representado na Tabela 1.

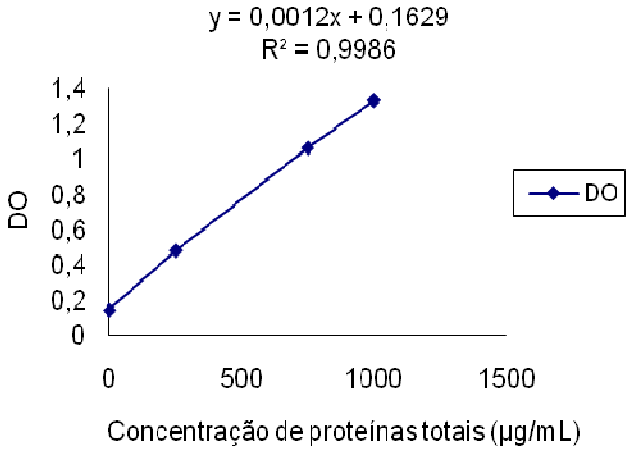


Gráfico 1: Determinação de proteínas totais do extrato protéico obtido a partir do pellet de 9,5 mL.

Tabela 1: *Pellet* (ml) correspondente a concentração de proteína total obtida após *extração*.

Extração	Pellet (mL)	Dosagem protéica (µg/mL)
1ª extração	5	265,77
2ª extração	9,5	137,81
3ª extração	6	540,00
4ª extração	4	51,75

Na Tabela 1 observamos que a quantidade de Proteínas totais determinada com a dosagem pelo *kit (BCA™ Protein Assay Kit –PIERC)* não corresponde de forma proporcional a massa de *pellet* usada na extração. Buscando melhorar esse rendimento, realizamos algumas alterações na técnica de obtenção do extrato protéico, que compreendeu basicamente as alterações: primeiro da centrifugação realizada para a recuperação do *pellet*, de 6000 rpm por 15 min a TA para 4000 rpm por 10 minutos a 4°C, e segundo o pellet foi tratado com formalina tamponada

5 % a uma diluição de 1:10, seguida de repouso por uma hora e agitação em vórtex.

As imunizações foram corretamente realizadas, e avaliadas através do ensaio de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (*ELISA*) indireto no 40º dia.

Na tentativa de avaliar o perfil dos anticorpos produzidos contra os constituintes do *P. brasiliensis*, realizamos três ensaios de ELISA em diferentes períodos, usando diluições de 1:500 e posteriormente de 1:50 dos soros dos animais imunizados. As leituras de densidades ópticas obtidas não diferiram daquelas do controle negativo, soro de animais não imunizados com o extrato protéico do fungo (Dados não demonstrados).

Diante desses resultados infrutíferos, posteriormente decidimos realizar outro esquema de imunização. Neste procedimento, formamos outro grupo de animais, três (3) camundongos foram inoculados com 100 µg de extrato protéico de *P. brasiliensis* associado a mesma concentração do adjuvante, o hidróxido de alumínio. As diferentes inoculações foram realizadas por um período de três semanas, por via intraperitoneal, sendo uma inoculação por semana. A sangria total realizada na quarta semana, e o soro fracionado e armazenado a – 20◦C.

Na Tabela 2 e Gráfico 2 abaixo, mostramos esses resultados obtidos, quando da realização do ensaio de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (*ELISA*), usando diferentes concentrações do extrato protéico e diluições do conjugado (anti –IgG murina associado a peroxidase), mas mantendo a diluição do *pool* de soros dos animais imunizados e não imunizados na diluição 1:50.

Tabela 2: Densidade ótica *pool* de soros de camundongos imunizados com *P. brasiliensis* e não imunizados, com diferentes concentrações do extrato protéico de Pb.

	Soro de cdgs imunizados			Soro de cdgs não imunizados		
Conjugado/ diluições	**5µg/mL**	**10µg/mL**	**20µg/mL**	**5µg/mL**	**10µg/mL**	**20µg/mL**
1:10000	0,478	0,600	0,565	0,406	0,368	0,316
1:15000	0,405	0 ,399	0,385	0,289	0,250	0,218
1:20000	0,295	0,308	0,276	0,215	0,201	0,178
1:30000	0,218	0,207	0,211	0,163	0,147	0,125

cdgs: camundongos

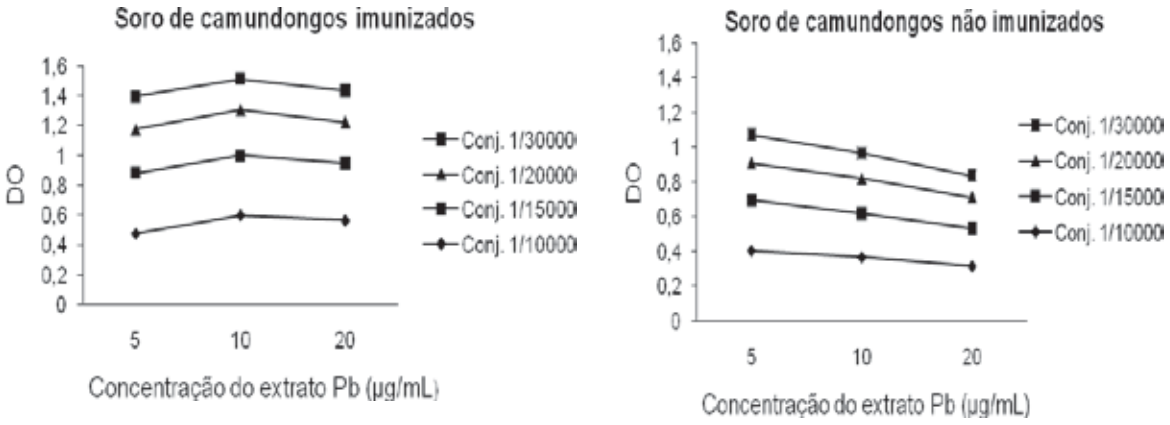


Gráfico 2: Absorbâncias das amostras de soros de camundongos Balb/c imunizados com *P. brasiliensis* com diferentes concentrações do extrato protéico.

Podemos verificar que não obtivemos diferenças significativas entre as densidades ópticas dos soros de animais imunizados comparado com aquelas obtidas com os soros do grupo de animais não imunizados.

Na Tabela 3 abaixo, mostramos a razão entre as densidades óticas (DO) dos soros das amostras dos animais imunizados e dos não imunizados.

Tabela 3: Razão entre densidades óticas dos soros de animais imunizados e não imunizados

Conjugado / Diluições	5µg/ml	10µg/ml	20µg/ml
1:10000	1,2	1,6	1,8
1:15000	1,4	1,6	1,8
1:20000	1,4	1,5	1,5
1:30000	1,3	1,4	1,7

Essa Tabela nos indica, que a melhor concentração do extrato protéico para a realização do ensaio parece ser a de 20 µg/ml e a diluição do conjugado são as de 1:10000 e 1:15000, apresentando os valores absolutos maiores do quociente entre as leituras de densidades ópticas do grupo de animais imunizados e aqueles não imunizados.

5. DISCUSSÃO

O crescimento de *P. brasiliensis* em meio Sabouraud líquido foi satisfatório. Houve predomínio de pequenos agregados arredondados, de consistência cremosa com média dispersão e turbidez razoável. A morfologia das colônias obtidas mostrou-se basicamente floculiforme e as células formaram agregados característicos de aparência variada como esféricos, ovóides, pequenos, grandes ou planos, sendo estas as principais características micromorfológicas da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* cultivada a 36 ºC como também foi descrito no trabalho de Caroline Souza e Vilasboas (2005).

Quanto ao método de produção de extrato protéico formolizado, foi possível observar que, mesmo o extrato sendo fixado em formol tamponado a 5% obtivemos uma baixa concentração de proteínas totais, não significando necessariamente um

baixo rendimento e sim a maior eliminação de proteínas próprias do meio de cultivo, o que pode ser o resultado de lavagens mais cuidadosas.

A contaminação com outros constituintes do meio de cultivo do fungo, poderia explicar, que apesar da quantidade de proteína inoculada no camundongo, 20 µg e 100 µg, serem suficientes para induzir a produção de anticorpos em camundongos Balb/c imunizados com proteínas purificadas associadas aos mesmos adjuvantes (Nunes et al. 2008), os extratos produzidos a partir da cultura de *P. brasiliensis* apresentaram baixa imunogenicidade.

Outro fator que deve também ser considerado para explicar a baixa imunogenicidade dos extratos obtidos, é a presença de enzimas proteolíticas próprias do fungo apontando para a possível necessidade do uso de proteases inibitórias, que não foram utilizadas nesse estudo.

Baseado no grupo funcional presente no sítio ativo, as proteases são classificadas dentro de quatro grupos, serino-proteases, aspartil -proteases, cisteíno-proteases e metalo-proteases (SILVA, et al., 2002). A seleção dos inibidores das proteases depende do tipo e da sua distribuição subcelular. Quando a principal atividade proteolítica é citosólica é fundamental que os próprios agentes inibidores sejam absorvidos para a célula, o que não é fácil visto ser estes compostos normalmente demasiado grandes ou hidrofílicos para atravessar as membranas biológicas (SILVA, et al, 2002).

A TLCK (1-cloro 3 tosilamido 7-amino-2 heptanona) é um exemplo de inibidor de proteases utilizada devido sua atividade sobre a cisteíno-protease (MENDONÇA, 2008). Pode-se citar também PMSF (fenilmetilsulfonilflúor), inibidor de serino-protease e metalo-protease; iodoacetamida, inibidor de cisteíno-protease; PCMB (cloromercuriobenzoato) inibidor de cisteíno-protease; ou mesmo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) inibidor de colagenase e metalo-protease (REZENDE, 2006), sendo todos amplamente utilizado em pesquisas.

Nossos resultados apontam para a baixa imunogenicidade dos extratos protéicos do *P. brasiliensis* produzidos em nosso laboratório, já que não foi possível induzir a produção de anticorpos específicos para o *P. brasiliensis* .

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S**. Imunologia cellular e molecular**. 5ª ed. Livraria e Editora Revinter Ltda, 2005.

BAGAGLI, E., BOSCO, S. M. G., THEODORO, R. C. & FRANCO, M. P. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infection, Genetics and Evolution**. são Paulo, p.125-129, 2006.

CAMARGO, Z. P. & FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana de Micología**. São Paulo, p. 41 – 48, 2000.

GUPTA, R.K. et. al. Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity. Vaccine, n. 11, p.293–306, 1993.

JANEWAY, C. A. et. al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5ª ed. Porto Alegre, ARTMED, p. 767, 2002.

MÈNDEZ, I.Z.R.; SHI, Y.; HOGENESCH, H. ; HEM,S. L. Potentiation of the immune response to non-adsorbed antigens by aluminum-containing adjuvants. Article in press.Vaccine, 2006. (doi:10.1016/j.vaccine.2006.09.039).

MENDONÇA, E. G. **Propriedades bioquímicas e cinético-enzimáticas de cisteíno-proteases do intestino médio da lagarta da soja**. 2008. 48 f. Tese (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MONICA, O. S. **Caracterização da N-acetil-β D-glicosaminidase de *Paracoccicioides brasiliensis***. 2007. 68 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

NETO, V.A.; BALDY, J.L.S.; SILVA, L.J. **Imunizações**. 3ª ed. São Paulo: SARVIER, p. 274, 1991.

NUNES, M. V. O. et al. Comparação do perfil de anticorpos anti 2 imunoglobulina G em murinos imunizados com IgG 3 humana associada a diferentes adjuvantes. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, p. 44-50, v. 6, n. 1, 2009.

REZENDE, T. C. V. **Identificação de um novo Antígeno de *Paracoccidioides brsiliensis* (Lumazina Sintase) através da Técnica de IVIAT**. 2006. 137 f. Tese (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

SANTOS, O. M. **Caracterização da N-acetil-β D-glicosaminidase de *Paracoccicioides brasiliensis***. 2007. 68 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Coimbra, v. 38, n. 2, p. 16, abr./jun., 2002.

SILVA, M. J.L.; ANDREOTTI, P.F. e MENDES-GIANNINI, M.J.S. Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células endoteliais, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, p. 149-156, v. 26, n.2, 2005.

SOUZA, C. & VILASBOAS. **Morfologia e clonalidade de *Paracoccidoides brasiliensis***. 2005. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) –Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2005.

TAVARES, A. H. F. P. **Perfil Transcricional de *Paracoccidoides brasiliensis* em resposta a fagositose por macrófagos murinos**. 2007. 115 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

ESTUDO RANDOMIZADO, COMPARANDO O USO DO 2-OCTIL CIANOACRILATO AO NYLON 4-0 APÓS A RESSECÇÃO DE LESÕES MAMÁRIAS

Régis Resende Paulinelli[1], Suzana Esteves Silva[2], Ruffo de Freitas Júnior[1], Rosemar Macedo Sousa Rahal[1], Alexandre Vieira Santos Moraes[1], Thiago Silva Becker[1], Danielle Cristina Netto Rodrigues[1], Victor Domingos Lisita Rosa[2].

[1] Programa de Mastologia do Hospital das Clínicas da UFG;

[2] Faculdade de Medicina da UFG

Email: suzanaesteves84@hotmail.com

Palavras Chaves: lesões mamárias, cicatriz cirúrgica, 2-octilcianoacrilato.

INTRODUÇÃO

A cada ano milhares de pacientes necessitam de reparação tecidual em alguma região do corpo sendo tal procedimento realizado tanto eletivamente quanto emergencialmente. Algumas preocupações clínicas são muitas vezes colocadas em primeiro plano ao se realizar uma sutura, como por exemplo, a infecção e a deiscência, porém além destes fatores, os pacientes também esperam por um resultado estético satisfatório em longo prazo[1].

A cirurgia é um procedimento médico complexo composto por etapas – preparação, assepsia, diérese, hemostasia, manipulação e síntese – cada qual com sua importância. A escolha do material para sutura é essencial no sucesso pós-operatório. Uma síntese bem feita mantém a borda da incisão operatória bem coaptada, acelerando o processo de cicatrização, evita infecção, diminui a dor pós-operatória, além de prevenir hemorragias e a penetração de corpos estranhos[2].

Os fios de sutura, embora possam causar irritação ao tecido lesado, são resistentes à tração e à torção, flexíveis, pouco elástico, de fácil esterilização e baixo custo.

Os adesivos para a síntese a base de 2-octilcianoacrilato tem despertado atenção dos cirurgiões por ser uma maneira simples, rápida e de fácil manuseio. Essa substância apresenta um grande potencial adesivo, além de ser bacteriostático

e biodegradável, promove a hemostasia e mantém a posição do tecido lesado, sem acarretar efeitos colaterais indesejáveis[3].

O 2-octilcianoacrilato tem sido utilizado, em medicina, como agente adesivo de pele e mucosa principalmente em cirurgias plásticas faciais, otorrinolaringológicas, retalhos gengivais, lacerações mucosas e cutâneas. Em pacientes pediátricos o uso do adesivo é bastante satisfatório, pois diminui a utilização da anestesia e dispensa a retirada dos pontos[4, 5].

Os adesivos teciduais são de fácil manuseio e aplicação, não ocasionam ansiedade decorrente da retirada dos pontos, diminuem a utilização de instrumentos cirúrgicos (agulhas) e os custos e riscos devido à manipulação desses materiais perfuro-cortantes, e reduz o tempo cirúrgico[6]. Apesar da grande efetividade na sutura de feridas superficiais e de baixa tensão, o octilcianoacrilato não substitui a síntese dos planos profundos e não pode ser utilizado em áreas com infecção, feridas úmidas e gangrenadas[5].

Torna-se importante ressaltar que o adesivo ideal deve ser seguro, de fácil aplicação, polimerizar rapidamente, manter as bordas da ferida aproximadas e evertidas para uma cicatrização efetiva e consequente resultado estético satisfatório, e por fim promover reação inflamatória local mínima[1]. Diante dessas características o 2-octilcianoacrilato, também conhecido como Dermabond®, teria boa aceitação por parte dos cirurgiões.

O uso do 2-octilcianoacrilato na prática médica ainda é objeto de estudo quanto a efetividade e possíveis complicações. Não obstante, tem sido utilizado como agentes adesivos de pele e mucosa, principalmente em cirurgias plásticas faciais, otorrinolaringológicas, retalhos gengivais e na odontologia, obtendo até o presente momento resultados satisfatórios[3].

O 2-octilcianoacrilato, derivado de cianoacrilato de cadeia longa, é um material biodegradável de grande potencial adesivo, hemostático e que preserva a posição dos tecidos lesados, mostrando assim ser mais forte e flexível e menos tóxico que os derivados de cadeia curta[6]. Destaca-se ainda o potencial bactericida dos adesivos cirúrgicos dispensando a necessidade de esterilização desta substância, além de apresentar uma resposta inflamatória inferior aos fios de sutura convencionais[7].

Em estudos prévios o octilcianoacrilato mostrou resultados similares ao uso do nylon em relação à deiscência, infecção (embora o mesmo tenha uma ação

contra bactérias Gram+ demonstrada tanto *in vitro* quanto *in vivo*), estética e como vantagem apresentou menor tempo gasto no procedimento e comodismo ao paciente que não precisa retornar para retirada de pontos[5-7].

OBJETIVOS

Geral:

1. Observar o resultado estético e a efetividade do 2-octilcianoacrilato como adesivo cirúrgico para fechamento da pele após ressecção de lesões mamárias, em comparação ao uso do fio de nylon 4-0 em sutura intradérmica.

Específicos:

1. Comparar o resultado estético da cicatriz de ressecções de lesões de mama, utilizando o 2-octilcianoacrilato com o nylon 4-0, na síntese da pele.
2. Comparar a largura da cicatriz cirúrgica com o uso do 2-octilcianoacrilato no fechamento da pele em humanos.
3. Comparar as complicações (hematoma, infecção, deiscência da ferida e reação alérgica) utilizando o 2-octilcianoacrilato com o nylon 4-0, no fechamento da pele em humanos.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo randomizado aberto comparando 2-octilcianoacrilato versus a sutura intradérmica com mononylon 4-0, nas suturas provenientes de ressecções de lesões mamárias. Foram incluídas pacientes oriundas do Programa de Mastologia do Hospital das Clínicas da UFG (HC-UFG) submetidas à ressecção de lesão de mama que aceitaram participar de forma voluntária após consentimento livre e esclarecido e que concordaram em comparecer nas visitas planejadas de avaliação. Foram excluídas pacientes diabéticas, com história de quelóide, imunossuprimidas ou que eram reconhecidamente alérgicas aos componetes do cianoacrilato ou formaldeído.

As pacientes foram randomizadas aleatoriamente através de sorteio, sendo que inicialmente o responsável pela avaliação clínica, não tinha conhecimento sobre o método utilizado para o fechamento.

O tempo gasto no fechamento da pele foi avaliado com o auxílio de um cronômetro e anotado em ficha própria. Após sete dias, as incisões foram analisadas quanto à ocorrência de hematomas, infecção, deiscência da sutura e reações alérgicas. Após 40 dias, o resultado estético de cada incisão foi avaliado como ruim (cicatriz larga e hipertrófica), regular (larga ou hipertrófica), bom (fina e plana) e ótimo (cicatriz quase imperceptível). A largura da cicatriz foi medida com uma régua precisa em milímetros com uma casa decimal, e todos os dados anotados em ficha própria.

As seguintes variáveis foram consideradas para análise de associação:

→ Idade da paciente: em anos completos por ocasião de sua entrada no estudo.

→ Tamanho do nódulo ou lesão mamária: mensurado por paquímetro, no maior diâmetro e expresso em milímetros.

→ Hematoma: Área endurecida, arroxeada na região da ferida operatória após sete dias da cirurgia. Será classificado como maior ou igual a 1 cm, menor que 1 cm, ou ausente.

→ Deiscência da sutura: Ausência de coaptação das bordas da ferida após sete dias da cirurgia. Será classificada como maior ou igual a 1 cm, menor que 1 cm, ou ausente.

→ Infecção: Reação inflamatória observada na ferida operatória após sete dias da cirurgia, podendo estar ausente, apresentar eritema e calor evidentes, ou formar abscesso, caracterizado por secreção purulenta na ferida operatória.

→ Reação alérgica: Será observado após sete dias da cirurgia, se houve formação de eczema ou não na região da cola ou dos pontos, caracterizado por área de eritema e descamação, com bordos circinados e bem definidos.

→ Aspecto da cicatriz: A ferida operatória será observada após 40 e 180 dias, e o aspecto será considerado como ruim, quando a mesma apresentar-se larga e hipertrófica; razoável, quando a mesma apresentar-se larga ou hipertrófica; bom, quando se apresentar fina e plana; ótimo, quando a cicatriz estiver quase imperceptível.

→ Largura da cicatriz: Será medida com uma régua subdivida com marcações milimétricas, após 40 e 180 dias da cirurgia.

Após o esclarecimento de dúvidas porventura existentes, as pacientes eram convidadas a participar do estudo. Havendo o consentimento livre e esclarecido era realizado o sorteio. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, conforme parecer do processo 014/2005.

RESULTADOS

Foram incluídas 40 pacientes no estudo até o presente momento, sendo 19 randomizadas para o grupo 'nylon' e 21 pacientes para o grupo 'adesivo'.

A idade das pacientes incluídas no grupo 'nylon' variou de 18 a 60 anos com média de 36,6 anos. O tamanho tumoral variou de 11 a 47 mm com média de 24,6 mm. Oito pacientes apresentaram lesão na mama direita enquanto onze pacientes apresentaram na mama esquerda (figura 01). A incisão periareolar foi predominante com dez casos, enquanto as incisões em quadrante superior externo (QSE), inferior externo (QIE) e superior interno (QSE) apresentaram três casos cada (figura 02). O tamanho de incisão variou de 14 a 50 mm com média de 29,63 mm.

Figura 01. Mama acometida com lesão tumoral – grupo'nylon'.

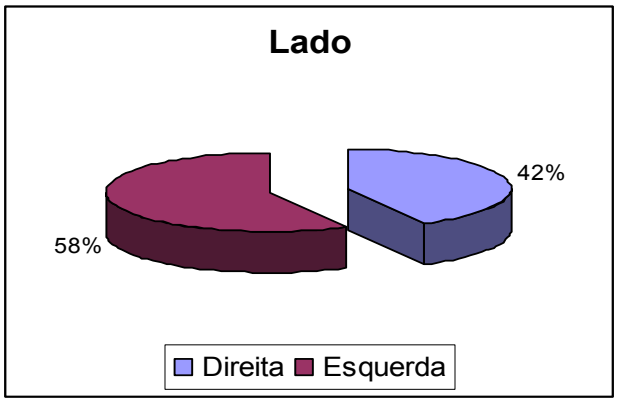
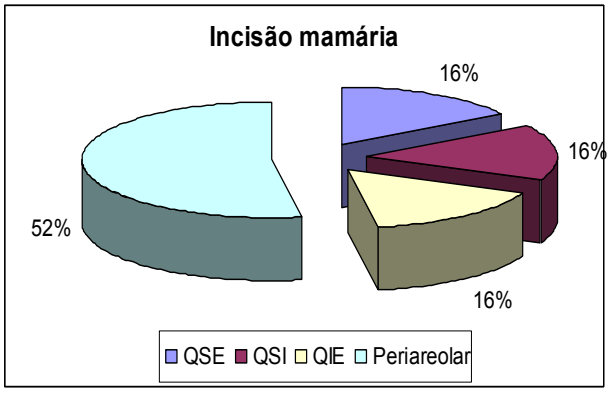


Figura 02. Localização da incisão mamária - grupo'nylon'



No grupo randomizado para o método 'adesivo' foram incluídas vinte e uma pacientes. A média de idade destas pacientes foi de 33,9 anos, variando de 18 a 67 anos. Treze pacientes apresentaram lesão em mama esquerda enquanto que nove pacietes apresentaram em mama direita. A variação do tamanho tumoral foi de 7 a 40 mm com média de 20 mm de tumor. Doze pacientes foram submetidas à incisão periareolar, enquanto que em quatro pacientes a incisão localizou-se em QIE, três em QSE, uma paciente em QSI e uma em QII. O tamanho da incisão tumoral variou de 16 a 70 mm com média de 34,1 mm.

Figura 03. Mama acometida com lesão tumoral – grupo 'adesivo'

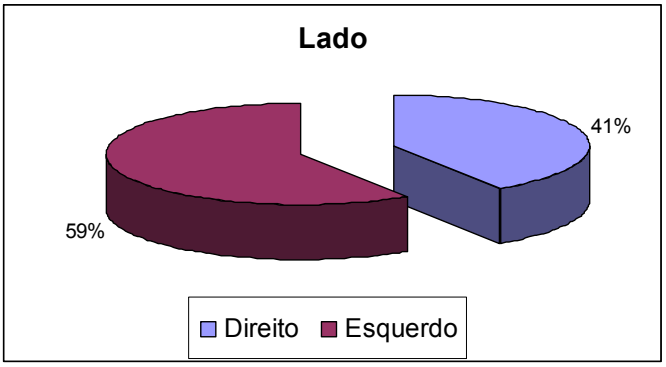
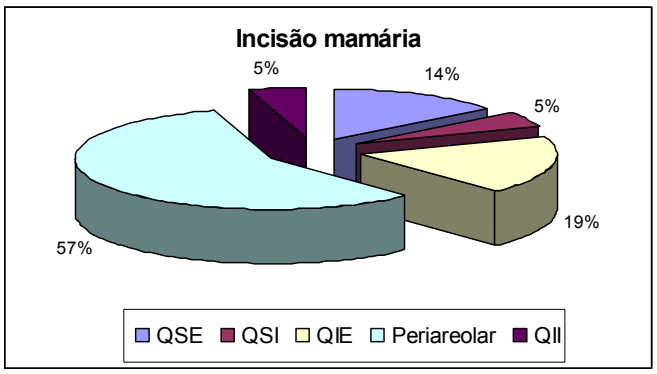


Figura 04. Localização da incisão mamária – grupo 'adesivo'.



Todas as pacientes incluídas na pesquisa compareceram à revisão de 7 dias após a cirurgia sendo que no grupo 'nylon' houve quatro casos de hematoma (21,1%), um caso de eritema e calor (5,3%), e um caso de deiscência (foto 01-a), sendo esta menor que 1cm. No grupo 'adesivo' apenas uma paciente apresentou hematoma (4,8%), nenhum caso característico de infecção, entretanto nove pacientes apresentaram deiscência na cicatriz cirúrgica (42,9%), sendo três casos de deiscência maior ou igual a 1cm e seis casos menor que 1cm (foto 01-b). Em nenhuma paciente do estudo foi detectado qualquer tipo de reação alérgica aos

métodos propostos. Na tabela 01, mostram-se os resultados comparativos entre os casos de hematoma e deiscência nos grupos 'nylon' e 'adesivo'.

Foto 01. Casos de deiscência em pacientes do estudo.

(a) Paciente do grupo 'nylon' **(b) Paciente do grupo 'adesivo'.**



Tabela 01. Resultados comparativos das variáveis hematoma e deiscência na revisão de 7 dias após a cirurgia, valores de *odds ratio* com intervalo de confiança.

Variáveis	Condição	Adesivo (n=21) N(%)	Nylon (n=19) N(%)	OR (IC=95%)
Hematoma	Sim	01(4,8%)	4 (21,1%)	0,19 (0,02-1,85)
	Não	20 (95,2%)	15 (78,9%)	
Deiscência	Sim	09 (42,9%)	01 (5,3%)	
	Não	12 (57,1%)	18 (94,7%)	**13,5 (1,51-120,79)**

Na revisão de 40 dias compareceram quatorze pacientes do grupo 'nylon' e dezessete pacientes do grupo 'adesivo', sendo então analisado o aspecto da cicatriz de acordo com a largura e espessura. Dentre as pacientes do grupo 'adesivo' duas foram classificadas como cicatriz de aspecto ruim (11,8%), quatro de aspecto razoável (23,5%), seis de aspecto bom (35,3%) e cinco classificadas como ótimo (29,4%). A largura da lesão variou de 0,5 a 6 mm com média de 1,96 mm. No grupo 'nylon', duas pacientes tiveram suas cicatrizes consideradas como de aspecto ruim (11,8%), uma como razoável (7,2%), seis com aspecto bom (42,8%) e cinco

pacientes com aspecto ótimo (35,7%). A largura da lesão das pacientes deste grupo variou de 0,5 a 5 mm sendo a média de 1,57 mm. A tabela a seguir compara-se o aspecto da cicatriz das pacientes dos dois grupos do estudo.

Tabela 02. Distribuição das variáveis sobre aspecto da cicatriz na revisão de 40 dias após a cirurgia, valores de *odds ratio* com intervalo de confiança.

Variáveis	Condição	Adesivo (n=17) N(%)	Nylon (n=14) N(%)	OR (IC=95%)
Aspecto	Ruim	2 (11,8%)	2 (14,3%)	1,06 (0,13-8,47)
	Regular	4 (23,5%)	1 (7,2%)	4,00 (0,39-40,80)
	Bom	6 (35,3%)	6 (42,8%)	0,73 (0,17-3,11)
	Ótimo	5 (29,4%)	5 (35,7%)	0,75 (0,17-3,40)

Na revisão de 180 dias compareceram treze pacientes de cada grupo para análise do aspecto cicatricial conforme largura e espessura. No grupo 'adesivo' uma paciente foi classificada como cicatriz de aspecto ruim (7,7%), duas de aspecto razoável (15,4%), oito de bom aspecto (61,5%) e duas classificadas como ótimo (15,4%). A largura da lesão destas pacientes variou de 0,5 a 6 mm com média de 1,9 mm (foto 02). No grupo 'nylon' uma paciente apresentou cicatriz de aspecto ruim (7,7%), duas como razoável (15,4%), cinco com aspecto bom (38,4%) e outras cinco pacientes com aspecto ótimo (38,4%). Neste grupo a largura variou de 0,5 a 9 mm com média de 1,94 mm (foto 03). A tabela a seguir compara-se o aspecto da cicatriz das pacientes dos dois grupos do estudo na revisão de 180 dias.

Tabela 03. Distribuição das variáveis sobre aspecto da cicatriz na revisão de 180 dias após a cirurgia, valores de *odds ratio* com intervalo de confiança.

Variáveis	Condição	Adesivo (n=13) N(%)	Nylon (n=13) N(%)	OR (IC=95%)
Aspecto	Ruim	1 (7,7%)	1 (7,7%)	1,06 (0,13-8,47)
	Regular	2 (15,4%)	2 (15,4%)	4,00 (0,39-40,80)
	Bom	8(61,5%)	5 (38,4%)	0,73 (0,17-3,11)
	Ótimo	2 (15,4%)	5 (38,4%)	0,75 (0,17-3,40)

Foto 02. Análise estética de uma paciente do grupo 'adesivo' em revisão de 7, 40 e 180 dias.



Foto 03. Análise estética de uma paciente do grupo 'nylon' em revisão de 7, 40 e 180 dias.



DISCUSSÃO

Vários materiais para realização de sutura já foram descritos desde as civilizações mais antigas, como a grega e a romana. Visto que, até hoje há uma grande preocupação com o fechamento das feridas e com a efetiva regeneração dos tecidos lesados. A escolha do material para estabelecer uma boa síntese dos tecidos é extremamente importante objetivando-se manter os tecidos bem coaptados, evitar hemorragias e infecção pós-operatória, diminuir a dor no pós-operatório e prevenir a penetração de substâncias que podem infectar ou lesar o tecido.

Diversos autores descrevem a irritação dos tecidos como conseqüência da síntese com fios de sutura, embora estes têm se mostrado resistentes à tração e torção de pele, são de fácil esterilização e de baixo custo. A escolha do material de sutura adequado requer uma avaliação dos aspectos pré, trans e pós-operatório para efetiva resposta biológica dos tecidos lesados.

O fio de nylon, comparado aos outros fios de sutura é o que apresenta melhor efetividade cicatricial e capacidade de coaptação das bordas da ferida. O

octilcianoacrilato possui uma força de quebra parecido com a da sutura convencional, além de não haver relato quanto a toxicidade ou carcinogênese, e apresentou-se com resultados estéticos e cicatriciais em cirurgia buco-maxilo-facial[4,9], em crianças devido a dispensa da anestesia e na remoção da sutura no pós-operatório[9].

Nos estudos clínicos avaliando a histologia da lesão cicatricial, o uso de adesivo mostrou-se com uma maior organização tecidual das fibras de colágenos quando comparado ao uso de fios de suturas convencionais, principalmente no 14º dia de pós-operatório[3].

No presente estudo foi utilizada a razão de produtos cruzados (*odds ratio*), que revelou que o uso de 2-octilcianoacrilato é um fator de risco para o desenvolvimento de deiscências em cicatrizes cirúrgicas no sétimo dia após ressecção de lesões mamárias, contudo não houve relação entre o aspecto cicatricial e o método escolhido na revisão de 40 e 180 dias.

Alguns estudos sugerem que o 2-octilcianoacrilato possa diminuir a taxa de infecção operatória comparada ao nylon[6, 8,10]. Entretanto, os resultados deste estudo mostraram-se semelhante em ambos os grupos uma vez que não houve nenhum caso descrito de infecção operatória.

Outra grande vantagem relatada na literatura em relação ao uso do adesivo cirúrgico é que este diminui consideravelmente o tempo operatório, além de não necessitar da remoção do fio de sutura no pós-operatório, diminuindo a ansiedade e desconforto dos pacientes[7, 10,11]. Os resultados em relação ao tempo cirúrgico serão apresentados ao final da pesquisa.

Apesar do grande número de deiscência da ferida operatória das pacientes randomizadas para o uso do 2-octilcianoacrilato, a amostra estudada pode ter sido insuficiente para se obter uma conclusão definitiva a esse respeito. Assim o grupo se propõe a continuar o projeto, aumentado o tamanho amostral na tentativa de diminuir os vieses que possam ocorrer.

CONCLUSÃO

Os resultados parciais deste estudo mostraram que o uso de 2-octilcianoacrilato em sínteses cirúrgicas de lesões mamárias benignas se mostrou semelhantes ao fio de sutura nylon 4-0 no aspecto estético final quando avaliado a largura e espessura da lesão, porém um maior número de casos de deiscência inicialmente foi detectado com este método.

Apesar de estatisticamente não haver significativa relação entre o uso de adesivo cirúrgico e um melhor resultado estético cicatricial como proposto em diversos estudos prévios, o nosso grupo se propõe a analisar um maior número de casos para se obter uma análise fidedigna dos reais resultados estéticos.

REFERÊNCIAS

1. ELLIS DAF, SHAIKH A. The ideal tissue adhesive in facial plastic and reconstructive surgery. J Otolaryngol 1990; 19: 68.
2. REITER D. Methods and materials for wound closure. Otolaryngol Clin North Am 1995; 285: 1069.
3. OLIVEIRA E CRUZ GA, FREITAS RS, FILLUS NETO J, TOLAZZI ARD, GROTH AK, BIONDO-SIMÕES MLP. Avaliação da integração de enxerto de pele com a utilização do 2-octilcianoacrilato: estudo experimental em ratos. Acta Cir Bras 2000; 15(supl.3): 58-60
4. PEREIRA MGB, BESSA H. Uso de cola sintética em cirurgia oculoplástica. Rev Bras Oftal 2000; 59: 168-171
5. MAW JL, QUINN JV, WELLS GA et al. A prospective comparison of octylcyanoacrylate tissue adhesive and suture for the closure of head and neck incisions. J Otolaryngol 1997; 26: 26.
6. QUINN JV, WELLS GA, SUTCLIFFE T et al. A randomized trial comparing octylcyanoacrylate tissue adhesive and sutures in the management of lacerations. JAMA 1997; 277: 1527.
7. TORIUMI DM, O'GRADY K, DESAI D, BAGAL A. Use of octyl-2-cyanoacrylate for skin closure in facial plastic surgery. Plast Reconst Surg 1998; 102: 2209-2219
8. SINGER AJ, CHURCH AL, FORRESTAL K, WERBLUD M, HOLLANDER JE. Comparison of patient and practioner sactisfaction with wound

appearance after traumatic wound repair. Acad Emerg Med 1997, 4: 133-137.

9. FERREIRA OS, et al. Uso de adesivo de n-butil-cainoacrilato para imobilização de retalho posicionado coronalmente – estudo clínico controlado. Braz Oral Res 2004; 8 (suppl.): 87
10. FREITAS-JÚNIOR R, PAULINELLI RR, RAHAL RMS, et al. Estudo experimental comparando o uso do 2- octilcianoacrilato ao nylon 4-0 na sutura da pele.Rev Col Bras Cir. 2008; 35(3): 194-198.
11. SINGER AJ, THODE HC Jr. A review of the literature on octylcyanoacrylate tissue adhesive. Am J Surg. 2004; 187(2): 238-48.

Detecção do RNA-HCV e genotipagem do vírus da hepatite C em usuários de drogas ilícitas em Campo Grande-MS e Cuiabá-MT

Thaís Augusto Marinho[a], Carmen Luci Rrodrigues Lopes[a], Regina Maria Bringel Martins[b]

[a]*Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74605-080 , Brasil*

[b]*Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74605-050, Brasil*

E-mail: rbringel@iptsp.ufg.br

Palavras-chave: vírus da hepatite C, usuários de drogas; genótipos

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é considerada um importante problema de saúde pública mundial. Estima-se que cerca de 130 a 170 milhões de pessoas estejam infectadas por esse vírus. A hepatite C aguda geralmente se apresenta de forma assintomática, no entanto a maioria dos casos (85%) evolui para cronicidade, podendo levar ao desenvolvimento de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. Atualmente, a via parenteral é o principal meio de transmissão da infecção pelo HCV, o que tem resultado na prevalência elevada em adultos jovens, cujo fator de risco mais importante é o uso de droga injetável (ALTER, 2007; LAVANCHY, 2009).

O HCV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus* (ICTV, 2006). A partícula viral é esférica, com aproximadamente 50 nm de diâmetro e apresenta envelope lipídico. O genoma viral consiste de uma molécula de RNA fita simples de polaridade positiva, medindo aproximadamente 9,7 kilobases de comprimento. Possui uma região aberta de leitura com potencial para codificar uma poliproteína precursora com cerca de 3.000 aminoácidos, que é clivada por proteases celulares e virais, resultando nas proteínas estruturais (core e envelope/E1 e E2) e não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) do vírus (SIMMONDS, 2004; SUZUKI *et al.*, 2007). Uma pequena proteína, denominada p7, está localizada entre as proteínas E2 e NS2, cuja classificação não está bem definida (GRIFFIN *et al.*, 2004; HAQSHENAS *et al.*, 2007).

A diversidade genética do HCV e distribuição geográfica variável de seus genótipos no mundo são características relevantes para o estudo epidemiológico da infecção causada por esse vírus. O HCV é classificado em seis genótipos (1-6), que diferem em 30-50% nas seqüências de nucleotídeos, e em múltiplos subtipos, que

mostram entre si variabilidade de 15-30%. Os genótipos 1, 2 e 3 têm distribuição mundial, enquanto os demais (4, 5 e 6) são restritos a algumas áreas geográficas (SIMMONDS *et al.*, 2005; SY, JAMAL, 2006). Desse modo, os genótipos e subtipos do HCV representam importantes marcadores epidemiológicos dessa infecção, e ainda têm implicações no diagnóstico e tratamento, bem como no desenvolvimento de vacina para hepatite C (MYRMEL *et al.*, 2009; SIMMONDS *et al.*, 2005; SY, JAMAL, 2006).

Tem sido de notável relevância a participação dos usuários de drogas injetáveis (UDI) na epidemiologia da hepatite C, demonstrando que o uso de seringas e agulhas contaminadas constitui, atualmente, o principal fator de risco para a infecção causada pelo HCV (CAIAFFA *et al.*, 2006; LIDMAN *et al.*, 2009; GYARMATHY *et al.*, 2009; SWEETING *et al.*, 2009). Desse modo, estudos realizados em usuários de drogas ilícitas, que apresentam taxas de prevalência considerando separadamente os usuários injetáveis e não injetáveis (UDNI), demonstram índices superiores para os primeiros (BAO; LIU, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2006; MARINHO *et al.*, 2008; VICKNASINGAN *et al.*, 2009). No Brasil, a prevalência verificada em usuários de drogas injetáveis varia de 16,8% a 88,0% (GALPERIM *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Na população de usuários de drogas não injetáveis as taxas reportadas por alguns estudos, no Brasil, variam de 2,0% a 2,5% (BASTOS *et al.*, 2000; GALPERIM *et al.*, 2004; NUNES *et al.*, 2007). Essas taxas indicam que os UDNI também apresentam risco aumentado em adquirir a infecção causada pelo HCV quando comparados à população geral (MARTELLI *et al.,* 1999). O risco aumentado que esses usuários apresentam deve-se ao compartilhamento de instrumentos contaminados com sangue para uso de drogas inalatórias e/ou por outros comportamentos de risco (AARON *et al.*, 2008; MACÍAS *et al.*, 2008; MCMAHON *et al.*, 2004; TORTU *et al.*, 2004).

Os usuários de drogas ilícitas influenciam na circulação dos genótipos do HCV, considerando os diferentes tipos/subtipos predominantes em cada região e as rotas de transmissão estabelecidas (COCHRANE *et al.*, 2002; VAN ASTEN *et al.,* 2004). Foram verificadas freqüências elevadas dos genótipos 1 (subtipo 1a) e 3 (subtipo 3a) em usuários de drogas ilícitas de diferentes regiões do mundo (ALZAHRANI *et al.*, 2009; KREKULOVÁ *et al.*, 2009; LIDMAN *et al.*, 2009; MATHEI *et al.*, 2005; MICALESSI *et al.*, 2008; PYBUS *et al.*, 2005). Em concordância com o

acima exposto, Oliveira *et al.*, (1999) e Marinho *et al.*, (2007) verificaram uma maior freqüência do genótipo 1, seguido pelo 3 no Rio de Janeiro-RJ e em Goiânia-GO, respectivamente.

Para o nosso conhecimento, não existem estudos na população de usuários de drogas ilícitas em Campo Grande-MS e Cuiabá-MT. Desse modo, investigamos no período de agosto/07 a julho/08 a prevalência e os fatores de risco para esta infecção na população estudada, bem como os índices de co-infecções HCV-HIV e HCV-HBV. Dando continuidade, esta etapa do estudo teve como objetivos: (i) detectar o RNA viral nas amostras anti-HCV positivas em usuários de drogas injetáveis e não injetáveis em Campo Grande-MS e Cuiabá-MT, (ii) determinar os genótipos do HCV na população estudada.

METODOLOGIA

População de estudo - a população foi constituída de 580 usuários de drogas injetáveis e não injetáveis, em tratamento em 16 centros de recuperação, nas cidades de Campo Grande-MS (N=269) e Cuiabá-MT (N=311), os quais foram convidados a participar do presente estudo. Os indivíduos que concordaram em participar foram entrevistados sobre dados sócio-demográficos e características de risco associadas à infecção pelo HCV. A seguir, foram coletados 10 mL de sangue, sendo as amostras separadas e estocadas a -20°C até a realização dos ensaios sorológicos e moleculares.

Testes sorológicos

Os soros foram testados para a detecção de anticorpos a*nti-HCV* pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) de terceira geração (Abbott, Laboratories). As amostras reagentes ao anti-HCV foram testadas por *immunoblot* (Bioblot HCV, Biokit, Espanha).

Detecção do RNA-HCV

As amostras *anti-HCV* reagentes foram testadas para detecção do RNA-HCV pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se “primers” complementares à região 5’ não codificante do genoma do HCV (GINABREDA; YOSHIDA; NIEL, 1997). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídeo e, visualizados sob luz

ultravioleta em um transiluminador. Para evitar contaminação, a extração e a transcrição do RNA, a preparação dos reagentes pré-PCR, a amplificação do DNA e a eletroforese em gel dos produtos da PCR foram realizadas em salas separadas.

Genotipagem

As amostras RNA-HCV positivas foram genotipadas pelo método *line probe assay* (INNO-LiPA, Innogenetics, Bélgica). Para tal, as seqüências genômicas de cDNA foram amplificadas novamente pela PCR com *primers* biotinilados complementares à região 5' NC do genoma do HCV. Em seguida foi realizada uma hibridização reversa de produtos biotinilados da PCR com sondas tipo específicas, previamente imobilizadas em linhas paralelas nas tiras da membrana de nitrocelulose. Após a hibridização, foi adicionada uma solução de estreptovidina marcada com fosfatase alcalina que se liga ao híbrido biotinilado formado anteriormente. A revelação deste método consiste no desenvolvimento de cor púrpura nas amostras positivas, após a adição do substrato (*bromochloroindolyphosphate*/BICP e *nitro blue tetrazolium*/NBT). A reatividade dos fragmentos amplificados em uma ou mais linhas sobre as tiras permite o reconhecimento dos seguintes genótipos do HCV: 1a, 1b, 1, 2a/2c, 2b, 3a, 3b/3c, 3, 4a, 4b, 4c/4d, 4e, 4f, 4h, 4, 5a e 6a (STUYVER *et al*.,1993, 1996).

Processamento e análise dos dados

Os dados das entrevistas e os resultados dos testes sorológicos e moleculares (detecção do RNA-HCV e genotipagem) foram digitados em microcomputador e analisados no programa "Epi Info 6" versão 6.04, desenvolvido pelo "Centers for Disease and Control", Estados Unidos da América.

RESULTADOS

No período de agosto/07 a julho/08, estimamos a prevalência de anti-HCV na população estudada, sendo de 40,0% (14/35) e 33,3% (16/48) em usuários de drogas injetáveis (UDI) em Campo Grande-MS e Cuiabá-MT, respectivamente. No grupo de usuários de drogas não injetáveis (UDNI), os índices foram de 3,0% (7/234) e 1,5% (4/263), respectivamente. A prevalência global da infecção pelo HCV na população estudada foi de 7,1% (IC 95%: 5,2 - 9,5).

De um total de 269 usuários de drogas ilícitas em Campo Grande-MS, 21 (7,8%) foram anti-HCV reagentes, sendo o RNA-HCV detectado em 76,2% (16/21) das amostras testadas. Destas, 12 (75%) eram de UDI e 4 (25%) de UDNI. Todas as 16 amostras RNA-HCV positivas foram genotipadas pelo método de hibridização reversa (INNO-LiPA). Destas, 87,5% (14/16) eram do genótipo 1 e apenas duas (12,5%) do genótipo 3 (Tabela 1).

TABELA 1- Detecção do RNA viral e caracterização dos genótipos do HCV nos 21 usuários de drogas ilícitas anti-HCV positivos em Campo Grande-MS

Amostra	Usuários	RNA-HCV	Genótipos
DC 01	Injetável	-	----
DC 06	Injetável	+	3
DC 07	Não Injetável	+	1
DC 08	Injetável	+	1
DC 09	Injetável	+	1
DC 30	Injetável	+	1
DC 41	Não Injetável	-	----
DC 48	Injetável	+	1
DC 50	Não Injetável	-	----
DC 87	Não Injetável	+	1
DC 147	Não Injetável	+	1
DC 164	Injetável	+	1
DC 203	Injetável	+	1
DC 210	Injetável	+	1
DC 213	Injetável	-	----
DC 216	Não Injetável	-	----
DC 223	Injetável	+	1
DC 251	Injetável	+	1
DC 283	Injetável	+	1
DC 295	Não Injetável	+	1
DC 296	Injetável	+	3

Em Cuiabá-MT, de um total de 311 amostras de usuários de drogas ilícitas, 20 (6,4%) foram anti-HCV reagentes. Destas, 80,0% (16/20) foram positivas para o RNA viral, das quais 81,3% (13/16) eram de UDI e 18,7% (3/16) de UDNI. As 16 amostras RNA-HCV positivas foram genotipadas pelo método de hibridização reversa (INNO-LiPA), sendo 75% (12/16) do genótipo 1 e 25% (4/16) do genótipo 3 (Tabela 2).

TABELA 2- Detecção do RNA viral e caracterização dos genótipos do HCV nos 20 usuários de drogas ilícitas anti-HCV positivos em Cuiabá-MT

Amostra	Usuários	RNA-HCV	Genótipos
UdCb 05	Injetável	+	1
UdCb 08	Injetável	+	1
UdCb 43	Injetável	+	1
UdCb 59	Injetável	+	1
UdCb 61	Não Injetável	+	3
UdCb 64	Não Injetável	+	1
UdCb 109	Não Injetável	+	3
UdCb 111	Não Injetável	-	----
UdCb 133	Injetável	+	3
UdCb 168	Injetável	+	3
UdCb 177	Injetável	+	1
UdCb 220	Injetável	+	1
UdCb 227	Injetável	-	----
UdCb 243	Injetável	+	1
UdCb 267	Injetável	-	----
UdCb 277	Injetável	+	1
UdCb 284	Injetável	+	1
UdCb 294	Injetável	+	1
UdCb 305	Injetável	-	----
UdCb 306	Injetável	+	1

A Figura 1 apresenta a prevalência global dos subtipos do HCV em usuários de drogas ilícitas em Campo Grande-MS e Cuiabá-MT. De 32 amostras, 53,2% (17/32) foram identificadas como do subtipo 1a. Seis amostras foram caracterizadas como do subtipo 1b (18,7%), bem como outras seis do subtipo 3a (18,7%). Não foi possível diferenciar os subtipos 1a e 1b em três amostras do genótipo 1.

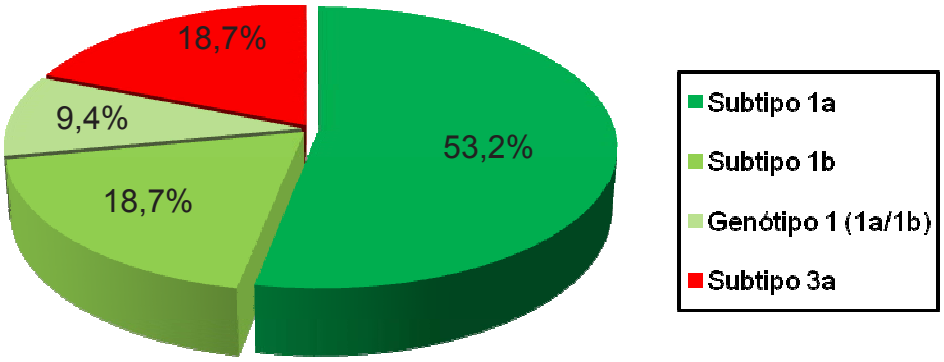


FIGURA 1 – Prevalência global dos subtipos do HCV em usuários de drogas ilícitas em Campo Grande-MS e Cuiabá-MT

DISCUSSÃO

O presente trabalho está inserido no primeiro estudo multicêntrico epidemiológico e molecular da infecção pelo HCV em usuários de drogas ilícitas no Brasil Central, cujas cidades investigadas foram Goiânia-GO (NASCIMENTO *et al.*, 2006; MARINHO *et al.,* 2007), Campo Grande-MS e Cuiabá-MT (MARINHO *et al., 2008*), sendo esta a última etapa do referido estudo.

Os usuários de drogas constituem importante grupo de risco para a transmissão da hepatite C devido à freqüente exposição ao HCV (ALTER, 2007; LAVANCHY, 2009). A eficiência de sua transmissão varia de acordo com os comportamentos de risco adotados, tais como: a via e a duração de uso de drogas, compartilhamento de seringas, agulhas, canudo intranasal e outros equipamentos contaminados, bem como práticas sexuais desprotegidas (SCHEINMANN *et al.,* 2007; MACÍAS *et al.,* 2008).

As taxas de prevalência verificadas nos usuários de drogas injetáveis em Campo Grande-MS (40%; IC 95%: 24,3-57,8) e Cuiabá-MT (33,3%; IC 95%: 20,8-48,5) foram similares à encontrada nesta mesma população em Goiânia-GO (26,9%; IC 95%: 17,1-39,3) (NASCIMENTO *et al.,* 2006). Os dados apresentados corroboram a alta eficiência da transmissão do HCV pelo compartilhamento de equipamentos contaminados durante o consumo de drogas injetáveis, evidenciando os UDI como principal grupo de disseminação do HCV na atualidade (ALTER, 2007; LAVANCHY, 2009).

Os índices para infecção pelo HCV no grupo de usuários de drogas não injetáveis em Campo Grande-MS (3,0%; IC 95%: 1,3-6,3) e Cuiabá-MT (1,5%; IC 95%: 0,5-4,1) também foram semelhantes ao verificado em Goiânia-GO (2,8%; IC 95%: 1,2-4,9) (NASCIMENTO *et al.,* 2006). Por outro lado, os mesmos foram superiores a prevalência de anti-HCV em doadores de sangue na Região Centro-Oeste (0,9%) (MARTELLI *et al.,* 1999). Estes dados indicam que os usuários de drogas não injetáveis também constituem um grupo de risco para hepatite C.

O RNA viral é o marcador que define infecção presente nos indivíduos anti-HCV positivos. Portanto, ao detectar o RNA-HCV pode-se diferenciar os usuários de drogas portadores do HCV daqueles que foram expostos ao vírus da hepatite C (anti-HCV reagentes) e eliminaram o vírus (CHEVALIEZ, PAWLOTSKY, 2007). Assim, em Campo Grande-MS e Cuiabá-MT, os índices de detecção do RNA viral em usuários anti-HCV reagentes foram de 76,2% e 80%, respectivamente. Apesar de tais resultados serem inferiores ao verificado nessa população em Goiânia-GO (92,6%) (MARINHO *et al.,* 2007), caracterizam os usuários de drogas ilícitas como importantes portadores e potenciais disseminadores do HCV.

Todas as 32 amostras RNA-HCV positivas foram genotipadas pelo LiPA, sendo o genótipo 1 predominante, seguido pelo genótipo 3 em ambas cidades investigadas. Resultados semelhantes, apresentando predominância do genótipo 1 seguido pelo 3, foram verificados em UDI no Rio de Janeiro por Oliveira *et al.* (1999), sendo os mesmos prevalentes no Brasil (CAMPIOTTO *et al.,* 2005), bem como em nossa região (MARTINS *et al.,* 2006).

Estudos apontam associação dos genótipos 1 e 3 com o uso de drogas injetáveis (ALZAHRANI *et al.,* 2009; COCHRANE *et al.,* 2002; KREKULOVÁ *et al.,* 2009; LIDMAN *et al.,* 2009; MATHEI *et al.,* 2005; MICALESSI *et al.,* 2008; PYBUS *et al.,* 2005). Entretanto, outras investigações mostraram genótipos diferentes

predominando nesse grupo, como o genótipo 2 no Japão (SATOH *et al.,* 2004) e o genótipo 4 no Líbano, Oriente Médio (SHARARA *et al.,* 2007). Tal fato sugere que, provavelmente, os genótipos mais prevalentes em usuários de drogas ilícitas em uma determinada região são similares aos predominantes na mesma. Por outro lado, mudanças na prevalência desses genótipos poderão ocorrer em longos períodos de tempo, influenciadas pela circulação dos usuários de drogas infectados de diferentes regiões (PYBUS *et al.,* 2005; SY, JAMAL, 2006).

Em relação aos subtipos encontrados em usuários de drogas ilícitas em Campo Grande-MS e Cuiabá-MT, observou-se maior freqüência de 1a (53,2%), seguido de 1b (18,9%) e 3a (18,9%). Não foi possível diferenciar os subtipos 1a e 1b em três amostras (9,4%) do genótipo 1 (1a/1b). Dados semelhantes foram observados na população de usuários de drogas ilícitas em Goiânia-GO, de modo que houve predominância do subtipo 1a, seguido pelos subtipos 3a e 1b (MARINHO *et al.,* 2007). Já um estudo realizado por Martins *et al.* (2006), em doadores de sangue da Região Centro Oeste, demonstrou índices de detecção semelhantes para os subtipos 1a e 1b (36,8%), seguidos por 3a (21,1%) em Mato Grosso do Sul. Por outro lado, em doadores em Mato Grosso, os subtipos identificados foram 1a (41%), 1b (29,5%) e 3a (25%). O subtipo 2b também foi verificado (5,3% e 4,5%, respectivamente), apresentando baixas taxas de prevalência. Em conjunto, tais resultados indicam a predominância do subtipo 1a, seguido por 1b e 3a no Brasil Central.

A distribuição dos genótipos e subtipos do HCV no Brasil apresenta-se bastante variada entre as regiões, sendo influenciada por rotas de transmissão, caracterizando assim, a epidemiologia da infecção no País. A necessidade de investigações epidemiológicas em diferentes grupos populacionais é reforçada uma vez que, conhecendo a freqüência e a distribuição dos genótipos e subtipos, teremos informações para entender a propagação do HCV, bem como fornecer subsídios para o tratamento padronizado desta infecção (CAMPIOTTO *et. al.,* 2005; MYRMEL *et al.,* 2009; OLIVEIRA *et al.,* 1999).

Os usuários de drogas constituem uma população velada pela sociedade, tanto pelo uso ilegal de drogas, como pela criminalidade que envolve essa população. Eles podem ser encontrados em serviços especializados no tratamento de dependência química, em delegacias de polícia, cadeias e presídios, além de hospitais. Embora o presente estudo tenha sido conduzido apenas em centros de

tratamento para uso de substâncias ilícitas, não representando, portanto, toda a população de usuários de drogas, os dados obtidos são importantes para entendimento da situação epidemiológica do HCV nessa população e para elaboração de políticas públicas e estratégias de redução de danos associadas ao uso de drogas ilícitas no Brasil Central.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARON, S.; MCMAHON, J.M.; MILANO, D.; TORRES, L.; CLATTS, M.; TORTU, S.; MILDVAN, D.; SIMM, M. Intranasal transmission of hepatitis C virus: virological and clinical evidence. **Clinical Infectious Diseases**, v.47, p.931-934, 2008.

ALTER, M.J. Epidemiology of viral hepatitis C infection. **Journal of Gastroenterology**, v.13, n.17, p.2436-2441, 2007.

ALZAHRANI, A.J.; DELA CRUZ, D.M.; OBEID, O.E.; BUKHARI, H.A.; AL-QAHTANI, A.A.; AL-AHDAL, M.N. Molecular detection of hepatitis B, hepatitis C, and torque teno viruses in drug users in Saudi Arabia. **Journal of Medical Virology**, v.81, n.8, p.1343-1347, 2009.

BAO, Y.P.; LIU, Z.M. Systematic review of HIV and HCV infection among drug users in China. **International Journal of STD & AIDS**, v.20, p.399-405, 2009.

BASTOS, F.I.; BASTOS, F.I.; LOWNDES, C.M.; CASTELLO-BRANCO, L.R.; LINHARES-DE-CARVALHO, M.I.; OELEMANN, W.; BERNIER, F.; MORGADO, M.G.; YOSHIDA, C.F.; ROZENTAL, T.; ALARY, M. Sexual behaviour and infection rates for HIV, blood-borne and sexually transmitted infections among patients attending drug treatment centres in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of STD & AIDS**, v.11, n.6, p.383-392, 2000.

CAIAFFA, W.T.; BASTOS, F.I.; FREITAS, L.L.; MINGOTI, S.A.; PROIETTI, F.A.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; GANDOLFI, D.; DONEDA, D. The contribution of two Brazilian multi-center studies to the assessment of HIV and HCV infection and prevention strategies among injecting drug users: the AJUDE-Brasil I and II Projects. **Cadernos de Saúde Pública**, v.22, n.4, p.771-782, 2006.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.R.; CARRILHO, F.J.; DA SILVA, L.C.; SOUTO, F.J.; SPINELLI, V.; PEREIRA, L.M.; COELHO, H.S.; SILVA, A.O.; FONSECA

J.C.; ROSA, H.; LACET, C.M.; BERNARDINI, A.P. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.41-49, 2005.

CHEVALIEZ, S.; PAWLOTSKY, J.M. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and management of antiviral therapy. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, n.17, p.2461-2466, 2007.

COCHRANE, A.; SEARLE, B.; HARDIE, A.; ROBERTSON, R.; DELAHOOKE, T.; CAMERON, S.; TEDDER, R.S.; DUSHEIKO, G.M.; DE LAMBALLERIE, X.; SIMMONDS, P. A. Genetic Analysis of Hepatitis C Virus Transmission between Injection Drug Users. **The Journal of Infectious Diseases**, n.186, v.9, p.1212-1221, 2002.

GALPERIM, B.; CHEINQUER, H.; STEIN, A.; FONSECA, A.; LUNGE, V.; IKUTA, N. Intranasal cocaine use does not appear to be na independent risk factor for HCV infection. **Addiction**, v.91, p.973-977, 2004.

GINABREDA, M.G.P.; YOSHIDA, C.F.; NIEL, C. Genomic characterization of Brazilian hepatitis C virus genotypes 1a and 1b. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p.339-345, 1997.

GRIFFIN, S.D.; HARVEY, R.; CLARKE, D.S.; BARCLAY, W.S.; HARRIS, M.; ROWLANDS, D.J. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. **Journal of General Virology**, v.85, p.451-461, 2004.

GYARMATHY, V.A.; NEAIGUS, A.; UJHELYI, E.; SZABÓ, T.; RÁCZ, J. Strong HIV and hepatitis disclosure norms and frequent risk behaviors among Hungarian drug injectors. **Drug and Alcohol Dependence,** v.82, suppl.1, p.65-69, 2006.

HAQSHENAS, G.; MACKENZIE, J.M.; DONG, X.; GOWANS, E.J. Hepatitis C virus p7 protein is localized in the endoplasmic reticulum when it is encoded by a replication-competent genome. **Journal of General Virology**, v.88, p.134-142, 2007.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **ICTVbd Index of Viruses: Hepacivirus.** Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_flavi.htm>. Acesso em 20 julho 2009.

KREKULOVÁ, L.; REHÁK, V.; STRUNECKÝ, O.; NĚMECEK, V. Current situation and trends in the hepatitis C virus genotype distribution among injecting drug users in the Czech Republic. **Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie: Casopis Spolecnosti pro Epidemiologii a Mikrobiologii Ceské Lékarské Spolecnosti J.E. Purkyne**, v.58, n.2, p.84-89, 2009.

LAVANCHY, D. The global burden of hepatitis C. **Liver International**, v. 29, suppl.1, p.74-81, 2009.

LIDMAN, C.; NORDEN, L.; KÅBERG, M.; KALL, K.; FRANCK, J.; ALEMAN, S.; BIRK, M. Hepatitis C infection among injection drug users in Stockholm Sweden: Prevalence and gender. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v.11, p.1-6, 2009.

MACÍAS, J.; PALACIOS, R.B.; CLARO, E.; VARGAS, J.; VERGARA, S.; MIRA, J.A.; MERCHANTE, N.; CORZO, J.E.; PINEDA, J.A. High prevalence of hepatitis C virus infection among noninjecting drug users: association with sharing the inhalation implements of crack. **Liver International**, v.28, p.781-786, 2008.

MARINHO, T.A.; LOPES, C.L.R.; MARTINS, R.M.B. Genótipos do vírus da hepatite c em usuários drogas ilícitas em Goiânia, Goiás. In: XV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - IV CONPEEX, 2007, Goiânia. **Anais Eletrônicos do IV CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO (CONPEEX CD)**. Goiânia: UFG, 2007.

MARINHO, T.A.; LOPES, C.L.R.; MARTINS, R.M.B. Soroepidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite c em usuários de drogas ilícitas no Brasil Central. In: XVI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - V CONPEEX, 2008, Goiânia. **Anais Eletrônicos do V Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão (CONPEEX CD)**. Goiânia: UFG, 2008.

MARTELLI, C.M.T.; TURCHI, M.; SOUTO, F.J.; SÁEZ-ALQUÉZAR, A.; ANDRADE, A.L.; ZICKER, F. Anti-HBc testing for blood donations in areas with indeterminate hepatitis B endemicity. **Pan American Journal of Public Health**, v.6, p.69-73, 1999.

MARTINS, R.M.B.; TELES, S.A.; FREITAS, N.R.; MOTTA-CASTRO, A.R.C.; SOUTO, F.J.D.; MUSSI, A.; AMORIM R.M.S.; MARTINS, C.R.F. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.1, p.53-55, 2006.

MATHEI, C.; WOLLANTS, E.; VERBEECK, J.; VAN RANST, M.; ROBAEYS, G.; VAN DAMME, P.; BUNTINX, F. Molecular epidemiology of hepatitis C among drug users in Flanders, Belgium: association of genotype with clinical parameters and with sex- and drug-related risk behaviours. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.24, p.514-522, 2005.

MCMAHON, J.M.; SIMM, M.; MILANO, D.; CLATTS, M. Detection of hepatitis C virus in the nasal secretions of an drug-user. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v.3, p.6-10, 2004.

MICALESSI, M.I.; GÉRARD, C.; AMEYE, L.; PLASSCHAERT, S.; BROCHIER, B.; VRANCKX, R. Distribution of hepatitis C virus genotypes among injecting drug users in contact with treatment centers in Belgium, 2004-2005. **Journal of Medical Virology**, v.80, n.4, p:640-645, 2008.

MYRMEL, H.; ULVESTAD, E.; ASJO, B. The hepatitis C virus enigma. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v.117, p.427-439, 2009.

NASCIMENTO, L.B.; MARINHO, T.A.; LOPES, C.L.R.; MARTINS, R.M.B. Soepidemiologia da Infecção pelo Vírus da Hepatite C em Usuários de Drogas Ilícitas em Goiânia, Goiás. In: XIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - III CONPEEX, 2006, Goiânia. **Anais do III Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão (CONPEEX-CD)**. Goiânia: UFG, 2006.

NUNES, C.L.X.; ANDRADE, T.; GALVÃO-CASTRO, B.; BASTOS, F.I.; REINGOLD, A. Assessing Risk Behaviors and Prevalence of Sexually Transmitted and Blood-Borne Infections among Female Crack Cocaine Users in Salvador - Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.11, n.6, p.561-566, 2007.

OLIVEIRA, M.L.A.; BASTOS, F.I.; SABINO, R.R.; PAETZOLD, U.; SCHREIER, E.; PAULI, G.; YOSHIDA, C.F. Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, n.3, p.279-282, 1999.

OLIVEIRA, M.L.A.; HACKER, M.A.; OLIVEIRA, S.A.; TELLES, P.R.; O, K.M.; YOSHIDA, C.F.; BASTOS, F.I. "The first shot": the context of first injection of illicit drugs, ongoing injecting practices, and hepatitis C infection in Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Publica**, v.22, n.4, p.861-870, 2006.

PYBUS, O.G.; COCHRANE, A.; HOLMES, E.C.; SIMMONDS, P. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. **Infection, Genetics and Evolution**, v.5, n.2, p.131-139, 2005.

SATOH, Y.; HINO, K.; KATO, T.; MIZOKAMI, M.; YAMASHITA, S.; NAKAMURA, H.; OKITA, K. Molecular epidemiologic analysis of hepatitis C virus infection in injecting drug users with acute hepatitis C in Japan. **Journal of Gastroenterology and Hepatolology**, v.19, n.11, p.1305-1311, 2004.

SCHEINMANN, R.; HAGAN, H.; LELUTIU-WEINBERGER, C.; STERN, R.; DES JARLAIS, D.C.; FLOM, P.L.; STRAUSS, S. Non-injection drug use and Hepatitis C Virus: a systematic review. **Drug Alcohol Dependence**, v.89, n.1, p.1-12, 2007.

SHARARA, A.I.; RAMIA, S.; RAMLAWI, F.; FARES, J.E.; KLAYME, S.; NAMAN, R. Genotypes of hepatitis C virus (HCV) among positive Lebanese patients: comparison of data with that from other Middle Eastern countries. **Epidemiology and Infection**, v.135, n.3, p.427-432, 2007.

SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. **Journal of General Virology,** v.85, n.11, p.3173-3188, 2004.

SIMMONDS, P.; BUKH, J.; COMBET, C.; DELÉAGE, G.; ENOMOTO, N.; FEINSTONE, S.; HALFON. P.; INCHAUSPÉ, G.; KUIKEN, C.; MAERTENS, G.; MIZOKAMI, M.; MURPHY, D.G.; OKAMOTO, H.; PAWLOTSKY, J.M.; PENIN, F.; SABLON, E.; SHIN-I, T.; STUYVER, L.J.; THIEL, H.J.; VIAZOV, S.; WEINER, A.J.; WIDELL, A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, *v.*42, n.4, p.962-973, 2005.

STUYVER, L.; ROSSAU, R.; WYSEUR, A.; DUHAMEL, M.; VANDERBORGHT, B.; VAN HEUVERSWYN, H.; MAERTENS, G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. **Journal of General Virolology.**, v.74, p.1093-1102, 1993.

STUYVER, L.; WYSEUR, A.; VAN ARNHEM, W.; HERNANDEZ, F.; MAERTENS, G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.9, p. 2259–2266, 1996.

SUZUKI, T.; AIZAKI, H.; MURAKAMI, K.; SHOJI, I.; WAKITA, T. Molecular biology of hepatitis C virus. **Journal of Gastroenterology,** v.42, p.411-423, 2007.

SWEETING, M.J.; HOPE, V.D.; HICKMAN, M.; PARRY, J.V.; NCUBE, F.; RAMSAY, M.E.; DE ANGELIS, D. Hepatitis C Infection Among Injecting Drug Users in England and Wales (1992–2006): There and Back Again? **American Journal of Epidemiology**, p.1-9, 2009.

SY, T.; JAMAL, M.M. Epidemiology of hepatits C virus (HCV) infection. **International Journal of Medical Sciences**, v.3, p.41-46, 2006.

TORTU, S.; MCMAHON, J.M.; POUGET, E.R.; HAMID, R. Sharing of noninjection drug-use implements as a risk factor for hepatitis C. **Substance Use & Misuse**, v.39, n.2, p.211-224, 2004.

VAN ASTEN, L.; VERHAEST, I.; LAMZIRA, S.; HERNANDEZ-AGUADO, I.; ZANGERLE, R.; BOUFASSA, F.; REZZA, G.; BROERS, B.; ROBERTSON, J.R.; BRETTLE, R.P.; MCMENAMIN, J.; PRINS, M.; COCHRANE, A.; SIMMONDS, P.; COUTINHO, R.A.; BRUISTEN, S. Spread of hepatitis C virus among European injection drug users infected with HIV: a phylogenetic analysis. **The Journal Infectious Diseases**, n.189, p.292-302, 2004**.**

VICKNASINGAM, B.; NARAYANAN, S.; NAVARATNAM, V. Prevalence rates and risk factors for hepatitis C among drug users not in treatment in Malaysia. **Drug and alcohol review,** v.28, n.4, p.447-454, 2009.

Características anatomo-patológicas de lesões experimentalmente provocadas na pele de camundongos

Mayara Souza Martins[1], Vânia Beatriz Lopes Moura[1], Leila Maria Leal Parente[2], Leonice Manrique F. Tresvenzol[3], Maria Márcia Bachion[4], Ruy de Souza Lino Júnior[1]

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública[1] / Escola de Veterinária[2] / Faculdade de Farmácia[3] / Faculdade de Enfermagem[4] / UFG

e-mail: martins_mayara@hotmail.com

Palavras-Chave: cicatrização, patologia, tratamento.

INTRODUÇÃO

A capacidade de reparação tecidual é um fenômeno observado nos seres vivos de grande importância para sua sobrevivência quando ocorrem lesões acidentais ou cirúrgicas. A cicatrização dos tecidos e órgãos constitui-se em um processo biológico complexo essencial para manter a integridade do organismo, mas que ainda não está totalmente esclarecido (AMORIM *et al*., 2006).

Nesse processo existe uma seqüência de estágios intermediários e sobrepostos descritos como: inflamação (fase exsudativa), que dura desde o momento da lesão até dias após; reconstrução (fase proliferativa), ocorrendo de dias até semanas; epitelização (fase regenerativa) e maturação, variando de semanas até meses (BAUM & ARPEY, 2005; MARTINS *et al.*, 2006; LI *et al*., 2007).

Alguns produtos vêm sendo utilizados na tentativa de acelerar o processo de reparo tecidual, tais como a Calêndula e os ácidos graxos essenciais (AGE). A *Calendula officinalis* L. pertence à família Astereacea, é uma herbácea anual com cerca de 50 cm de altura (SILVA *et al*., 1995). Mais de 35 propriedades foram atribuídas à decocção e a tintura de suas flores, dentre elas efeitos: colerético, antiinflamatório, analgésico, antitumoral, bactericida, diurético, cicatrizante e sedativo. É uma planta exótica, originada do Mediterrâneo, adaptada ao Brasil (RAMOS *et al*., 1998).

A Calêndula é uma das plantas mais versáteis e muito popular pelo seu uso em cosmética e dermatologia (DELLA LOGGIA *et al*., 1994). Suas flores e folhas foram muito utilizadas pelos médicos em campos de batalha na Guerra Civil

Americana para tratar feridos devido ao seu poder cicatrizante, antiinflamatório e anti-séptico (TESKE & TRENTINI, 1995). Vários estudos químicos com suas flores revelaram seus princípios ativos, responsáveis por suas propriedades fisiológicas, dentre eles: óleos voláteis, carotenóides, triterpenos, mucilagens, resinas, polissacarídeos, substâncias amargas (calendina) nas folhas e flores, vários álcoois, saponinas e flavonóides (TESKE & TRENTINI, 1995; CORDOVA, 2002). A principal atividade da Calêndula é sua propriedade antiinflamatória, atribuída aos polissacarídeos e às saponinas. Recentemente, o monoester faradiol, purificado da fração triterpenóide das flores, têm mostrado importante atividade antiinflamatória (DELLA LOGGIA *et al*., 1994).

O AGE é um produto de origem natural, estudado desde 1929, derivado dos óleos vegetais poliinsaturados. Pode conter em sua composição elementos derivados do ácido linoléico, do ácido linoléico com lanolina e do ácido ricinoléico – da mamona. De acordo com Declair (1996), todos estes componentes agem de forma a aumentar a resposta imune, acelerando o processo inflamatório e conseqüentemente estimulando o processo de cicatrização por meio da angiogênese e da epitelização. Age promovendo a quimiotaxia de leucócitos, o que facilita o crescimento das células e promove mitose aumentando a proliferação celular. Conforme Declair (2002), o ácido linoléico exerce um importante papel quimiotáxico para macrófagos, sendo fundamental na expressão de componentes do sistema fibrinolítico.

Desde os primórdios, o homem tenta interferir no processo de cicatrização, procurando diminuir seu período e buscando melhores resultados, quer estético quer funcional (BRANCO-NETO *et al*., 2006). É nesse sentido que realizamos esse trabalho, observando as características anatomo-patológicas das feridas tratadas com extrato oleoso de *Calendula officinalis* e AGE (Dersani®).

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar e comparar as características anatomo-patológicas de lesões experimentalmente provocadas em pele de camundongos tratados com extrato oleoso de *Calendula officinalis* e AGE (Dersani®), identificando qual o melhor tratamento para cada fase do processo de reparo tecidual.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção do óleo de *Calendula officinalis*

O extrato oleoso da *C. officinalis* foi preparado a 10% em óleo de girassol. Foi adicionado 10 g do pó das flores da planta a 100 mL de óleo de girassol comercial. A mistura foi deixada em maceração, com agitação ocasional, por 10 dias. Após esse período o resíduo sólido foi decantado e o óleo filtrado utilizando algodão.

3.2 Indução da lesão

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas de Goiás, sob o protocolo nº 029/08.

Foram utilizados 60 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, com idade aproximada de 60 dias. Os animais foram alimentados com ração e água a vontade, e acomodados em gaiolas individuais para que eles não interferissem no processo de cicatrização.

Os animais foram divididos em 4 grupos para análise da evolução das feridas, e cada grupo foi composto por 15 animais, sendo que 5 foram eutanasiados depois de 3 dias de indução da lesão, outros 5 depois de 7, e os 5 restantes depois de 14. Esses dias foram escolhidos por representarem as três fases do processo de cicatrização, sendo que 3 dias corresponde a fase inflamatória, 7 dias a proliferativa, e 14 a de remodelação (LI *et al.*, 2007). Os grupos foram assim divididos: Grupo 1: ferida tratada com óleo de Girassol; Grupo 2: ferida tratada com extrato oleoso da *C. officinalis*; Grupo 3: ferida tratada com AGE (Dersani®); e Grupo 4: ferida tratada com soro fisiológico.

Os camundongos foram anestesiados com Xilasina 10,66mg/kg associada a Ketamina 66mg/kg, via intraperitoneal (HOYAMA *et al.,* 2005), e posteriormente submetidos à tricotomia da região dorsal com depilador elétrico de 2 cm de comprimento por 1,5 cm de largura.

Após a anti-sepsia foi realizada na região dorsal média uma incisão com 6 mm de diâmetro, utilizando o Punch Derm, aprofundando a incisão até expor a fáscia muscular dorsal.

Imediatamente após a lesão os animais receberam diariamente seus tratamentos até o dia de eutanásia, o qual foi realizado por deslocamento cervical. Esse tratamento incluiu a lavagem da ferida com um jato de soro fisiológico para

limpeza não ocorrendo a retirada de crosta, e o curativo com o óleo do grupo na dosagem aproximada de 150 μL.

3.3 Análise Macroscópica

Para a análise macroscópica, as 60 feridas foram fotografadas logo depois da indução da lesão e no dia de eutanásia para calcular a sua área com o programa Image J (NIH). A porcentagem de redução (PR) da ferida foi calculada pela fórmula demonstrada por Oliveira *et al.* (2000):

$$PR = \frac{\text{Área } T^0 - \text{Área } T^{\text{dia de eutanásia}}}{\text{Área } T^0} \quad X\ 100$$

Onde: T^0 = dia de indução da lesão; $T^{\text{dia de eutanásia}}$ = dia de eutanásia.

3.4 Análise Microscópica

Para a análise microscópica foram utilizados 3 animais para cada dia de eutanásia em cada tratamento. As amostras das lesões foram fixadas em formalina tamponada 10% e o material foi processado pelo método de inclusão em parafina. As lâminas obtidas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para observação dos processos patológicos gerais, e picro-sírus para análise do colágeno.

A intensidade de todos os processos patológicos gerais foram quantificada em: ausente, discreta (1 a 25%), moderada (26-50%) e acentuada (acima de 50%).

A fibrose foi avaliada nas lâminas coradas pelo picro-sírius (BIONDO-SIMÕES *et al.,* 2005; BIONDO-SIMÕES *et al.,* 2004*)* de forma semi-automática utilizando-se o programa Image J e microscópio de luz polarizada.

3.5 Análise Estatística

Para a análise estatística da redução da área da ferida, foi elaborada uma planilha eletrônica e as informações foram analisadas utilizando-se o programa Sigma Stat. As variáveis quantitativas foram testadas para verificar o tipo de distribuição por meio do teste de normalidade e variância, (teste de Kolmogorov-Smirnov). Em caso de distribuição normal, os resultados foram expressos em média ± desvio padrão, e nos casos de distribuição não-normal, foram expressos em mediana e valores mínimo e máximo.

Utilizou-se testes não-paramétricos, na comparação entre dois grupos o teste de Mann-Whitney e na comparação entre três ou mais grupos o teste de Kruskal-Wallis.

As diferenças observadas durante a análise foram consideradas estatisticamente significativas quando $p<0,05$.

4 RESULTADOS

A área da ferida diminuiu gradativamente com a evolução do processo de cicatrização em todos os grupos. Ao se comparar as áreas de redução da ferida nos diferentes tratamentos encontrou-se diferença significativa aos 7 dias entre os grupos tratados com óleo de Girassol ($69,2\pm18mm^2$) e soro fisiológico ($99,8\pm0,5mm^2$), assim como óleo de Calêndula ($77,7\pm16,4mm^2$) e soro ($99,8\pm0,5mm^2$). Nas demais comparações não se encontraram diferença entre os grupos. A figura 1 mostra a média de redução das feridas em porcentagem.

A microscopia apresentou diferenças quando comparamos os grupos aos dias 3, 7 e 14, como mostra a figura 2.

Observou-se que no dia 3 houve pouca diferença entre os tratamentos, sendo que todos se apresentaram na fase inflamatória, isto é, crosta, intensidade acentuada de exsudato, necrose, e infiltrado inflamatório de polimorfonucleares (Figura 2 e 3). Porém, a presença de mononucleares só foi encontrada nos grupos da Calêndula e do Girassol.

No dia 7 todos os grupos apresentaram tecido de granulação, isto é, crosta, exsudato, infiltrado de polimorfonucleares, hemorragia, hiperemia, e intensa presença de mononucleares. A fibrina foi observada apenas nos grupos tratados com óleo de Girassol e soro. E o tratado com AGE foi o único que não apresentou edema e obteve reepitelização (Figura 2 e 4).

No dia 14 nenhum grupo apresentou crosta, exsudato, necrose, fibrina, e edema, e todos estavam na fase regenerativa com discreta presença de mononucleares e reepitelizados. Entretanto, foi encontrado infiltrado de polimorfonuclear nos grupos tratados com AGE e óleo de Girassol (Figura 2 e 5) indicando uma persistência das fases anteriores do processo de cicatrização. Este

também foi o único que apresentou hiperemia, e somente o tratado com Calêndula mostrou hemorragia.

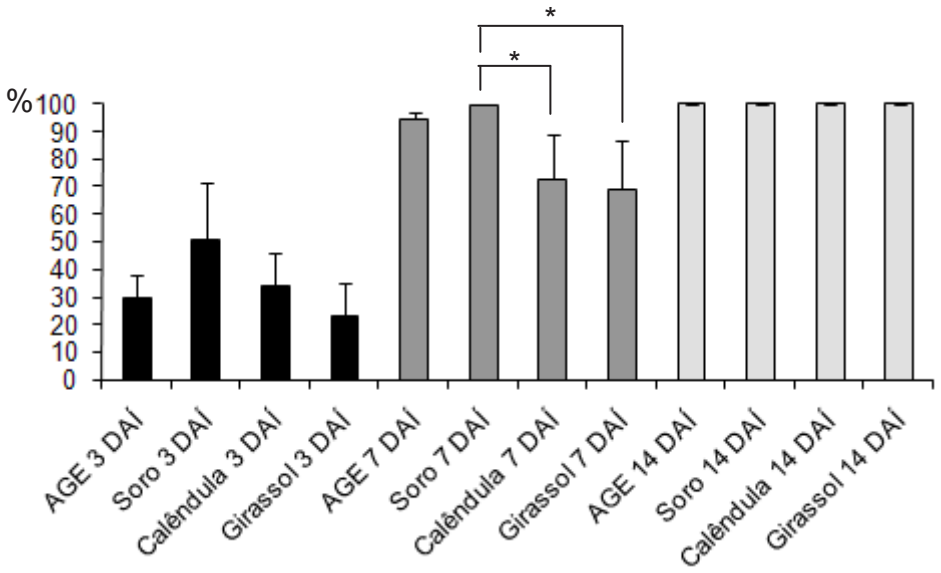


Figura 1. Média da porcentagem de redução das feridas dos diferentes tratamentos ao longo do tempo. DAÍ: dias após indução da lesão. n=5, p< 0,05.

	3 DAI				7 DAI				14 DAI			
	cal	gir	age	soro	cal	gir	age	soro	cal	gir	age	soro
Crosta	X	X	X	X	X	X	X	X	--	--	--	--
Exsudato	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	++	--	--	--	--
Necrose	+++	+++	+++	+++	+++	+++	--	++	--	--	--	--
Fibrina	+++	++	++	++	--	+++	--	++	--	--	--	--
Polimorfo	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	+	--	+	+	--
Mononuclear	+	+	--	--	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+
Hemorragia	++	++	++	+	++	+	++	+	+	--	--	--
Hiperemia	+++	+++	++	++	+++	+++	+	+++	--	+	--	--
Edema	+++	+++	++	+++	+	++	--	++	--	--	--	--
Reepitelização	--	--	--	--	--	--	X	--	X	X	X	X

Figura 2. Média dos processos patológicos gerais encontrados nos diferentes tratamentos ao longo do tempo. cal: extrato oleoso de *C. officinalis*; gir: óleo de Girassol; age: AGE; DAI: dias após a lesão; X: presença; --: ausência; +++: acentuada; ++: moderada; +: discreta. n=3.

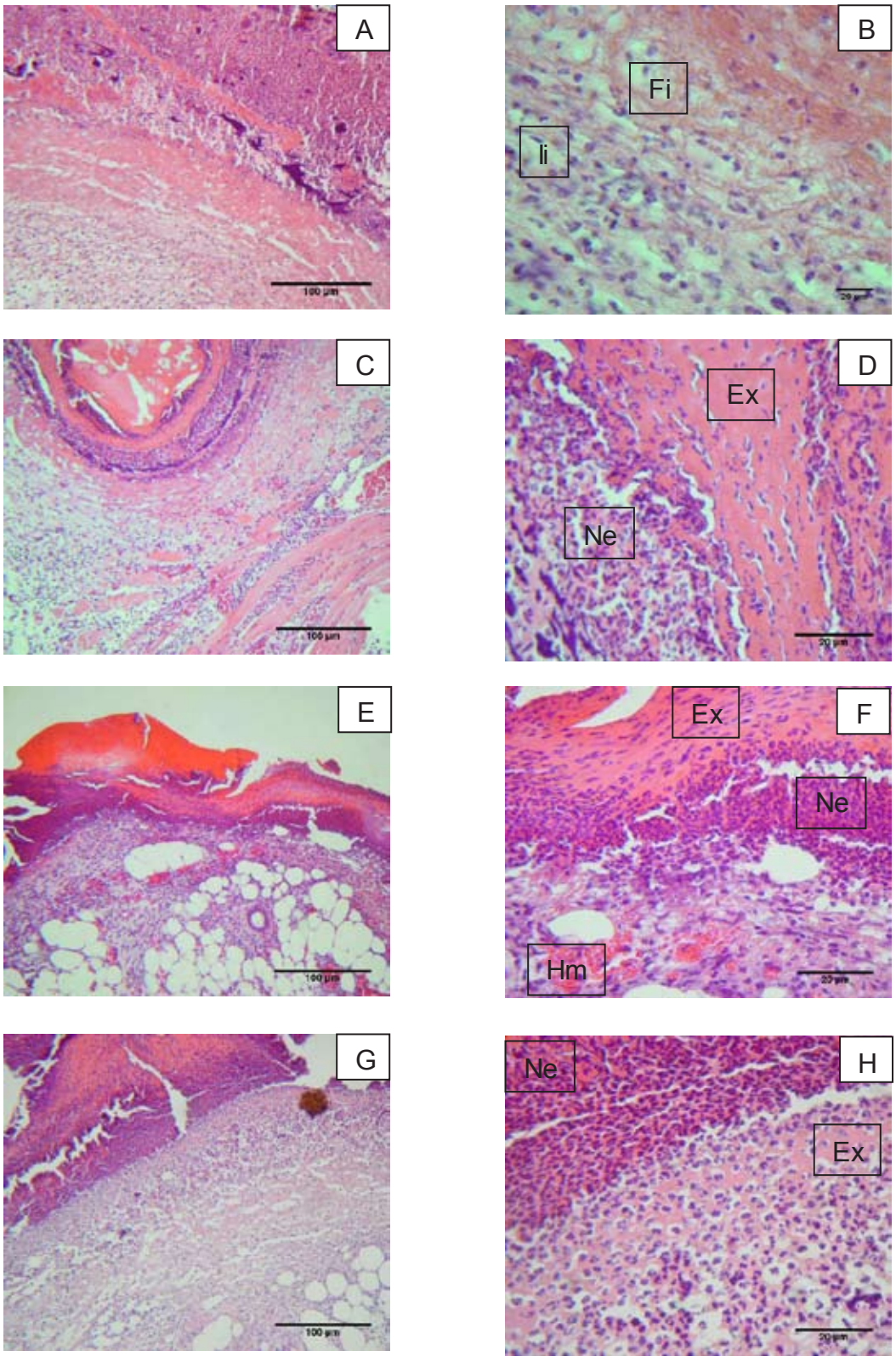


Figura 3. Fotomicrografia da ferida cutânea de camundongos tratados aos 3 dias após a indução da lesão. Tratamento: (A) AGE, visão panorâmica (HE, barra=100µm); (B) AGE, detalhe da figura anterior, mostrando infiltrado inflamatório (li) e fibrina (Fi) (HE, barra=20µm); (C) Calêndula, visão panorâmica (HE, barra=100µm); (D) Calêndula, detalhe da figura anterior, mostrando exsudato (Ex) e necrose (Ne) (HE, barra=20µm); (E) Girassol, visão panorâmica (HE, barra=100µm); (F) Girassol, detalhe da figura anterior, mostrando exsudato, necrose e hemorragia (Hm) (HE, barra=20µm); (G) Soro, visão panorâmica (HE, barra=100µm); (H) Soro, detalhe da figura anterior, mostrando exsudato e necrose (HE, barra=20µm).

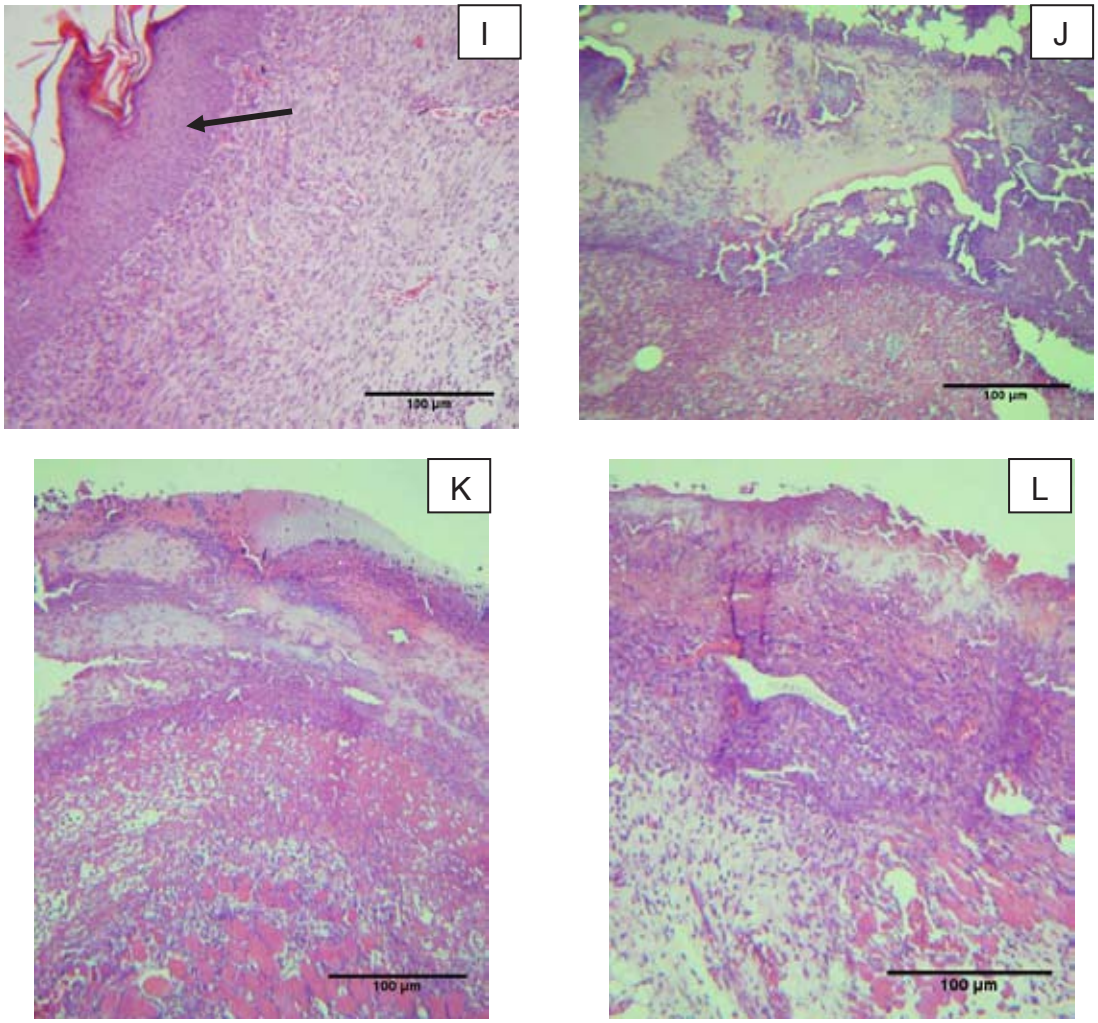


Figura 4. Fotomicrografia da ferida cutânea de camundongos tratados aos 7 dias após a indução da lesão. Tratamento: (I) AGE, visão geral onde pode ser observada reepitelização (seta) (HE, barra=100µm); (J) Calêndula, visão geral (HE, barra=100µm); (K) Girassol, visão geral (HE, barra=100µm); (L) Soro, visão geral (HE, barra=100µm).

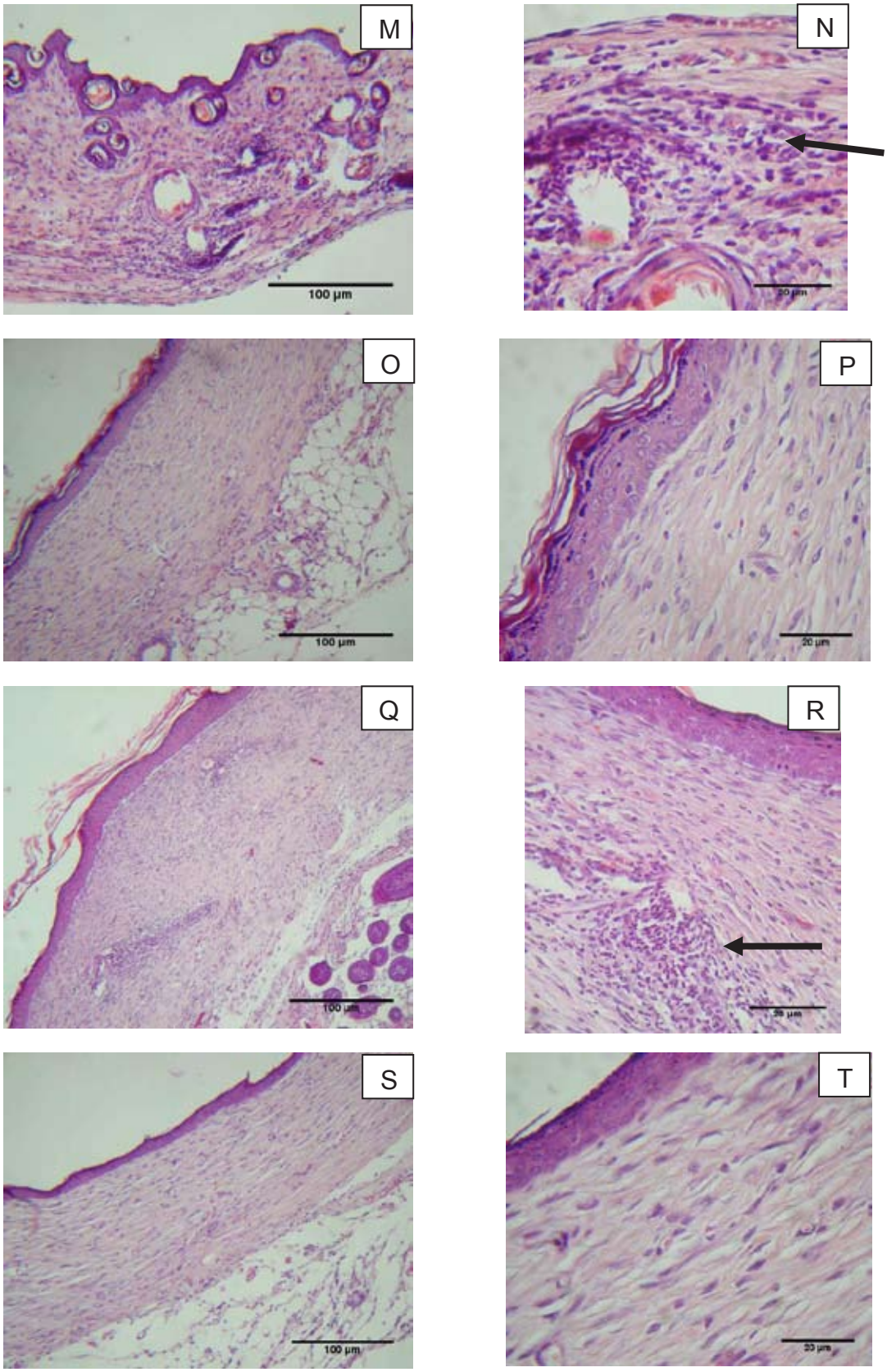


Figura 5. Fotomicrografia da ferida cutânea de camundongos tratados aos 14 dias após a indução da lesão. Tratamento: (M) AGE, visão geral (HE, barra=100µm); (N) AGE, detalhe da figura anterior, mostrando infiltrado inflamatório (seta) (HE, barra=20µm); (O) Calêndula, visão geral (HE, barra=100µm); (P) Calêndula, detalhe da figura anterior (HE, barra=20µm); (Q) Girassol, visão geral (HE, barra=100µm); (R) Girassol, detalhe da figura anterior, mostrando infiltrado inflamatório (seta) (HE, barra=20µm); (S) Soro, visão geral (HE, barra=100µm); (T) Soro, detalhe da figura anterior (HE, barra=20µm).

Neste trabalho, observou-se que, no decorrer do processo de cicatrização, o colágeno tipo III (fibras mais delgadas e menos organizadas) foi gradativamente substituído pelo colágeno tipo I, sendo esse efeito evidenciado pela mudança de coloração do colágeno de verde para amarelo-avermelhado. Essa mudança pode ser melhor observada no grupo da Calêndula aos 14 dias, em que a coloração vermelha é bem evidenciada, enquanto nos demais as fibras ainda são delgadas e amarelo-esverdeadas.

No dia 7 foi observado que os grupos tratados com óleo de Calêndula e AGE obtiveram maior freqüência de colágeno, e no dia 14 apenas a Calêndula teve destaque por apresentar mais colágeno com relação aos outros tratamentos (Figura 6 e 7).

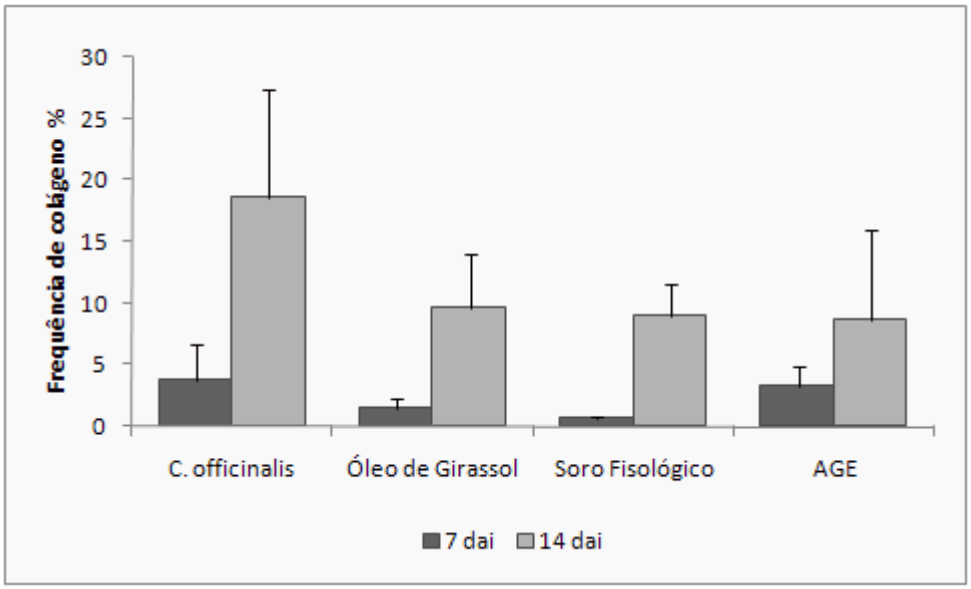


Figura 6. Média da freqüência de colágeno com os diferentes tratamentos nos dias 7 e 14. dai: dias após a lesão. n=3.

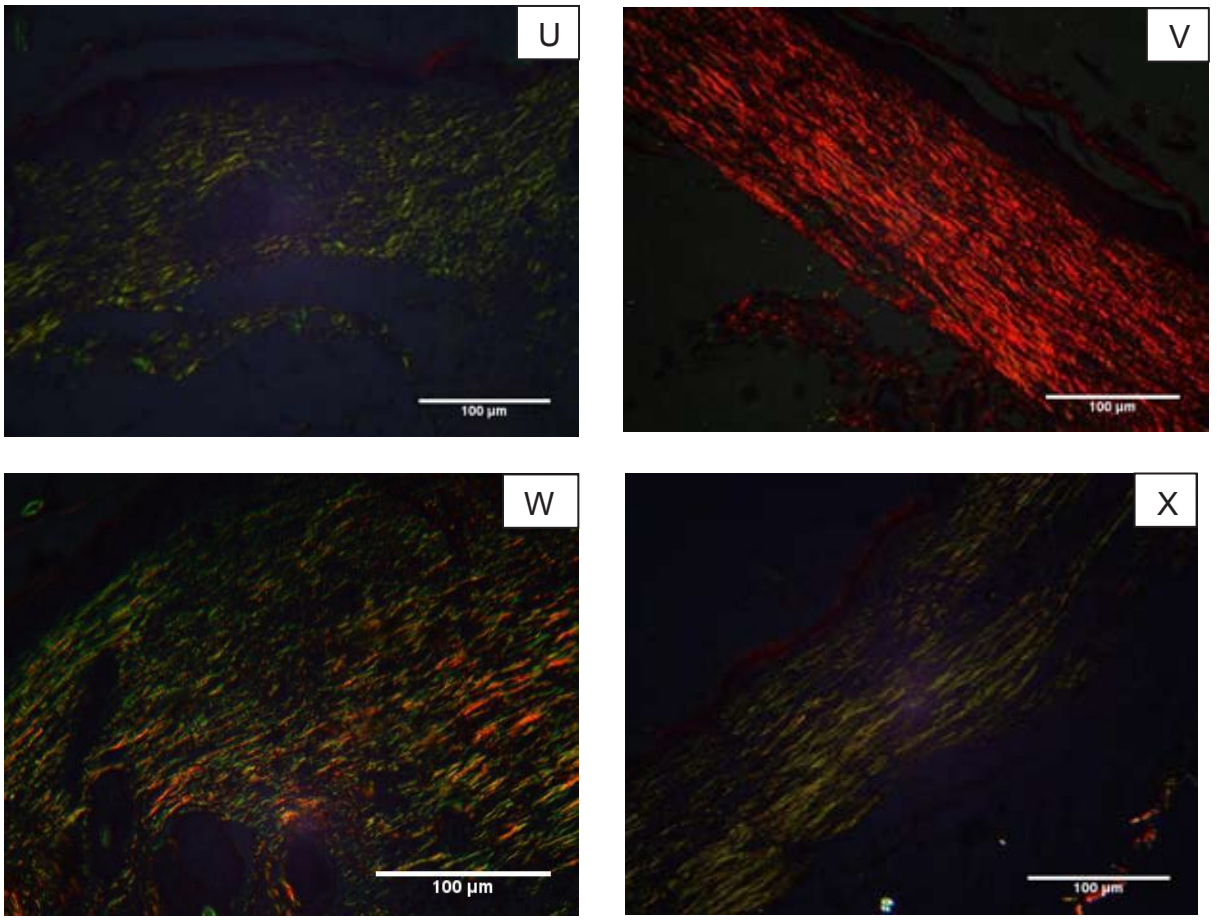


Figura 7. Fotomicrografia da ferida cutânea de camundongos tratados aos 14 dias após a indução da lesão. Tratamento: (U) AGE, colágeno tipo III (picro-sírius, barra=100µm); (V) Calêndula, colágeno tipo I (sicro-sírius, barra=100µm); (W) Girassol, transição entre colágeno tipo III para tipo I (picro-sírius, barra=100µm); (X) Soro, transição entre colágeno tipo III para tipo I (picro-sírius, barra=100µm).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho comparamos a interferência na cicatrização de um produto já bastante comercializado e utilizado por profissionais da saúde, o Dersani®, e de outro, o extrato de *Calendula officinalis*, que possui poucos estudos no Brasil (MARTINS *et al.*, 2003; SARTORI *et al.*, 2003; VOLPATO, 2005).

As sementes do óleo de girassol possuem uma grande abundância de ácidos graxos não saturados, especialmente o ácido linoléico (LA) (MARQUES *et al.*, 2004), e ele foi escolhido para constituir o extrato oleoso da *C. officinalis* por apresentar LA e permitir a comparação com o AGE.

Neste trabalho observamos que 3 dias após a lesão o grupo tratado com soro apresentou maior redução da área da ferida, porém na microscopia não mostrou diferença quando comparado com o AGE. Os grupos tratados com Calêndula e

Girassol apresentaram menor desempenho micro e macroscópicamente quando relacionadas com os demais. Portanto, o soro fisiológico parece constituir uma melhor alternativa para o tratamento da fase inflamatória por melhorar a redução da área da lesão. Como a literatura mostra, nessa fase ocorre a formação de uma solução de continuidade que é preenchida inicialmente por fibrina, coágulo e exsudato inflamatório, formando a crosta que recobre a ferida (BEVILACQUA *et al*., 1981). Acontece migração de neutrófilos, os quais irão fazer uma barreira contra invasão de microorganismos pela fagocitose, e posteriormente de macrófagos, que auxiliam também na fagocitose, mas de forma mais específica eliminando fragmentos teciduais e neutrófilos (BALBINO *et al*., 2005). Acreditamos que a aplicação dos óleos possa ter interferido na coagulação da ferida, por isso um menor desempenho desses produtos.

O soro fisiológico é mostrado por vários autores como auxiliar no processo cicatricial de feridas. Dealey (2001) indica a irrigação suave das feridas com solução fisiológica porque esta não prejudica os tecidos e promove a limpeza adequada além de preservar o tecido de granulação neoformado. Neste experimento todas as feridas, até mesmo aquelas que recebiam o tratamento com os óleos, eram limpas com solução fisiológica. Este fato pode ter contribuído para a diminuição da carga microbiana das feridas, apesar delas não apresentarem infecção ou exsudato purulento, pois o soro fisiológico, apesar de não possuir ação antimicrobiana, dependendo do processo mecânico de lavagem pode livrar a ferida de bactérias e debris, conforme afirmou Davidson (1998).

No dia 7, a redução da área da ferida não apresentou diferença entre AGE e soro, mas pela microscopia observamos que o grupo tratado com AGE foi o único que mostrou reepitelização. A análise do colágeno não mostrou diferença entre AGE e óleo de Calêndula. Portanto, acreditamos que o AGE é o melhor indicado para a fase de proliferação, pois o Dersani® possui uma fórmula que incorpora a vitamina A e a vitamina E, bem como a lecitina de soja, além do ácido linoléico. A vitamina A no organismo favorece a integridade da pele e sua cicatrização, e a vitamina E tem função anti-oxidante e protege a membrana celular do ataque de radicais livres. A lecitina de soja protege, hidrata e auxilia na restauração da pele. O ácido linoléico é precursor de substâncias farmacologicamente ativas envolvidas no processo de divisão celular e diferenciação epidérmica (tromboxanos, prostaciclinas e prostaglandinas) e possui capacidade de modificar reações inflamatórias e

imunológicas, alterando funções leucocitárias (quimiotaxia) e acelerando o processo de granulação tecidual. (DECLAIR *et al*., 1998). Na literatura a atividade antimicrobiana do Dersani® é controversa (QUEGE *et al*., 2008). De acordo com Mandelbaum (2003), na fase de proliferação ocorre a reepitelização pela migração de queratinócitos e o processo mitótico; fibroplasia e deposição de matriz formando o tecido de granulação; e angiogênese para o suprimento do novo tecido.

Após 14 dias de indução da lesão, todas as feridas estavam fechadas, apesar disso, no tratamento com o extrato de Girassol e AGE o processo inflamatório ainda persistia. Além disso, a intensidade e a qualidade do colágeno foi melhor no grupo da Calêndula. Portanto, na fase de remodelação o extrato oleoso de *C. officinalis* parece ser mais eficiente. A fase de remodelação encerra com a resolução da ferida e cicatrização, com o leito totalmente preenchido por tecido de granulação e organização das fibras colágenas (BALBINO *et al*., 2005). Isso ocorreu porque o extrato das flores de *Calendula officinalis* apresenta como principais constituintes químicos saponinas triterpênicas, flavonóides, óleo essencial, carotenóides, taninos e polissacarídeos (BROWN & DATTNER, 1998; ALONSO, 1998). De acordo com Alonso (1998) esses componentes contribuem para a atividade reepitelizante e cicatrizantes, pois ativa o metabolismo das glicoproteínas, nucleoproteínas e o tecido colágeno. Assim como foi verificado por Klouchek-Popova (1982), o extrato de Calêndula promoveu uma maior intensidade no metabolismo de fibras colágenas durante o processo de cicatrização de feridas experimentais em ratas. Parente (2008) também concluiu que os efeitos das flores de *C. officinalis* sobre o processo cicatricial em feridas cutâneas de ratos foi positiva, bem como sobre a atividade antibacteriana *in vitro*.

Apesar de vários produtos serem indicados para todas as fases de cicatrização (MANDELBAUM *et al*., 2003), pelos resultados encontrados no presente trabalho, acreditamos que seria melhor indicado, produtos diferentes para cada fase do processo de cicatrização.

5 CONCLUSÃO

Observou-se que para cada fase da cicatrização existe um produto mais adequado, sendo que na fase inflamatória o soro fisiológico foi melhor; na de proliferação o AGE; e na de remodelação o extrato oleoso de *C. officinalis*.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. ALONSO, J. R. *Tratado de Fitomedicina: Bases clínicas y Farmacológicas.* Buenos Aires: Isis Ediciones, 1998, p.327-331.
2. AMORIM, E. *et al*. Efeito do uso tópico do extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (Babaçu) na cicatrização de feridas cutâneas – estudo controlado em ratos. *Acta Cir. Bras.,* 21(2):67-76, 2006.
3. BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev. Bras. De Ciências Farmac.,* 41(1): 27-51, 2005.
4. BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. N. Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular and molecular events. *Dermatol. Surg.* 31(6):674-686, 2005.
5. BEVILACQUA, R. G. *et al. Cicatrização. Manual do residente de cirurgia*. 2 ed., São Paulo: Pedagógica e Universitária, 1984.
6. BIONDO-SIMÕES, M. L. P. *et al*. Jaundice in second intention wound healing in rats. *Acta Cir. Bras.,*19(3): 176-185, 2004.
7. BIONDO-SIMÕES, M. L. P. *et al*. Síntese de colágeno após a implantação de telas de polipropileno em parede abdominal de ratos jovens e velhos. *Acta Cir. Bras.,* 20(4):300-304, 2005.
8. BRANCO-NETO, M. L. C. *et al*. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. *Acta Cir. Bras.,* 21(2):17-22, 2006.
9. BROWN, D. J.; DATTNER, A. M. Phytotherapeutic Approaches to Common Dermatologic Conditions. *Achta Dermatological*, 134: 1401-1404, 1998.
10. CORDOVA, C. A. Protective properties of butanolic extract of *Calendula officinalis* L. against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. *Redox Report*, W. Yorks, 7(2):95-102, 2002.
11. DAVISON, E. B. Managing wound in dogs and cats – Part 1. *Compendium on Continuing Education for the Practicing. Veterinaian,* Lousiania, v. 20, n.7, p. 811-20, 1998.
12. DEALEY, C. *Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, p. 49-65, 2001.
13. DECLAIR, V. Dermatite irritativa de fraldas. *Rev. Paul. Enf.,* 15(1/3):24-32, 1996.
14. DECLAIR, V - Carmona M. P. & Cruz, J. A., Ácidos Graxos Essenciais (AGES). Protetores Celulares dos Mecanismos Agressivos da Lesão Hipoxica.*Dermatologica Atual*, jan/fev/mar, 1998.
15. DECLAIR, V. Tratamento de úlceras crônicas de difícil cicatrização com ácido linoléico. *J Brás Med.,* 82(6):36-41, 2002.
16. DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, St.; ISAAC, O. The role of triterpenoids in the tropical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flower. *Planta Medica*, Stuttgart, 60:516-20, 1994.
17. HOYAMA, E. *et al*. Tratamento de feridas cutâneas extensas usando tecido dérmico acelular porcino com e sem cobertura impermeável. *An. Bras. Dermatol.* 80(4):369-374, 2005.
18. KLOUCHET- POPOVA, E.; POPOV, A.; PAVLOVA, N. Influence of the physiological regeneration and epithelization using fractions isolated from *Calendula officinalis. Acta Physiol Pharmacolog*., 8(4):63, 1982.

19. LI, J. *et al*. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25:9-18, 2007.
20. MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. *An Bras Dermatol,* 78(5):525-542, 2003.
21. MARQUES, S. R. *et al*. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. *Acta Cir Bras*, 19(3):196-209, 2004.
22. MARTINS, N. L. P. *et al*. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. *Acta Cir. Bras*., 21(3):66-75, 2006.
23. MARTINS, P. S. *et al*. Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em eqüinos. *Archives of Vet. Science*, 8(2):1-7, 2003.
24. OLIVEIRA, S. T. *et al*. Formulações do confrei (*Symphytum officinalis* L.) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia*, 7(1):61-65, 2000.
25. PARENTE, L. M. L. Atividades angiogênica, antiinflamatória, cicatrizante antibacteriana do extrato etanólico e frações das flores da *Calendula officinalis* L. cultivadas no Brasil. 2008. 58p. Tese (doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.
26. QUEGE, G. E. *et al*. Comparação da atividade de ácidos graxos essenciais e biomembrana na microbiota de feridas crônicas infectadas. *Ver. Eletr. Enf*, 10(4):890-905, 2008.
27. RAMOS, A. *et al*. Genotoxicity of na extract of *Calendula officinalis*. *Journal of Ethnopharmacol.* Havana, 61:49-55, 1998.
28. SARTORI, L. C. *et al*. Atividade antiinflamatória do granulado de *Calendula officinalis* L. e *Matricaria recutita* L. *Ver. Bras. De Farmacognosia*, 13:17-19, 2003.
29. SILVA, I. *et al*. *Noções sobre organismo humano e utilização de Plantas Medicinais.* 4. ed. Cascavel: Assoeste, 1995, p.200-234.
30. TESKE, M.; TRENTINI, A. M. *Herbarium*: compendio de fitoterapia. 3. ed. Curitiba: Editora Herbarium, 1995. p. 66-68.
31. VOLPATO, A. M. M. *Avaliação do potencial antibacteriano de Calendula officinalis (Asteracea) para seu emprego como fitoterápico.* 2005. 133f. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Química, Universidade Federal do Paraná.

Variabilidade acústica interpopulacional em *Scinax constrictus* (Anura, Hylidae)- Universidade Federal de Goiás

BASTOS, Rogério Pereira; GAMBALE, Priscilla Guedes (pri.gyn@gmail.com).
Palavras-chaves: Anuros, scinax, vocalização.

INTRODUÇÃO

Os anfíbios são animais vertebrados, pertencentes a classe Amphibia, com ampla distribuição mundial, sendo conhecidas 6350 espécies (Wake, 2008). A região geográfica com mais diversidade de anfíbios anuros é a região neotropical, abrange cerca de 50% das espécies conhecidas (Duellman, 1970; Glaw & Kohler, 1998; Lima, 2002). No Brasil, atualmente são conhecidas 821 espécies de anuros, tornando-o o país com maior diversidade de espécies (SBH, 2009; Lima, 2007).

Os anfíbios apresentam uma diversidade de modos reprodutivo muito maior que em qualquer outro grupo de vertebrados (Duellman & Trueb, 1986). A complexidade destes comportamentos depende por sua vez da organização social e duração do período reprodutivo de cada espécie (Wells, 1977).

O cerrado é considerado trópico sazonalmente seco, e nestes caso a reprodução de anuros se associa a disponibilidade de água, podendo ocorrer quando nestes ambientes ocorrem chuvas esporádicas suficientes para encharcarem o ambiente (Duellman & Trueb, 1986; Bertoluci, 1991; Bastos, R.P. et al., 2003).

Segundo Wells (1977), a reprodução de anuros ocorre por reprodução explosiva, em curtos períodos de tempo, em que o macho realiza a busca ativa pelas parceiras e reprodução prolongada, em que a chegada da fêmea ao local de reprodução é imprevisível, realizando-se em longos períodos e em geral, ocorre sinalização dos machos para fêmeas através de vocalizações.

Os sinais acústicos emitidos por machos de anfíbios anuros desempenham funções de atração de fêmeas, identificação sexual dos machos pelas fêmeas e territorialidade (Bastos e Haddad, 1996; Roesli e Reyner, 2000), atuando como importante fator nas interações sócias destes indivíduos (Abrunhosa, 2005).

O canto de anúncio exerce a função primária da comunicação acústica em anuros, que consiste em sinalizar para as fêmeas a presença e localização

de um parceiro coespecífico (Gehardt & Huder, 2002; Abrunhosa, 2005). Essa estratégia é encontrada na maioria das espécies de anfíbios anuros (Pombal Jr. & Haddad, 2005).

Os sinais acústicos emitidos por anfíbios podem apresentar alta diferença acústica interpopulacional (Avise, 1994) pela baixa capacidade de dispersão. Esta diferença acústica pode ser observada entre populações (Bernal *et al.*,2005) ou dentro de uma mesma população (Given, 2005).

Na variação acústica intra-individual, parâmetros relacionados a frequência dominante do canto, tendem a variar menos que os parâmetros temporais (Castellano *et al.*, 2000). Isto pode ocorrer devido ao controle dos parâmetros espectrais preferencialmente por fatores morfológicos, enquanto que os parâmetros acústicos temporais tendem a ser influenciados por fatores climáticos e/ou sociais (Tarano, 2001). Porém trabalhos recentes como o de Witte *et al.* (2001) têm verificado diferenças entre populações de uma mesma espécie para parâmetros estáticos.

OBJETIVOS

1- Verificar se as vocalizações de anúncio de populações diferentes de *Scinax constrictus* são correlacionadas com temperatura do ar, comprimento ou peso dos machos;

2- Verificar há diferença individual considerando as vocalizações emitidas

3- Verificar se cantos emitidos por machos de *S. constrictus* apresentam diferenças significativas inter-populacionais

METODOLOGIA GERAL

Scinax Wagler, 1830 é um dos mais diversos gêneros dentre os hilídeos neotropicais, incluindo 85 espécies (Caramaschi, 2004; Frost, 2002; Lima et al., 2004). O grupo de *Scinax rostratus* apresenta indivíduos com focinho pontudo,

tubérculo no calcanhar e os machos vocalizam com a cabeça voltada para baixo, nos ramos de vegetação arbustiva marginal (Lima *et al.,* 2004; Duellman, 1972; Faivovich, 2002). *Scinax constrictus* Lima, Bastos & Giaretta, 2004 é a única do grupo *Scinax rostratus* presente no Bioma Cerrado (Lima *et al*., 2004).

São indivíduos de pequeno comprimento rostro-cloacal, saco vocal pigmentado, com tubérculos na pálpebra superior, calcâneo e mandíbula (Lima *et al*., 2004). A atividade reprodutiva acontece entre os meses de Dezembro a Março, em poças permanentes de áreas abertas (Lima**,** 2002). Caracteriza-se por apresentar no dorso coloração variando de bege a marrom, com a presença de manchas escuras e grânulos de coloração marrom, laranja ou verde. O ventre é bege amarelado. Apresenta um triângulo escuro margeado por uma linha amarela, cuja base está posicionada entre os olhos com ápice voltado para região posterior (Lima, 2002; Lima *et al*., 2004).

As áreas escolhidas para realização do projeto localizam-se em Barro Alto (GO, 249 km de Goiânia e área de 1.232 km²), Palmeiras de Goiás (GO, 79 km de Goiânia e área de 1539,683 km^2); Pirenópolis (GO, 121 km de Goiânia e área de 2.227,793 km²),; Rio Verde (GO, 220 km de Goiânia e área de 8.415,40 km^2) e Carolina (MA, 860 km de São Luís e área de 6.442 km²).

Os indivíduos foram gravados no período de Outubro de 2007 a Março de 2008. Cada turno de observação foi iniciado ao final da tarde (17:30h – 18:00h) e encerrado quando a atividade dos animais diminuíram (por volta das 02:00h).

Os indivíduos foram gravados utilizando o microfone Sennheiser ME66 acoplado ao gravador Marantz. Depois de registradas as vocalizações, com distância de aproximadamente 50 cm do macho cantor, os indivíduos foram coletados para medição do comprimento rostro cloacal (CRC), utilizando-se paquímetro de precisão de 0,1mm e para medição da massa corporal, utilizando-se balança digital (precisão de 0,1 g). Também foi registrado o horário da vocalização de cada indivíduo e a temperatura do ar assim como umidade relativa do ar, utilizando-se cronômetro e termohigrômetro, respectivamente.

As observações noturnas foram realizadas com lanterna de luz branca e, quando necessário, utilizou-se filtro vermelho para reduzir o stress dos animais. Os métodos para realização das observações comportamentais foram o de

"animal focal", o de todas "ocorrências" e de "seqüências". A amostragem de "animal focal" foi de no máximo 10 minutos.

As vocalizações foram editados com freqüência de 22kHz. As análises das vocalizações, dos indivíduos foram realizadas utilizando os programas Avisoft-SASLab Light e Cool Edit Pro em computador PC-Pentium. Foram medidas de cinco cantos de cada indivíduo, as variáveis temporais: duração do canto, duração da nota, número de notas, duração do pulso e taxa de emissão, quando presentes, pelo programa Avisoft-SASLab Light; e a variável espectral freqüência fundamental e/ou dominante pelo programa Cool edit Pro.

Utilizou-se diversos autores, tais como: Duellman e Trueb (1994) e Gerhardt (1998), para revisão de termos para descrição das vocalizações.

Foi calculado o coeficiente de variação [CV=(desvio padrão/média)x 100] (Sokal & Rohlf, 1995) para cada parâmetro acústico intra-individualmente e inter-individualmente e estes puderam ser classificados como estáticos ou dinâmicos segundo Gerhardt (1991). Para calcular a variabilidade relativa de um parâmetro acústico foi feita a relação entre o coeficiente de variação inter-individual por coeficiente de variação intra-individual (CVinter/CVintra) (Robisson *et al.,* 1993). Para uma relação maior que 1 a propriedade é relativamente maior entre indivíduos.

Para verificar se variáveis espectrais ou temporais estão correlacionadas com o tamanho do indivíduo ou temperatura do ar, foi utilizado o índice de correlação de Pearson e para verificar se CRC, temperatura e umidade relativa do ar afetam os parâmetros acústicos foi feita uma regressão múltipla.

Para o estudo da variação inter-populacional de *Scinax constrictus,* utilizou-se resíduos da regressão, quando esta foi significativa, para as análises de variância pelo teste de ANOVA. Removeu-se assim os efeitos de CRC, temperatura e umidade na variação destes parâmetros. Os testes foram feitos seguindo SIEGEL (1975), HACCOU & MEELIS (1992) e ZAR (1996). O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

No total foram analisados as vocalizações de 74 indivíduos de *Scinax constrictus*, sendo 17 do município de Palmeiras de Goiás, 16 do município de

Pirenópolis (Goiás), 13 município de Barro Alto (Goiás), 15 indivíduos do município de Rio Verde (Goiás) e 13 do município de Carolina (Maranhão).

A média do comprimento rostro-cloacal (CRC) e das massas dos indivíduos, assim como a média da temperatura e umidade relativa do ar das localidades encontra-se na tabela 1. Em Carolina, Maranhão, não foram coletados os dados de massa dos indivíduos vocalizantes.

TABELA1: Média e desvios-padrões dos dados dos machos vocalizantes e do ambiente para as cinco localidades estudadas.

Localidade/ variáveis dos machos e ambientais	**CRC (mm) X±DP (N)**	**Massa (g) X±DP (N)**	**Temperatura X±DP (N)**	**Umidade X±DP (N)**
Palmeiras (Goiás)	26,48±1,2 (17)	0,93 ± 0,11 (17)	2345ºC ± 2,56 (17)	85% ± 9,97 (17)
Pirenópolis (Goiás)	25,84 ± 2,03 (16)	1,06 ± 0,18 (16)	23,58ºC ± 2,50 (16)	90,5% ± 6,91 (16)
Barro Alto (Goiás)	25,23 ± 0,88 (13)	0,82 ± 0,07 (13)	24,17ºC ± 2,56 (13)	85,23% ± 12,28 (13)
Rio Verde (Goiás)	24,73 ± 1,48 (15)	0,90 ± 0,14 (15)	20,77ºC ± 2,41 (15)	75,6% ± 8.88 (15)
Carolina (Maranhão)	26,73 ± 1,09 (13)	Sem dados de massa	26,38ºC ± 0,59 (13)	87,93% ± 2,94 (13)

Foi observado a presença de três tipos de vocalização: de anúncio, territorial I e territorial II, sendo que a mais freqüente foi a primeira. Os cantos territoriais não foram observados nos indivíduos do município de Rio Verde. No município de Palmeiras 10 indivíduos emitiram canto territorial I e 8 emitiram canto territorial II. No município de Barro Alto o canto territorial I foi emitido por quatro indivíduos, enquanto que o canto territorial II foi emitido por três indivíduos e apenas um indivíduo não apresentou canto de anúncio. No município de Pirenópolis o canto territorial I foi emitido por 3 indivíduos, o canto territorial II por 2 indivíduos e todos os emitiram canto de anúncio. No município de Carolina (Maranhão) o canto territorial I foi emitido por um indivíduo, o territorial II também um indivíduo e apenas um não apresentou canto de anúncio. Dessa forma, as análises de variação inter-populacional foram

realizadas somente com vocalizações de anúncio. Todavia, uma caracterização de cada vocalização é apresentada.

O canto de anúncio de *Scinax constrictus* é formado por várias notas, sendo cada nota formada por vários pulsos (multipulsionado). As médias das variáveis duração do canto, número de notas, duração de notas, número de pulsos, duração de pulsos, freqüência e taxa de repetição, para os cinco municípios estudados, estão presente na tabela 2.

O canto territorial I de *Scinax constrictus* é composto por uma única nota com vários pulsos multipulsionada. As médias e desvios-padrões deste canto nos três municípios estão presentes na tabela 3. O canto territorial II de *Scinax constrictus* é composto de uma única nota com vários pulsos (multipulsionado). Porém diferente do canto territorial I, apresenta uma menor duração do canto e pulsos menos espaçados. As médias e desvios-padrões deste canto nos três municípios estão presentes na tabela 4.

TABELA2: Médias e desvios-padrões dos parâmetros acústicos dos cantos de anúncio de *Scinax constrictus* das cinco localidades estudadas.

Localidade/ variáveis do canto de anúncio	**Duração do canto (ms) X±DP (N) (Amplitude)**	**Número de notas X±DP (N) (Amplitude)**	**Duração de notas (ms) X±DP (N) (Amplitude)**	**Número de pulsos X±DP (N) (Amplitude)**	**Duração de pulsos (ms) X±DP (N) (Amplitude)**	**Frequência X±DP (N) (Amplitude)**	**Taxa de repetição X±DP (N) (Amplitude)**
Barro Alto (Goiás)	150,92±39,94 (55) (51-265)	6,98±1,82 (55) (3-12)	12,04±1,16 (165) (4-20)	6,11±0,85 (165) (3-12)	1,82±0,31 (495) (1-5)	3585,38±373,31 (55) (2895-4383)	7,00±5,69 (13) (1-20)
Palmeiras (Goiás)	143,84±44,01 (85) (73-162)	6,75±1,77 (85) (3,6-8,2)	14,25±1,72 (105) (10-20)	6,12± 0,80 (105) (3,87-7,47)	2,94±0,43 (315) (2,3-3)	3415,18± 250,23 (85) (2320,02-3632,26)	15,53±10,82 (17) (2-16)
Pirenópolis (Goiás)	195,30±58,86 (75) (76-350)	8,23±2,11 (75) (4-14)	13,99±2,45 (225) (1-90)	5,04±0,69 (225) (3-10)	2,55±0,28 (675) (1-6)	3478,66±156,63 (75) (3021-3948)	11,62± 5,40 (16) (2-18)
Rio Verde (Goiás)	136,00±32,22 (75) (71-191)	5,48±0,94 (75) (4-9)	15,21±2,85 (225) (7-26)	6,96±1,31 (225) (3-12)	2,23±0,38 (675) (1-6)	3398,71±300,09 (75) (2782-3763)	7,27±5,72 (15) (6-25)
Carolina (Maranhão)	145,67±42,38 (62) (55-198)	8,84±2,29 (62) (4-12)	11,51±1,56 (186) (6-15)	5,88±0,86 (186) (3-10)	1,81±0,28 (558) (1-4)	3576,89±160,13 (62) (3161-3825)	15,38±14,86 (13) (6-19)

TABELA 3: Médias e desvios-padrões dos parâmetros acústicos dos cantos territorial I de *Scinax constrictus* das quatro localidades estudadas.

Localidade/ variáveis do canto territorial I	Duração do canto (ms) X±DP (N) (Amplitude)	Número de pulsos X±DP (N) (Amplitude)	Duração de pulsos (ms) X±DP (N) (Amplitude)	Frequência X±DP (N) (Amplitude)	Taxa de repetição X±DP (N) (Amplitude)
Barro Alto (Goiás)	230±83,88 (14) (125-444)	39,87±2,24 (14) (29-55)	2 ± 0,3 (42) (1-4)	3439,2±184,07 (14) (3028-3643)	11 ± 7,54 (4) (3-18)
Palmeiras (Goiás)	220,2 ± 44,52 (42)	30,41 ± 4,53 (42)	3,1 ± 0,56 (126)	3305,70 ± 225,62 (42)	5,55 ± 4,21 (42)
Pirenópolis (Goiás)	206±85,66 (11) (77-423)	31, ± 22,64 (11) (7-76)	3 ± 0 (33) (1-7)	3042,6 ± 25,93 (11) (3055-3400)	5,5 ± 6,36 (3) (1-10)
Carolina (Maranhão)	112 ± 0 (3) (55-178)	40,3 ± 0 (3) (25-51)	2 ± 0 (9) (1-3)	3222,67 ± 0 (3) (3134-3347)	2 ± 0 (1) (2)

TABELA 4: Médias e desvios-padrões dos parâmetros acústicos dos cantos territorial II de *Scinax constrictus* das localidades estudadas.

Localidade/ variáveis do canto territorial II	Duração do canto X±DP (N) Amplitude	Número de pulsos X±DP (N) Amplitude	Duração de pulsos X±DP (N) Amplitude	Frequência X±DP (N) Amplitude	Taxa de repetição X±DP (N) Amplitude
Barro Alto (Goiás)	51 ± 9,53 (11) (36-69)	30,53±6,48 (11) (19-38)	1 ± 0,41 (33) (1-3)	3213,67±140,56 (11) (2337-3719)	4,57±3,51 (3) (1-8)
Palmeiras (Goiás)	54,9 ± 14,32 (29)	28,34 ± 6,86 (29)	2,40 ± 0,33 (87)	3372,82 ± 236,65 (29)	1,81 ± 1,06 (29)
Pirenópolis (Goiás)	59±36,20 (10) (16-97)	22,6±21,78 (10) (4-46)	3±0,56 (30) (1-6)	3274,3±77,64 (10) (3055-3922)	9 ± 7,07 (2) (4-14)
Carolina (Maranhão)	43,2 ± 0 (5) (38-47)	30,6 ± 0 (5) (24-37)	1,8 ± 0 (15) (1-4)	3368,6 ± 0 (5) (3161-3666)	38 ± 0 (1) (38)

O canto de anúncio apresentou diferenças significativas entre as cinco localidades em relação aos parâmetros acústicos duração do canto ($F_{(4,69)}$=4,35; P<0,01), duração de notas ($F_{(4,69)}$=3,60; p=0,01), número de pulsos ($F_{(4,69)}$=3,83; p<0,01), duração de pulsos ($F_{(4,69)}$=29,63; p<0,01) e taxa de repetição ($F_{(4,69)}$=2,99; p=0,02).

A aplicação do teste de Tukey possibilitou identificar diferenças significativas entre os municípios de Pirenópolis e Rio Verde, Pirenópolis e Carolina, Pirenópolis e Palmeiras para a variável duração do canto (Figura 1).

Diferenças significativas também foram observadas entre os municípios de Pirenópolis e Barro Alto e Barro Alto e Palmeiras para a variável duração de notas. A variável número de pulsos apresentou diferenças entre os municípios de Maranhão e Pirenópolis, Pirenópolis e Palmeiras. A variável duração de pulsos apresentou diferenças significativas entre os municípios de Barro Alto e Pirenópolis, Rio Verde e Palmeiras; Pirenópolis e Carolina e Palmeiras; Rio Verde e Carolina e Palmeiras; Palmeiras e Carolina.

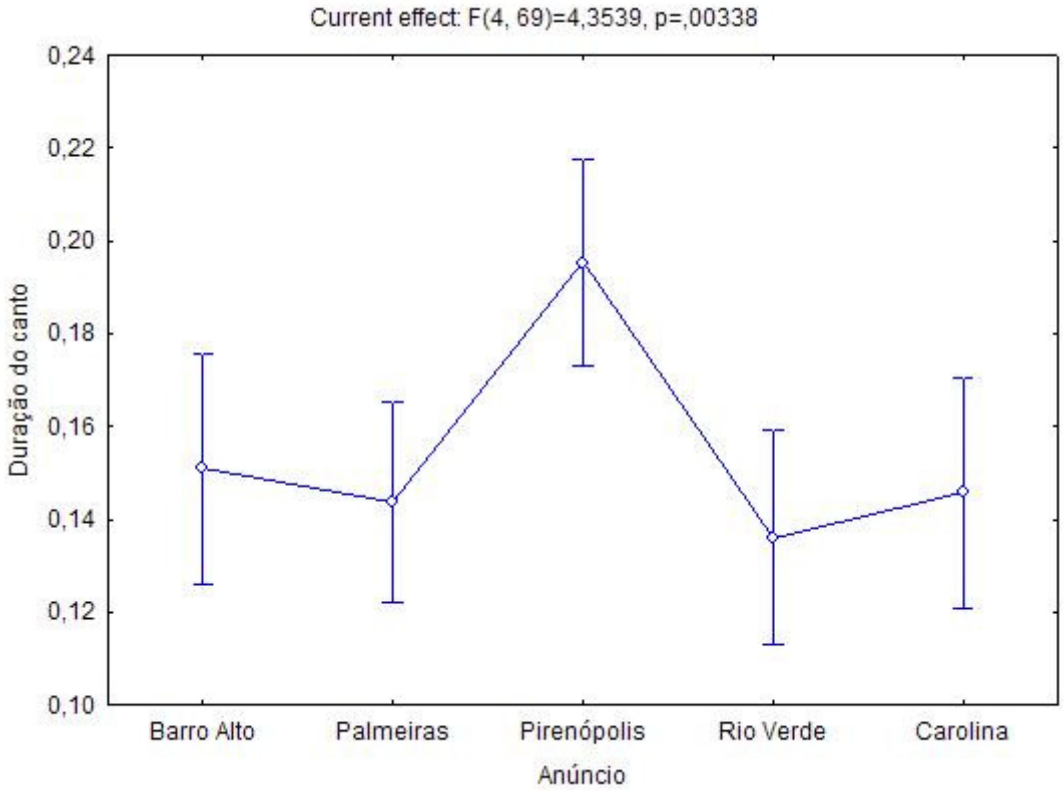


Figura 1: Diferenças entre as populações estudadas de *Scinax constrictus* considerando duração do canto de anúncio.

No município de Palmeiras houve correlações significativas da massa dos indivíduos com taxa de repetição. Em Pirenópolis houve correlações da massa dos machos cantores com duração de notas, da temperatura e umidade com taxa de repetição. No município de Barro Alto não houve correlações entre as variáveis do canto de anúncio dos indivíduos e as características do macho cantor e do ambiente. Em Rio Verde também não ocorreram correlações significativas. Em Carolina houve correlações significativas entre temperatura e duração de notas e duração de pulsos e da umidade com duração do canto, número de notas, duração de notas e duração de pulsos (Tabela 5).

TABELA 5: Valores significativos do r de Spermann para algumas variáveis do canto de anúncio de *Scinax constrictus* e características ambientais ou dos machos vocalizantes.

Localidade	Variaveis do canto	CRC	Massa	Temperatura	Umidade
Carolina	Duração do canto	0,10	*	0,50	**-0,73**
Carolina	Número de notas	0,14	*	0,39	**-0,68**
Carolina	Duração de notas	-0,13	*	**0,84**	**-0,70**
Carolina	Duração de pulsos	0,098	*	**0,64**	**-0,62**
Pirenópolis	Duração de notas	-0,33	**-0,53**	0,05	-0,12
Pirenópolis	Taxa de repetição	-0,37	-0,26	**0,63**	**-0,66**
Palmeiras	Taxa de repetição	0,16	**0,57**	-0,42	0,36

* Não foram medidos a massa dos indivíduos da região do Maranhão.

O coeficiente de variação intra-individual dos parâmetros acústicos analisados para cada população encontra-se na tabela 6. Seguindo os critérios de Gerhrdt (1991), onde CV< 5% considera-se propriedade estática, CV entre 5% e 12% propriedade intermediária e CV> 12% considera-se propriedade dinâmica. Então para as localidades de Pirenópolis, Barro Alto, Rio Verde e Carolina, os parâmetros temporais do canto foram classificados como dinâmicos e os espectrais (frequência) como estático.

O coeficiente de variação inter-individual dos parâmetros acústicos analisados para cada população encontram-se na Tabela 7. Segundo Gerhardt (1991), onde CV<10% estático, CV entre 10% e 20% intermediário e CV>20% dinâmico, para as localidades de Pirenópolis, Barro Alto, Rio Verde e Carolina o parâmetro espectral freqüência apresentou propriedade estática. Em Pirenópolis os parâmetros temporais duração do canto e número de notas apresentaram propriedades dinâmicas, e os parâmetros duração de notas, número de pulsos e duração de pulsos apresentam propriedades intermediárias. Barro Alto apresenta propriedades dinâmicas para os parâmetros duração de notas, número de notas e duração de notas, e propriedades intermediárias para os parâmetros número de pulsos e duração de pulsos. Rio Verde apenas duração do canto apresentou propriedade dinâmica e todos os demais parâmetros temporais foram intermediários. Em Carolina os parâmetros temporais duração do canto e número de notas, apresentaram propriedades dinâmicas, e os demais parâmetros temporais propriedades intermediárias.

Calculou-se a proporção entre variação inter-individual e variação intra-individual, fornecendo um medida de variabilidade relativa entre os machos. Quando a razão é superior a 1, os parâmetros acústicos são mais variáveis entre indivíduos que intra indivíudos (Tabela 8). A variabilidade relativa entre machos foi maior para duração de cantos e número de notas, com exceção de Rio Verde; para duração de notas na localidade de Barro Alto, e para freqüência em todas as localidades.

Tabela 6: Coeficiente de variação intra-individual dos parâmetros acústicos do canto de anúncio de *Scinax constrictus* de diferentes localidades. Em negrito os coeficientes de variação de propriedades estáticas (CV<5%).

Localidade	Duração do canto	Número de notas	Duração de notas	Número de pulsos	Duração de pulsos	Frequência
Barro Alto (Goiás)	19,54	16,87	25,10	23,07	39,59	**4,42**
Pirenópolis (Goiás)	18,95	16,93	34,86	23,37	36,03	**2,96**
Rio Verde (Goiás)	26,78	24,89	24,41	25,70	46,77	**3,92**
Carolina (Maranhão)	17,22	15,03	19,97	19,33	37,13	**4,03**

Tabela 7: Coeficiente de variação inter-individual dos parâmetros acústicos do canto de anúncio de *Scinax constrictus* de diferentes localidades. Em negrito os coeficientes de variação de propriedades estáticas (CV<10%).

Localidade	Duração do canto	Número de notas	Duração de notas	Número de pulsos	Duração de pulsos	Frequência
Barro Alto (Goiás)	25,20	24,96	25,81	16,19	17,73	**8,95**
Pirenópolis (Goiás)	28,23	23,98	17,06	13,53	10,81	**4,81**
Rio Verde (Goiás)	24,25	17,05	18,08	18,17	16,48	**8,60**
Carolina (Maranhão)	29,09	25,88	13,52	14,59	15,34	**4,48**

Tabela 8: Relação coeficiente de variação inter-individual e intra-individual dos parâmetros acústicos do canto de anúncio de *Scinax constrictus* de diferentes localidades. Em negrito os valores superiores a 1.

Localidade	Duração do canto	Número de notas	Duração de notas	Número de pulsos	Duração de pulsos	Frequência
Barro Alto (Goiás)	**1,29**	**1,48**	**1,03**	0,70	0,45	**2,02**
Pirenópolis (Goiás)	**1,49**	**1,42**	0,49	0,58	0,30	**1,62**
Rio Verde (Goiás)	0,91	0,68	0,74	0,71	0,35	**2,19**
Carolina (Maranhão)	**1,69**	**1,72**	0,68	0,75	0,41	**1,11**

DISCUSSÃO

As vocalizações observadas nos indivíduos machos da espécie de *Scinax constrictus* foram anúncio, territorial I e territorial II. Estes tipos de canto são frequentemente observados nos estudos de comportamento de anfíbios anuros. No gênero *Scinax*, o repertório acústico é complexo (Toledo &Haddad, 2005), e além dos cantos de anúncio são observados outros cantos como de encontro (*Scinax canastrensis*; Cardoso & Haddad, 1982), agonísticos (*S. ruber*; Bourne, 1992) e canto de amplexo (*S. rizibilis*; Bastos & Haddad, 2002).

Os cantos territoriais apesar de terem sido menos freqüentes, são importantes para delimitação territorial dos indivíduos no coro, possivelmente evitando combates físicos durante interações entre machos (Toledo & Haddad, 2005). Evita-se, assim, gasto energético dos indivíduos, diminuindo as lesões que as brigas podem causar em anuros. Este comportamento agressivo é observado em *Scinax constrictus* e dentre vários hilídeos, como em Bastos & Haddad (1995) e Martins *et al.* (1998).

Em anfíbios anuros, as vocalizações podem estar correlacionadas significativamente com alguns aspectos abióticos, como temperatura e umidade (Bastos & Haddad, 1995) assim como pode ser observado em Carolina, Maranhão e Pirenópolis. Outros autores (Giacoma *et al.*, 1997; Tárano, 2001) não encontraram correlação entre alguns parâmetros acústicos e temperatura, assim como foi observado na região de Rio Verde e Barro Alto.

As análises de variação do canto de anúncio de *Scinax constrictus* demonstram que algumas variáveis de um mesmo canto podem ser dinâmicas enquanto outras são mais esteriotipadas. As variáveis que são consideradas mais esteriotipadas, podem servir como referência de escolha de machos por fêmeas que vão preferir estas propriedades mais próximas a média da população. Enquanto que propriedades dinâmicas afetam escolha das fêmeas que preferem variáveis do canto com valores extremos à média populacional (Gerhardt, 1991; Castellano & Giacoma, 1998).

No presente estudo o parâmetro espectral freqüência apresentou-se estático em relação aos parâmetros temporais, o que era esperado, uma vez que parâmetros temporais tendem a ser mais variáveis por sofrerem rápidas mudanças de acordo com contexto social que o indivíduo está inserido (Castellano *et al.*, 2002).

A variabilidade relativa entre os indivíduos apresentou valores superiores para propriedades estáticas indicando que estes parâmetros podem contribuir para reconhecimento individual da espécie. Portanto, a freqüência dos cantos das espécies está intimamente relacionada a escolha da fêmea pelo macho,servindo para reconhecimento da espécie e como mecanismo pré-zigótico de isolamento, para evitar o cruzamento de espécies diferentes.

De acordo com as análises estatísticas os cantos de anúncio analisados sofreram variações significativas entre as populações mencionadas para a maioria dos parâmetros descritos. Os cantos territoriais devido ao baixo número observados, não foram analisados.

O parâmetro espectral freqüência dominante não apresentou diferenças entre as localidades, mostrando ser uma variável mais estática para a espécie *Scinax constrictus* em relação aos parâmetros temporais, corroborando com o trabalho de Castellano & Giacoma (2000). O parâmetro espectral em questão, sofreu influência do CRC (fator morfológico), como dito em Tarano (2001), porém também foi influenciado por temperatura. Parâmetros temporais tendem a ser mais variáveis por sofrerem rápidas mudanças de acordo com contexto social que o indivíduo está inserido (Castellano *et al*., 2002), e para o canto de anúncio todas as variáveis temporais apresentaram variação para as populações estudadas, com exceção do número de notas. Utilizando a regressão múltipla para eliminar a influência dos dados bióticos e abióticos na variabilidade acústica, fica mais provável que a variabilidade existente entre as populações ocorram pelo contexto social do indivíduo.

Informações sobre variação acústica em populações de anuros são importantes para otimizar protocolos de monitoramento de anfíbios (Dorcas *et al*., 2003).

CONCLUSÃO

- Indivíduos machos de *Scinax constrictus* apresentaram três tipos de cantos: anúncio, território I e território II.
- Em Palmeiras houve correlações significativas de fatores morfológicos e a variável taxa de repetição.

- Em Pirenópolis houve correlações significativas de fatores morfológicos e ambientais com as variáveis do canto de anúncio.
- Não foram encontradas correlações de fatores ambientais e morfológicos com o canto de anúncio no município de Barro Alto e Rio Verde.
- Em Carolina houve correlações significativas de fatores ambientais com variáveis do canto de anúncio.
- As variáveis do canto de anúncio: duração do canto, duração de nota, número de pulsos e duração de pulso apresentaram diferenças significativas entre as cinco populações analisadas.
- O parâmetro espectral freqüência apresentou-se estático em relação aos parâmetros temporais.
- A variabilidade relativa entre os indivíduos apresentou valores superiores para propriedades estáticas.
- O canto de anúncio apresentou diferenças significativas entre as populações para todas as variáveis acústicas temporais com exceção da variável número de notas.
- A variável espectral freqüência dominante não variou entre as populações indicando ser mais estática para a espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUNHOSA, Patrícia. ***Interações Sociais em Três Espécies do Grupo de Scinax ruber (Anura, Hylidae)***. Rio de Janeiro: UFRJ, 2005. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas / Zoologia). Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

AVISE, J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. London: Chapman & Hall.

BASTOS, R. P., AND C. F. B. HADDAD 2002. Acoustic and aggressive interactions in *Scinax rizibilis* (Anura: Hylidae) during the reproductive activity in southeastern Brazil. **Amphibia- Reptilia** 23:97–104.

BASTOS, R.P., HADDAD, C.F.C1996.. Breeding activity of the neotropical treefrog hyla elegans (anura, Hylidae). **J. Hertol**. n. 30(3), p.355-360.

BASTOS, R.P. & HADDAD, C.F.B 1995.Vocalizações e interações acústicas em *Hyla elegans* (Anura, Hylidae) durante a atividade reprodutiva. **Naturalia** n.20, p. 165-176.

BERNAL, X.E.; GAURNIZO, C. & LÜDDECKE, H. 2005. Geographic variation in advertisement call and genetic structure of *Colostethus palmatus* (Anura, Dendrobatidae) from the Colombian Andes. *Herpetologica,* 61(4): 395-408.

BOURNE, G. R 1992. Lekking behavior in the Neotropical frog Ololygon rubra. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 31:173–180.

CARDOSO, A. J., AND C. F. B. HADDAD 1982.. Nova espécie de Hyla da Serra da Canastra (Amphibia, Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Biologia** 42:499–503.

CASTELLANO, S.; CUATTO, B.; RINELLA R.; ROSSO A.; GIACOMA C. 2002. The Advertisement Call of the European Treefrogs (*Hyla arbórea*): A Multilevel Study of Variation. **Ethology.** 108: 75 – 89.

CASTELLANO, S. & GIACOMA, C. 1998. Morphological variation of the green toad, *Bufo viridis*, in Italy: A Test of Causation. **Journal of Herpetology** 32(4):540-550.

CASTELLANO, S. & GIACOMA, C. 2000. Morphometric and advertisement call geographic variation in polyploid green toads. *Biol. J. Lin. Soc.*, 70: 341-360.

DORCAS, M.E.; TODD, M.J.; ROSS, R.C. 2003. Temporal and spatial variation in anuran calling activity in the Wersten Piedmont of north Carolina. Journal of the North Carolina Academy of Science 119(3), pp.103-110.

DUELLMAN, W.E. 1970. Identity of South American hylid frog Garbeana garbei. Copaia 1970 (3): 534-538

DUELLMAN, W. E. & TRUEB, L. 1986. *Biology of Amphibians*. New York, McGraw-Hill, 670pp

DUELLMAN, W. E. & TRUEB, L. 1994. *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press. 670pp.

DUELLMAN, W. E. 1972. South American Frogs of the *Hyla rostrata* group (Amphibia, Anura, Hylidae). **Zoologische Mededelingen**. 47(14): 178 – 195.

GERHARDT, Carl; HUBER, Franz. 2002. ***Acoustic Communication in insects and Anurans***: common problems and diverse solution. Chicago and London, University of Chicago Press.

GERHARDT, H. C. 1991. Female Mate Choice in Treefrogs: Static and Dynamic Acoustic Criteria. **Animal Behaviour**. 42: 615 – 635.

GERHARDT, H.C. 1998. Acoustic signals of animals: recording, field measurements, analysis and description. *In:* HOPP, S.L.; OWREN, M.J.; EVANS, C.S. (Eds). *Animal acoustic communication*. Springer Verlag.

GIACOMA, C.; ZUGOLARO, C. & BEANI L., 1997. The advertisement calls of the green toad (*Bufo viridis*): variability and role in mate choice. **Herpetologica**, Lawrence, 53(4):454- 464.

GIVEN, M.F. 2005. Vocalizations and reproductive behavior of male pickerel frogs*, Rana palustris*. *J. Herpetol.*, 39(2): 223-233.

GLAW, F. & KOHLER, J. 1998. Amphibian species diversity exceeds that of mammals. **Herpetological** n. 29 (1), p. 11-12.

HACCOU, P. & MEELS, E. 1992. *Statistical analysis of behavioural data* – an approach based on time structure models. Oxford: Oxford Univ. Press, 396 pp.

JOUVENTIN P, AUBIN T AND LENGAGNE T. 1999. Finding a parent in a King Penguin colony: the acoustic system of individual recognition. **Anim Behav** 57: 1175-1183.

LIMA, L. P.; BASTOS, R. P.; GIARETTA, A. A. 2004. A New *Scinax* Wagler, 1830 of the *S. rostratus* group from Central Brazil (Amphibia, Anura, Hylidae). **Arquivos do Museu Nacional.** 62(4): 505 – 512.

LIMA, L.P. 2002. *Biologia Reprodutiva, Vocalizações e Comportamento Agressivo em Scinas aff. Nebulosus (Amphibia, Anura, Hylidae)*. Dissertação (Mestrado em Biologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. 103pp.

.MARTINS, M., J. P. POMBAL JR., AND C. F. B. HADDAD. Escalated aggressive behaviour and facultative parental care in the nest building gladiator frog, Hyla faber. **Amphibia-Reptilia** 19:65–73.1998.

POMBAL JR., J.P. & HADDAD, C.F.C, 2005. Estratégias e mdoos reprodutivos de anuros (Amphibia) em uma poça permanente na Serra da Paranapiacaba, Sudeste do Brasil. **Papéis avulsos de Zoologia 45** (15): 201-213.

ROBISSON, P.; AUBIN, T. & BREMOND, J.C.. 1993. Individuality in the voice of the emperor penguin *Aptenodytes fosteri*: adaptation to a noisy environment. **Ethology**, 94: 279-290.

ROESLI, M.; REYNER, H.U. *2000.* Male vocalization and female choice in the hybridogenetic *Rana lessonae/Rana esculenta complex.* ***Anim. Behav****. n. 60 (6), p. 745-755.*

SBH. 2008. *Brazilian amphibians – List of species*. Accessible at http://www.sbherpetologia.org.br. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acessado em 19/Julho/ 2009.

SIGNORELLI, L.L.F. 2007. Efeitos da intensidade sonora sobre o comportamento de *Scinax constrictus (*ANURA, HYLIDAE) Lima, Bastos e Giaretta. Goiânia: UFG, 2007. Monografia em Ciências Biológicas/Comportamneto animal. Universidade Federal de Goiás, 2007.

SOKAL, R. R. & . J. ROHLF. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research.* 3rd edition. W. H. Freeman and Co.: New York. 887 pp. ISBN: 0-7167-2411-1.

TARANO, Z. 2001. Variation in male advertisement calls in neotropical frog *Physalaemus enesefae*. **Copeia**, 2001(4): 1064-1072.

TOLEDO, L. F. & HADDAD, C. F. B. 2005. Acoustic repertoire and calling site of *Scinax fuscomarginatus* (Anura, Hylidae). **Journal of Herpetology**, 39(3): 455-464.

ZAR, J.H. 1996. *Biostatistical Analysis*. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 818 p.

WAKE, D. Amphibian Web: an on line reference (13 July 2008) Eletronic database available at http://www.amphibiaweb.org/index.html. Acessado em 13 Jullho 2008.

WELLS, K.D. The social behavior of anurans amphibians. **Animal behavior**, n. 25, p 666-693. 1977.

WITTE, K.; RYAN, M. J. & WILCZYNSKI, W. 2001. Changes in the frequency structure of a mating call decrease its attractiveness to females in the cricket frog *Acris crepitans*

A formação de professores que atuam na educação profissional na modalidade da educação de jovens e adultos – Proeja em Goiás[1]

Cinthia Mendes Ferreira (Bolsista PIBIC)
cinthia.jpv@gmail.com
Profª Drª Maria Margarida Machado FE/UFG (orientadora)
mmm2404@gmail.com

Palavras-chave: Formação de professores, educação de jovens e adultos e educação profissional, tecnologias da informação e da comunicação.

Introdução

A presente pesquisa teve como objetivo investigar o processo de formação continuada dos professores que atuam na modalidade de Educação de Jovens e Adultos (EJA) nas redes públicas, realizado em um curso de Especialização em Educação Profissional Integrada à Educação Básica na modalidade de Educação de Jovens e Adultos. O referido curso foi oferecido pelo convênio firmado entre o Centro Federal de Educação Tecnológica de Goiás (CEFET-GO), atualmente Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás (IFG), e a Faculdade de Educação da Universidade Federal de Goiás (FE/UFG).

A metodologia utilizada foi o acompanhamento *in loco* de uma das três turmas oferecidas no curso de especialização, com observação participante em todas as aulas das dez disciplinas que compuseram a proposta pedagógica. Foram aplicados questionários para identificação do perfil dos professores/alunos em formação. Por fim, foi realizado o acompanhamento da definição dos temas das monografias finais de todos os professores/alunos, seguido de apreciação crítica de quatro monografias.

O referencial teórico que deu suporte a análise proposta nessa pesquisa contribuiu para a compreensão de conceitos e categorias, tais como Educação, Trabalho, Formação Integral, Currículo Integrado. Para tanto, foram referências os

[1] Esta pesquisa de iniciação científica integra uma pesquisa em rede nacional, financiada pela Capes/Setec, que em Goiás intitula-se O Proeja indicando a reconfiguração do campo da Educação de Jovens e Adultos com qualificação profissional – desafios e possibilidades. Sua versão na integra pode ser acessada no sítio www.forumeja.org.br/pf

autores: Vitor Henrique Paro, Asa Cristina Laurel, Carlos Roberto Jamil Cury, Silvia Maria Manfredi, Jaqueline P. Ventura, Marta Kohl de Oliveira, Maria Cecília de Souza Minayo, Marise Ramos, Maria Ciavata, Cristian Laville, Paulo Freire, Gaudêncio Frigotto, Jane Paiva. Além desses, utilizamos a legislação acerca da temática e sítios oficiais, como o portal do Ministério da Educação e o portal dos Fóruns de EJA, entre outros.

Este artigo traz parte das reflexões advindas da pesquisa, ora concluída, iniciando por uma exposição sobre o curso de especialização – sua intencionalidade e sua concretude; em seguida apresenta os professores/alunos envolvidos e analisa as condições reais de participação desses no curso proposto; finaliza dialogando com o alcance ou não dos objetivos propostos na formação realizada, tomando como referência as monografias apresentadas no final do curso.

Formação Continuada em cursos de especialização – sua intencionalidade e sua concretude

A Educação de Jovens e Adultos em todo seu contexto histórico aponta para pouca formação específica de seus profissionais. Para que esse quadro se reverta, estão sendo feitas ações, em colaboração com a sociedade civil e o governo federal, para formar os profissionais que atuam nessa modalidade. O curso de especialização em PROEJA teve como objetivo:

> Formar profissionais das redes públicas federal, estadual e municipais, para atuar na elaboração de estratégias de ensino-aprendizagem, de prever pro-ativamente as condições necessárias e as alternativas possíveis para o desenvolvimento adequado da Educação Profissional Integrada à Educação Básica na Modalidade de Jovens e Adultos, considerando as peculiaridades, as circunstâncias particulares e as situações contextuais concretas em que estes campos têm sido atendidos nas redes públicas de ensino. (Centro Federal de Educação Tecnológica de Goiás, 2007. p.08).

O currículo que norteou o curso de especialização em Proeja estruturou-se por “aulas expositivas, seminários, pesquisas na rede mundial de computadores, projetos interdisciplinares, metodologia de resolução de problemas, estudos de

caso, estudo dirigido, entre outros." (Centro Federal de Educação Tecnológica de Goiás, 2007). Os professores que ministraram as aulas nesta especialização são professores do IFG e da FE/ UFG. Discorremos sobre as disciplinas ofertadas em breve resumo acerca de cada uma, apresentando a seguir seus impactos na formação dos professores.

No eixo 1 a primeira disciplina foi História e sujeitos da Educação de Jovens e Adultos (EJA) e Educação Profissional (EP) no Brasil, tendo como enfoque a historicização do perfil dos alunos de EJA e EP a partir da realidade vivida pelos professores/alunos, na Educação de Jovens e Adultos, dando fundamentação teórica para tal e abrindo novos horizontes no que se refere a Educação Profissional; a segunda, Interface EJA e EP com movimentos sociais, apresentando a diferenciação e a importância dos movimentos sociais para a educação, principalmente, para a Educação de Jovens e Adultos; a terceira, Concepções de Educação e Trabalho, tratando da categoria trabalho e o seu desenvolvimento no modo de produção capitalista. O trabalho de fechamento do Eixo I, que gerou um primeiro texto dos alunos teve como intuito iniciar as primeiras aproximações dos temas da EJA e EP para o trabalho monográfico.

As disciplinas do Eixo 2 foram Estado e políticas educacionais que discutiu sobre as políticas sociais e políticas públicas com base nas legislações pertinentes sobre o tema geral da educação, desde a Constituição Federal de 1988 passando pela 1ª e 2ª LDB – Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional, Lei nº 4.024 de 1961 e Lei nº 9.394, de 20 de dezembro de 1996, respectivamente, e as influências e neutralidades do Estado com relação à educação e seu objeto de estudo na sociedade. A disciplina de Gestão democrática na EJA e na EP, tratando dos princípios democráticos para a educação e a importância da gestão democrática e suas particularidades junto ao PROEJA e os direitos destes alunos como cidadãos.

O Eixo 3 a disciplina Produção do conhecimento e pesquisa, ministrada, apresentou-se acerca do conhecimento e da informação e o papel da pesquisa, percebendo quais são os modelos de pesquisas feitas atualmente. A disciplina Investigação como ferramenta metodológica discorrendo sobre a ciência, as

metodologias utilizadas e a importância da teoria na produção de uma pesquisa. Nesta disciplina os alunos fizeram um projeto inicial para pesquisa de monografia.

O Eixo 4 inicia com a disciplina Teoria do currículo e concepção de currículo integrado, buscou-se nesta disciplina compreender o que o currículo representa no contexto escolar e os direitos a serem assegurados pelo poder maior para que todos tenham uma educação completa do ponto de vista da formação humana e qualificada no sentido de que todos têm o direito de serem inseridos no trabalho, na concepção de que é um direito universal dos seres humanos. A disciplina de Metodologia integrada de EJA e EP abordou uma diferenciação, na qual no decorrer da disciplina muito se discutiu do perfil do aluno de EJA quanto as suas especificidades e a metodologia a ser utilizada com os mesmos, se queremos formar para a reprodução desta sociedade ou se formaremos produtores da mesma. E por último a disciplina de Avaliação numa proposta de currículo integrado, tratando-se de um tema muito debatido que interfere na formação tanto do aluno quanto do professor. A avaliação foi estudada sobre várias visões com o intuito de que pudessem se apossar da compreensão de que a avaliação é um instrumento que perpassa todo o relacionamento professor-aluno e como este instrumento pode ser usado para exclusão ou para integração dos alunos com o professor e de ambos com a sua formação humana e profissional.

O desenvolvimento das disciplinas acompanhado por esta pesquisa foi atravessado por várias dificuldades. As atividades propostas e as leituras realizadas pelos professores/alunos tiveram que considerar as realidades dos mesmos, sendo esta, uma carga horária de trabalho excessiva com dois e três turnos por dia, com horário de estudo inexistente. Portanto, houve flexibilidade na entrega de trabalhos, reestruturação destes trabalhos para melhor aproveitamento. Isso propiciou aos professores/alunos diferenciadas experiências e olhares para uma formação mais completa sem seguir fielmente os prazos marcados para a produção do conhecimento. Ainda, avaliando os impactos da forma de trabalhar dos professores, podemos afirmar que parte dos alunos do curso esperava uma dinâmica menos rigorosa, chegando a justificar algumas das desistências que ocorreram ao longo do processo do curso.

Professores/alunos e os desafios da formação em serviço

Os professores/alunos com aulas presenciais na FE/UFG que fizeram parte da Turma C revelaram um perfil particular, pois as outras duas turmas tiveram uma desistência muito grande já no início das aulas presenciais. A turma que foi objeto dessa pesquisa teve no decorrer do curso um acompanhamento ímpar, pois a coordenação da turma, com autonomia para tomar algumas decisões, auxiliou em necessidades específicas da turma, não prejudicando assim o andamento das aulas da especialização. Isto revela que o processo de formação desses profissionais precisa de um acompanhamento minucioso.

Podemos tomar como exemplo um dos pré-requisitos para a entrada na especialização que seria a liberação dos professores para cursarem as aulas presenciais, porém muitas vezes necessitaram de declarações de freqüência para entregar às respectivas escolas para justificar a ausência em alguma atividade extra da instituição.

Os livros[2] disponibilizados aos alunos foram muito utilizados, pois estavam de fácil acesso, numa pequena biblioteca reservada que fora organizada por nós com esquema elaborado de devolução e empréstimos de forma que todos pudessem utilizar os livros estudados naquele momento e também para estudos posteriores, colaborando com a construção das monografias.

Essa especialização contou também com o acesso a três sítios[3], disponíveis não só aos professores/alunos desta especialização, mas a todos que tem o interesse de se informar e se inteirar mais sobre esse universo é pouco utilizado. Tanto os professores que ministraram as disciplinas quantos os professores/alunos durante e após o término das aulas presenciais não souberam apreciar o que o conteúdo dos mesmos tinha para oferecer. Muitos textos que estavam disponíveis a todos no acervo virtual eram disputados quando estavam no acervo físico da biblioteca do curso, isso revela a pouca intimidade dos

[2] Acervo, contendo 76 publicações, disponibilizado exclusivamente para os alunos da especialização, sendo cada turma responsável por um número de exemplares.
[3] Estes sítios resultaram do trabalho de pesquisa de iniciação científica no período 2007/2008, sendo eles: www.forumeja.org.br/go; www.forumeja.org.br/pf ; www.forumeja.org.br/gt18 .

profissionais da educação no uso dessa tecnologia que acaba por exigir outra forma de se apropriar do texto.

Quanto ao perfil dos professores/alunos podemos constatar que a maioria dos alunos da especialização, turma "C", 83% é do sexo feminino, com idade entre 35 a 54 anos que moram em Goiânia e cidades próximas. Mais de 50% dos alunos já cursaram outra especialização em sua maioria na área de humanas. A carga horária de trabalho dos profissionais que fazem esta especialização é de 30h a 60h semanais, isso em muitos casos inviabiliza o tempo de estudo mínimo para a qualidade da formação continuada dos mesmos. Uma característica da turma de especialização investigada é que, na sua constituição, a organização entre os alunos e com os alunos e professores é bem visível, esta auto-organização é vista por Pistrak (2000), quando trata dos princípios que orientam o fazer pedagógico nas escolas soviéticas, como algo necessário para a formação política e geral dos alunos.

> Nosso objetivo é não apenas formar cidadãos obedientes às leis, talvez ligados a seu regime, a seu Estado, e cheios de estima por ele, mas homens que participem conscientemente na organização do Estado soviético pelo seu trabalho cotidiano, homens conscientes e com o sentimento de que cada um, isoladamente, é responsável pela organização (p. 200).

A organização autônoma desses alunos colabora para sua formação direta e indiretamente. A representação dos alunos quanto à discussão de seus interesses frente à coordenação ajuda na garantia dos mesmos, no que diz respeito aos seus interesses e como irão defendê-los com um mínimo de fundamentação e novas propostas para melhoria tanto para os alunos quanto para os professores da especialização. Um exemplo concreto ocorreu durante as aulas de junho que foram reordenadas, pois coincidiu com o término do semestre letivo, isso traria dificuldades tanto para os trabalhos a serem desenvolvidos quanto para as atividades das escolas que os professores/alunos tinham sob sua responsabilidade.

Partindo do fato de que os alunos têm uma auto-organização também propiciaram momentos de festividades, de cultura e lazer, de interatividade, isso fez com que o vínculo não se restringisse ao simples momento da aula e trabalhos

a respeito. Para alguns, isso foi decisivo para permanência até o momento final do curso presencial.

As expectativas dos professores da especialização quanto ao desempenho dos professores/alunos foi diferenciada, isto é, para alguns houve avanços e novas contribuições. Em outros casos para que o professor/aluno pudesse concluir determinada disciplina era necessário que fizesse um novo trabalho para alcançar os resultados mínimos esperados. Isto se deu, pois muitos não tinham oportunidade de maior aproveitamento das fontes de pesquisa a eles ofertada, muitas vezes por falta de tempo, por motivo de saúde, família, trabalho, enfim muitos foram e são os motivos para que não seja concluída esta especialização.

Um dos motivos que cabe destacar para a dificuldade e permanência e conclusão do curso é a sobrecarga desses professores nos seus afazeres na instituição escolar onde trabalham com um número excessivo de alunos. Isto reforça uma concepção de escola tradicional, segundo Saviani (1989), onde o sujeito mais importante é o professor, pois é o detentor do conhecimento que transmite o seu conhecimento adquirido aos seus alunos que apreendem de qualquer maneira, este conhecimento mesmo que ele não seja de forma alguma útil, sendo visto como um ignorante por não ter a sabedoria necessária, mínima, para sobrevivência nesta sociedade.

> A escola surge como um antídoto à ignorância, logo, um instrumento para equacionar o problema da marginalidade. Seu papel é difundir a instrução, transmitir os conhecimentos acumulados pela humanidade e sistematizados logicamente. O mestre-escola será o artífice dessa grande obra. A escola se organiza, pois, como uma agência centrada no professor, o qual transmite, segundo uma gradação lógica, o acervo cultural aos alunos. A este cabe assimilar os conhecimentos que lhes são transmitidos. (p. 18)

Numa pedagogia nova, segundo Saviani (1989), a escola tinha o poder de formar a sociedade, isto é, transformar todos em cidadãos de direitos e deveres iguais, sem nenhum tipo de discriminação e que assim não haveria mais rejeitado por esta sociedade igualitária. Todavia essa proposição partia de uma visão de agrupamentos menores de alunos para cada professor

> O professor agiria como um estimulador e orientador da aprendizagem cuja iniciativa principal caberia aos próprios alunos.

> Tal aprendizagem seria uma decorrência espontânea do ambiente estimulante e da relação viva que se estabeleceria entre os alunos e entre estes e o professor. Para tanto, cada professor teria de trabalhar com pequenos grupos de alunos, sem o que a relação interpessoal, essência da atividade educativa, ficaria dificultada; e num ambiente estimulante, portanto, dotado de materiais didáticos ricos, bibliotecas de classe etc. (p.21)

No entanto, o que observamos é que pouco se fez para a manutenção desta proposta de escola, principalmente com relação às questões financeiras, e isso implicava na formação inicial e continuada dos professores. Por isso a formação de professores até os dias atuais é desenvolvida com entraves, barreiras e dificuldades, às vezes, na maioria dos casos é assim, maior que a vontade do próprio professor de continuar os seus estudos.

Os professores/alunos que abandonaram esta especialização, campo de pesquisa, desistiram por diferenciados motivos. A saúde da família e dos próprios professores foi um fator que retirou alguns alunos da sala de aula, tanto a saúde do corpo quanto à saúde mental, o stress está se tornando comum no trabalho docente. Outros fatores agravantes que impediram alguns professores/alunos de chegarem ao final desta especialização foram os empecilhos postos pela instituição onde esses profissionais trabalham.

Contudo, nem tudo foram perdas, alguns professores/alunos que permaneceram tiveram que enfrentar muitas barreiras, por exemplo, quatro professores/alunos vinham para as aulas de outra cidade, três moravam próximos a Goiânia e uma a seis horas de viagem. Desses apenas um desistiu por motivo de doença, todos para permanecer tiravam do próprio bolso o pagamento das passagens de ônibus para chegar a Goiânia e assistir as aulas presenciais.

A turma “C” da especialização iniciou as aulas presenciais com 36 alunos matriculados, concluiu as atividades do mês de março com 61% dos alunos e houve 14 alunos desistentes, representando uma porcentagem de 39% do total.

O aprendizado possível nesse processo de formação de professores

Podemos perceber no quadro a seguir a temática a ser desenvolvida nas monografias de todos os professores/alunos que concluíram as disciplinas

presenciais da terceira turma desta especialização.

Quadro 1 – Tema da monografia

Educação de jovens e adultos integrada a qualificação profissional para o aluno trabalhador da indústria de mineração
EJA e as expectativas de qualificação profissional dos trabalhadores do CEASA-GO
As políticas de financiamento para a EJA e EP no município de Goiânia (1996-2007)
Procedimento metodológico de avaliação do curso técnico integrado em serviço de alimentação CEFET-GO
A importância da língua estrangeira (inglês) na EAJA na modalidade da EP.(RME)
Arte: Luxo ou necessidade do aluno trabalhador da EJA
Perspectiva de implantação do PROEJA no colégio estadual Visconde de Mauá – Goiânia
A prática pedagógica no Programa AJA extensão como possibilidade da educação humanizadora dos trabalhadores da COMURG
Os sujeitos da EJA e suas expectativas de qualificação profissional na rede municipal de Goiânia
Integração da Ed. Profissional com a Ed. Básica, Profissionais: Profissionais professores, professores profissionais.
Evasão dos alunos trabalhadores da EAJA - da rede municipal de Goiânia
A importância da linguagem/aprendizagem dos sujeitos do PROEJA/CEFET-GO
Direito à educação na modalidade EJA
A escola como espaço de referência para o idoso da rede municipal de Goiânia
PROEJA/GO, as expectativas e desafios dos professores da rede estadual.
Os desafios da integração curricular no CEFET-GO
EAJA e ensino profissional na rede municipal de Goiânia: O caso dos adolescentes
Possibilidades e desafios da implantação do PROEJA, no Col. Est. João Barbosa Reis
As políticas públicas educacionais para a EJA e EP nas escolas rurais de Goiânia
Integração Curricular da educação básica e profissional
Ensino articulado versus ensino integrado: O caso SENAI
Educação de jovens e adultos e o ensino profissional em Goiás Pós-LDB.

Fonte: Informações retiradas dos projetos de monografia dos professores/alunos

Para os profissionais que permaneceram as expectativas são que

compreendam quão importante é a sua formação para que a Educação de Jovens e Adultos e a Educação Profissional e sua integração, por meio do PROEJA, seja efetivada e que se torne uma política pública da educação, sem perder suas características especificas e com recursos e espaços públicos e isto é direito de todos os cidadãos e dever do Estado.

> Tanto quanto um direito, a educação é definida, em nosso ordenamento jurídico, como dever: direito do cidadão – dever do Estado. (...) Mas como se trata de um direito reconhecido, é preciso que ele seja garantido e, para isso, a primeira garantia é que ele esteja inscrito no coração de nossas escolas, cercado de todas as condições (CURY, 2007. p.484)

As temáticas diversificadas apontam para um objeto em comum a integração da EJA com a EP, 73% dos temas indicados para o trabalho monográfico final. O tema escolhido por alguns professores/alunos, 27% deles, é visto do ponto de partida, neste caso, o trabalho na escola de origem, apontando para a pouca relevância que o curso ofereceu em sua formação continuada.

Os temas escolhidos que têm proximidade com os objetivos do curso, reportam ao aprofundamento de estudos realizados durante o período de aulas presenciais, por exemplo, o currículo integrado, as políticas públicas para que essa integração se efetive, o estudo de e porque de um interesse pelo retorno a escola a partir de incentivos aos jovens e adultos, público alvo em determinados locais.

Partindo agora das monografias analisadas mais de perto, um tema de monografia foi à proposta de intervenção da realidade pesquisada, este caso em especifico ocorreu com o professor/aluno B[4], que durante o processo de formação se tornou secretario da educação em seu município, isto trouxe novas oportunidades de estudo. Para tanto sua monografia é uma proposta teórica de implantação do Proeja – FIC[5].

A formação profissional deve ser garantida nas instituições públicas não só nas escolas federais com uma política de governo, que acabará quando o governo acabar, mas que permaneça como uma política pública nas instâncias estadual e

[4] As quatro monografias analisadas criticamente foram identificadas com letras sem ligação com o real nome.
[5] Uma proposta de PROEJA com Formação Inicial e Continuada / Ensino Fundamental.

municipal. Essa perspectiva se contrapõe ao que vinha sendo defendida por autores como Hayer, que faz a defesa de uma educação profissional subsidiada pelo Estado, todavia apenas com intuito de atender aos interesses de mercado, com o treinamento dos trabalhadores.

> Qualquer tipo de educação que se volte para o treinamento vocacional não deve, pois, ser subsidiada pelos fundos públicos, dado que um melhor preparo profissional vai se refletir, no futuro, em melhores salários. Em se tratando de um meio de valorização do capital humano, o ensino profissionalizante deve ser, portanto, totalmente privatizado, posto que "grande parte do aumento da renda que é possível auferir em ocupações que exigem tal treinamento constituirá tão-somente um retorno sobre o capital investido".(HAYER, 1983: p. 453).

Nessa reflexão proposta pela especialização em Proeja, a concepção de educação profissional é ao contrário uma oferta de que deve ser pública e voltada a formação do sujeito em sua totalidade. Enfim, a formação profissional precisa ser problematizada pela sociedade para que possamos cobrar do Estado o seu dever de agir, de assegurar um direito de todo o cidadão a sua formação plena (AZEVEDO, 2004).

O professor/aluno C em sua monografia apresentou historicamente as duas modalidades de ensino, Educação de Jovens e Adultos e Educação Profissional, destacando suas separações e diferenciações ao longo de suas trajetórias. A marginalização das modalidades é um dos pontos analisado. A ligação entre trabalho e educação aparece com ênfase quando é tratada a questão da integração entre as duas modalidades de ensino.

> A integração ensino profissional e a educação de jovens e adultos têm como essência, a relação entre o trabalho e a educação, o mundo do trabalho que procura produtividade, diminuição de custo sabe que um profissional polivalente será capaz de enquadrar neste modelo. E interessante observar que até as escolas tem passado por transformações para se enquadrar a esta realidade com as reformas dos currículos e novas propostas político-pedagógicas e a implantação do modelo de gerência da qualidade total. (IFG, professor/aluno C. p.16)

Já o professor/aluno D no decorrer do texto faz referência ao possível estudo que vai aproximando as duas modalidades legalmente diferentes, porém com trajetórias históricas parecidas. As políticas voltadas para essa integração

são analisadas minuciosamente.

As dificuldades enfrentadas no campo de atuação das escolas que os professores/alunos trabalham são em muitos casos a temática escolhida para desenvolver e avançar os estudos na monografia de final de curso. Todavia, a integração da EJA e EP se mostrou presente na monografia do professor/aluno D que, durante todo o texto que abordou as questões políticas das duas modalidades e as que relacionam as mesmas, isto é, aquilo que as diferencia e o que as aproxima, desde as concepções, objetivos e resultados propostos para os programas de integração curricular.

> A concepção de educação do PROEJA é uma concepção de educação continuada de cunho profissional, para além da educação básica, que rompe com a dualidade cultura geral versus cultura técnica, a primeira, educação academicista, destinada aos filhos das classes mais favorecidas socioeconomicamente e a segunda, educação instrumental voltada para o trabalho, destinada aos filhos da classe trabalhadora. O objetivo da formação fundamenta-se na integração ente trabalho, ciência, tecnologia, humanismo e cultura geral, contribuindo para o enriquecimento científico, cultural, político e profissional dos sujeitos atendidos pelo programa, através da indissociabilidade dessas dimensões no mundo real, estreitamente vinculadas às condições necessárias ao efetivo exercício da cidadania. (IFG, professor/aluno D. p.34)

Na monografia do professor/aluno A o foco não é especificamente a Educação Profissional nem a Educação de Jovens e Adultos, mas a junção das duas modalidades num atendimento da área rural, o que o fez aproximar da experiência da educação no campo.

> A educação do campo, também tendo sua oferta negligenciada nos padrões definidos nos documentos oficiais, tem sido construída a partir das lutas históricas dos movimentos sociais, juntamente com outras reivindicações como a saúde, o direito a terra, a organização da produção, etc. Essas lutas, conforme o documento Referência para uma Política Nacional de Educação do Campo, buscam efetivar o campo como um espaço de direito, não superior nem inferior a cidade, mas como espaço produto e produtor de cultura. (IFG, professor/aluno A. p. 26)

Portanto, os resultados da investigação apontam em parte os limites no alcance dos objetivos propostos, tomando como referência a falta de conhecimentos e vivências entre as duas modalidades de ensino que são foco do

curso: EJA e EP. Isto é, as análises feitas apontaram para a tentativa de aprofundar a vivência na EJA e seus percalços com uma primeira aproximação com os novos conhecimentos acerca da integração das duas modalidades.

Na análise mais aprofundada das quatro monografias duas se apresentaram com mais dificuldades de interação com o objetivo da especialização, portanto, o perfil desta especialização, caso haja nova edição, deverá ser revisto durante todo o percurso, partindo das aulas presenciais até a construção final das monografias. O trabalho monográfico final não pode ser visto como irrelevante, pois é neste momento em que o aluno opta por uma determinada área e aprofunda seus conhecimentos e desenvolve afinidades para futuros estudos na mesma.

Considerações finais

Podemos enfim considerar, a formação inicial e continuada dos profissionais da educação como de fundamental relevância para o avanço e desenvolvimento de suas competências, sendo sempre professores/alunos que refletem a sua prática e modificam-na criticamente.

> O saber docente não é formado apenas da prática, sendo também nutrido pelas teorias da educação. Dessa forma, a teoria tem importância fundamental na formação dos docentes, pois dota os sujeitos de variados pontos de vista para uma ação contextualização, oferecendo perspectivas de análise para que os professores compreendam os contextos históricos, sociais, culturais, organizacionais e de si próprios como profissionais (PIMENTA, 2002. p.24)

A formação continuada deve oferecer embasamento teórico para que esses profissionais consigam persistir em sua trajetória não só profissionalmente críticos, mas que considerem a pesquisa como um princípio para qualquer trabalho, haja vista que compreendendo sua relevância seja agora algo corriqueiro em suas atividades do dia-a-dia.

Quanto às monografias do curso de especialização em Proeja da turma C, podemos dizer que foram satisfatórias para alcançar a conclusão desta formação, no entanto, os professores/alunos não podem parar seus estudos acerca da temática, ainda nova para esses profissionais, mas que já demonstrou sua

importância tanto na prática, com sua implementação, quanto teoricamente fundamentado.

Portanto, o Proeja para que seja concretizado como uma política pública de impactos na qualidade de vida dos sujeitos jovens e adultos é necessário que as oportunidades de ampliação do mesmo sejam apanhadas com responsabilidade. Assim, a formação tem o papel de orientar os profissionais com qualidade para que haja continuidade nas discussões teóricas de ensino e pesquisa dentro das instituições que oferecem o programa.

Referências

AZEVEDO, Janete M. Lins de. **A educação como política.** Campinas, São Paulo: Autores Associados, 3. Ed , 2004.

BRASIL, **Constituição da República Federativa do Brasil.** Brasília, DF: Senado, 1988.

_____, Lei n. 9.394, de 20 de dezembro de 1996. **Dispõe sobre as Diretrizes e Bases da Educação Nacional.** *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 23 dez. 1996.

_____, Lei n. 4.024, de 20 de dezembro de 1961. **Fixa as diretrizes e Bases da Educação Nacional.** Senado Federal. Subsecretaria de Informações.

_____, Ministério da Educação. Secretaria de Educação Continuada, Alfabetização e Diversidade. **Documento Nacional Preparatório à VI Conferência Internacional de Educação de Adultos (VI CONFINTEA)** / Ministério da Educação (MEC). – Brasília: MEC; Goiânia: FUNAPE/UFG, 2009.

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE GOIÁS. **Projeto Pedagógico de Pós-graduação *Lato Sensu* Programa de capacitação de profissionais do Ensino Público para atuar na Educação Profissional integrada à Educação Básica na modalidade de Educação de Jovens e Adultos.** Goiânia – Goiás, 2007.

CURY, Carlos Roberto Jamil. **A gestão democrática na escola e o direito à educação.** Disponível em: RBPAE – v.23, n.3, p.483-495 Acesso em: Set/dez. 2007

FRIEDMAN, M. **Capitalismo e Liberdade**. São Paulo, Abril Cultural, 1984.

HAYER, F. **Os fundamentos da liberdade**. Brasília, Editora da Universidade de Brasília, 1983.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS – IFG. **Integração Curricular na Escola Rural: possibilidades de uma educação de qualidade social aos povos de uma educação de qualidade.** Monografia: professor/aluno A, 2009.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS – IFG. **PROEJA – Espaço de inclusão social do funcionalismo municipal de Bonfinópolis.** Monografia: professor/aluno B, 2009.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS - IFG. **Educação de jovens e adultos integrada a qualificação profissional para o aluno trabalhador da indústria de mineração.** Monografia: professor/aluno C, 2009.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS - IFG. **A experiência do Projovem: as condições financeiras para a viabilidade da EJA com formação profissional.** Monografia: professor/aluno D, 2009.

PIMENTA, Selma Garrido(org.) **Professor Reflexivo no Brasil : gênese e crítica de um conceito.** São Paulo: Cortez, 2002.

PISTRAK, **M.M. Fundamentos da escola do Trabalho : uma pedagogia social.** São Paulo : Expressão Popular, 2000.

SAVIANI, Demerval. **Escola e democracia : teorias da educação, curvatura da vara, onze teses sobre educação e política**. São Paulo: Cortez/Autores Associados, 1989.

Estudo da correlação existente entre os reguladores de apoptose (p53 e Bcl-2) com o prognóstico de lesões cancerizáveis e carcinomas bucais

Stéfano de Florenzano*, Marília Oliveira Morais, Aline Carvalho Batista, Elismauro Francisco de Mendonça.

Email: Florenzano.s@hotmail.com

Departamento de ciências estomatológicas - Disciplina de patologia geral e bucal - Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG).

Palavras-chave: Câncer de boca, Leucoplasia, oncoproteína Bcl-2 e gene p53.

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de boca e de orofaringe são as neoplasias de cabeça e pescoço mais freqüentes, com cerca de 390 mil novos casos por ano (STEWART, 2003).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil ocorrerão 466.730 novos casos de câncer em 2009. E, a boca se destaca como uma das localizações primárias da doença, com uma estimativa de 14.160 novos casos (INCA 2009).

Dos tumores de boca, 95% são carcinomas espinocelulares (CEC) e os outros 5% correspondem a sarcomas, linfomas e tumores de glândulas salivares (STEWART, 2003).

O CEC pode estar associado ou ser precedido por lesões cancerizáveis, ou seja, lesões constituídas por um epitélio de revestimento, morfologicamente alterado, com risco de transformação maligna maior que o tecido normal (MIGNOGNA, 2004).

Dentre essas lesões a leucoplasia se destaca, sendo caracterizada por uma placa esbranquiçada não raspável e diagnosticada microscopicamente como uma hiperortoqueratose (GABRIEL, 2004).

Representando uma variante de baixo grau do CEC o carcinoma verrucoso (CV) é um tumor raro que possui características peculiares, como crescimento lento e metástase infreqüente (ADEGBOYEGA, 2005; BOUQUOT, 1998; CARROZZO, 1997).

Apesar de todos os avanços no diagnóstico e, principalmente, na terapêutica, com técnicas cirúrgicas radicais, novas drogas quimioterápicas e radioterapia hiperfracionada e conformacional, o câncer de cavidade oral continua com um prognóstico desfavorável, com altas taxas de mortalidade (STEWART, 2003).

O comportamento biológico do CEC de cavidade oral é incerto, pois há um grande número de tumores que em estádio inicial mostram um comportamento biológico agressivo com metástase regional precoce e morte. Ao contrário, tumores em estádio avançado podem metastatizar-se e esses pacientes, depois do tratamento, obtêm longos períodos livres de doença (MONTORO, 2008).

Devido a essa incerteza de evolução, os pesquisadores começaram a procurar fatores que pudessem influenciar o prognóstico. Esses fatores podem estar relacionados ao paciente (idade, sexo, raça, condições sócio-econômicas e hábitos, como tabagismo e etilismo), ao tumor (sítio, estádio, espessura do tumor, histopatologia e expressão de certos marcadores moleculares) e ao tratamento (tipo de tratamento e terapia adjuvante) (MONTORO, 2008). O estudo desses fatores prognósticos visa um melhor entendimento do comportamento biológico do tumor, viabilizando o estabelecimento de uma estratégia específica de tratamento para cada paciente, sendo que receberão tratamento mais agressivo aqueles que tiverem piores evoluções (MONTORO, 2008).

Diante desses dados, o estudo molecular da etiopatogênese das lesões cancerizáveis e carcinomas bucais podem colaborar na busca por marcadores moleculares possivelmente capazes de indicar o comportamento biológico e ainda determinar a severidade e prognóstico de cada lesão. Dentre os genes associados ao câncer de boca, o p53 e o Bcl-2 são uns dos mais investigados.

Considerado o “guardião da célula”, o p53 é um gene supressor de tumor que em condições normais previne a propagação de defeitos no DNA, reparando-os ou induzindo apoptose (HAFIAN, 2004; Kuo, 1999; KUROKAWA,

2003). Células com defeitos na função do p53 são propensas à transformação maligna. As mutações neste gene são um dos eventos mais comuns nos tumores humanos, incluindo os carcinomas orais (ABBAS, 2007; HAFIAN, 2004; Kuo, 1999). Essas mutações produzem acúmulo da proteína p53, a qual pode ser detectada no núcleo das células, em níveis consideráveis, através de exames por imunoistoquímica, tanto em lesões consideradas cancerizáveis quanto em lesões malignas (ABBAS et al, 2007; HAFIAN et al, 2004; Kuo et al, 1999).

De acordo, portanto, com o princípio acima, existe a hipótese de que uma quantidade elevada de células p53 positivas em lesões cancerizáveis e carcinomas bucais pode representar um pior prognóstico para o paciente, já que as células mutadas se proliferariam ativamente não sendo eliminadas por apoptose e nem reparadas.

A oncoproteína Bcl-2 é um bloqueador de morte celular por apoptose. Experimentos de transferência gênica mostraram que níveis elevados desta proteína podem proteger uma ampla variedade de células contra estímulos de morte celular como os causados por danos no DNA, por drogas anti-câncer e pela radiação (PIATTELLI et al, 2002).

Diante disso, podemos concluir que uma superexpressão da oncoproteína Bcl-2 pode representar um pior prognóstico para o paciente.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar a relação existente entre a imunoexpressão das proteínas p53 e Bcl-2 com o prognóstico da leucoplasia sem displasia (LSD), leucoplasia com displasia (LCD), Carcinoma Verrucoso (CV) e Carcinoma Espinocelular (CEC).

METODOLOGIA

1 - Seleção das amostras

Nesse estudo foram selecionadas 11 amostras de Mucosa Normal (MN) como controle, 8 amostras de LSD, 9 amostras de LCD, 6 amostras de CV e 15 amostras de CEC dos arquivos de blocos do Laboratório de Patologia Bucal da FO/UFG e que são provenientes de pacientes atendidos e biopsiados no Centro Goiano de Doenças da Boca (CGDB) da FO/UFG. As amostras controle são de pacientes não fumantes e não etilistas.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG (Universidade Federal de Goiás), protocolado sob o número 081/2005.

2 - Técnica imunoistoquímica

A partir dos casos selecionados, emblocados em parafina, foram realizados cortes seriados com aproximadamente 3μm de espessura, em micrótomo (Leica); em seguida, estes foram montados em lâminas silanizadas. Os cortes sobre as lâminas silanizadas foram submetidos à técnica imunoistoquímica do tipo Imunoperoxidase (Avidina-Biotina-Peroxidase) para identificação da expressão das proteínas p53 e Bcl-2 presentes no epitélio, mais especificamente no citoplasma e núcleo das células, respectivamente, de todas as amostras selecionadas. Os anticorpos primários utilizados foram o anticorpo monoclonal de camundongo anti-oncoproteína BCL-2 Humana Dako (clone 124 – M0887) a uma diluição de 1:500 e anticorpo monoclonal de rato P-53 (NCL – p 53- DO7), com diluição de 1:200. Amostras de líquen-plano e hiperplasia fibrosa inflamatória foram usadas como controle positivo, pois apresentam hiper reatividade para a oncopoteína Bcl-2. Linfócitos normais que estavam no tecido conjuntivo das amostras de LSD, LCD, CV E CEC representaram controle positivo interno.

3 - Análise Qualitativa

Todas as amostras foram previamente analisadas por um profissional especializado em patologia para verificar a qualidade das amostras e a presença de imunoreação.

4 - Análise Quantitativa

O número de células $p53^+$ e $Bcl\text{-}2^+$ foi quantificado por meio de análise morfométrica, utilizando microscópio óptico contendo um retículo de integração em rede quadriculada (CARL ZEISS, Germany). Foi utilizada uma objetiva de 40x. Para cada amostra, a quantidade de células avaliadas foi de 1000 células na região epitelial, desde a superfície até o fronte de invasão nas neoplasias, da superfície epitelial à interface epitélio conjuntivo nas leucoplasias e o mesmo para o controle, sempre registrando o número total de células positivas e negativas. A partir desse resultado, obteve-se a porcentagem de células $Bcl\text{-}2^+$ e $p53^+$ em cada amostra e essas porcentagens foram graduadas em scores da seguinte maneira: 0 (Negativa), 1+ (<20% de células positivas), 2+ (21% a 50% de células positivas) e 3+ (>50% de células positivas). Esses scores foram feitos de acordo com Drachenberg (1997) e colaboradores.

5 – Prognóstico

Nos casos de CEC e CV foi realizada a análise dos prontuários dos pacientes avaliados quanto ao percentual de células $p53^+$ e $Bcl\text{-}2^+$, buscando correlacionar a expressão imunoistoquímica dessas proteínas ao prognóstico de cada lesão. Dos prontuários foram obtidos 3 fatores de estabelecimento do prognóstico: o estadiamento clínico, a gradação histológica e o tempo de acompanhamento, os quais foram correlacionados a expressão das proteínas p53 e Bcl-2. Nos casos de leucoplasia também foi realizada a análise dos prontuários dos pacientes e quantificados o percentual de células $p53^+$ e $Bcl\text{-}2^+$. O prognóstico, no caso das lesões cancerizáveis, foi relacionado à ocorrência ou não de transformação maligna e os dados demográficos dos pacientes não foram apresentados neste trabalho, já que muitos dados não estavam disponíveis nos prontuários. O tempo de acompanhamento de cada paciente foi determinado pelo período entre a primeira consulta e o último controle.

6 - Análise estatística

O Coeficiente de Correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a correlação existente entre a expressão das proteínas p53 e Bcl-2 com o estadiamento clínico, a gradação histológica e o tempo de acompanhamento, ou seja, com os fatores de prognóstico para as lesões malignas (CV e CEC).

RESULTADOS

Os resultados obtidos para as amostras investigadas após análise qualitativa e quantitativa do grupo CEC e CV são apresentados na tabela abaixo.

Tabela 1 – Distribuição da freqüência (n) e percentagem (%) do grupo CV e CEC em relação às variáveis descritas na tabela.

	CV (n=6)		CEC (n=15)	
Variáveis	**N**	**(%)**	**N**	**(%)**
Idade				
≤ 67 anos	5	83,3	10	66,6
≥ 67 anos	1	16,6	5	33,3
Sexo				
Masculino	4	66,7	12	80
Feminino	2	33,3	3	20
Raça				
Leucoderma	4	66,7	8	53,3
Melanoderma	2	33,3	7	46,7
Tabaco				
Sim	3	50	13	86,7
Não	3	50	2	13,3
Alcóol				
Sim	3	50	7	46,7
Não	3	50	8	53,3
Score bcl 2				
Negativo	4	66,7	-	-
1+	2	33,3	-	-
2+	-	-	1	6,7
3+	-	-	14	93,3
Score p53				
Negativo	1	16,7	5	33,3
1+	4	66,7	2	13,3
2+	1	16,7	2	13,3
3+	-	-	6	40
Gradação histológica (OMS)				
I – II	5	83,3	6	40
III – IV	1	16,6	9	60
Estadiamento Clínico				
T1-T2	2	33,3	10	66,6
T3-T4	4	66,6	5	33,3

1 ou + linfonodos	-	-	11	73,3
Nenhum linfonodo	6	100	4	26,6
Metástase				
Sim	-	-	-	-
Não	6	100	15	100

CV = Carcinoma verrucoso; CEC = Carcinoma Espinocelular; Negativo= células sem marcação; 1+para < 20% das células positivas; 2+ para 21% a 50% de células positivas; 3+ para > 50% de células positivas; n= número de amostras de cada grupo. Gradação histológica: I e II para respectivamente carcinoma Espinocelular bem diferenciado e moderadamente diferenciado; III e IV para carcinoma Espinocelular pouco diferenciado e anaplásico, respectivamente.

A expressão das proteínas p53 e Bcl-2 nos grupos CV e CEC estão apresentadas em scores na tabela acima. No grupo MN a expressão média foi de 14,37% (p53) e 13,86% (Bcl-2). Já a expressão média dessas proteínas no grupo LSD foi 24,76% (p53) e 10,78% (Bcl-2) e no grupo LCD: 27,69% (p53) e 17,19% (Bcl-2).

De acordo com a análise dos dados (Coeficiente de Correlação de Spearman) não houve correlação da expressão das proteínas p53 e Bcl-2 com nenhum dos três fatores prognósticos (estadiamento clínico, gradação histológica e tempo de acompanhamento). Esse mesmo teste não pôde ser realizado nos grupos LSD e LCD já que as leucoplasias não são classificadas quanto ao estadiamento clínico e gradação histológica, entretanto, é importante salientar que não houve transformação maligna de nenhum dos 17 casos de leucoplasia dentro do período analisado.

O tempo de acompanhamento variou de 12 a 96 meses. E o teste de sobrevida não foi realizado devido ao número reduzido da amostra.

Nas figuras 1 e 2 mostra as micrografias das marcações p53 e Bcl-2 em MN, LSD, LCD, CV e CEC.

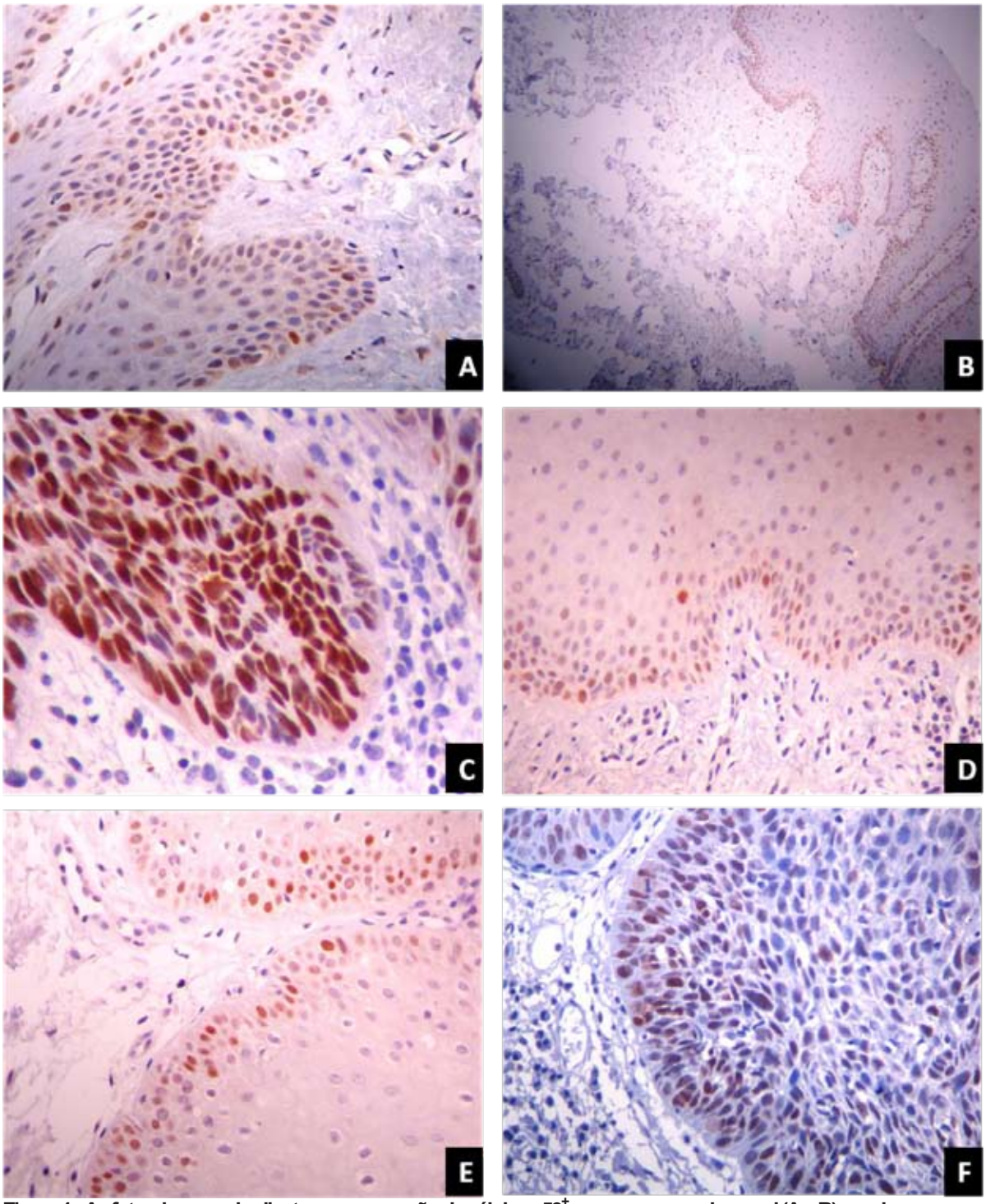


Figura 1 - As fotomicroscopias ilustram a expressão de células p53^{+} em: mucosa oral normal (A e B), carcinoma verrucoso (C), leucoplasia sem displasia (D), leucoplasia com displasia (E), carcinoma espinocelular (F). Imunoistoquímica, aumento original de 40x.

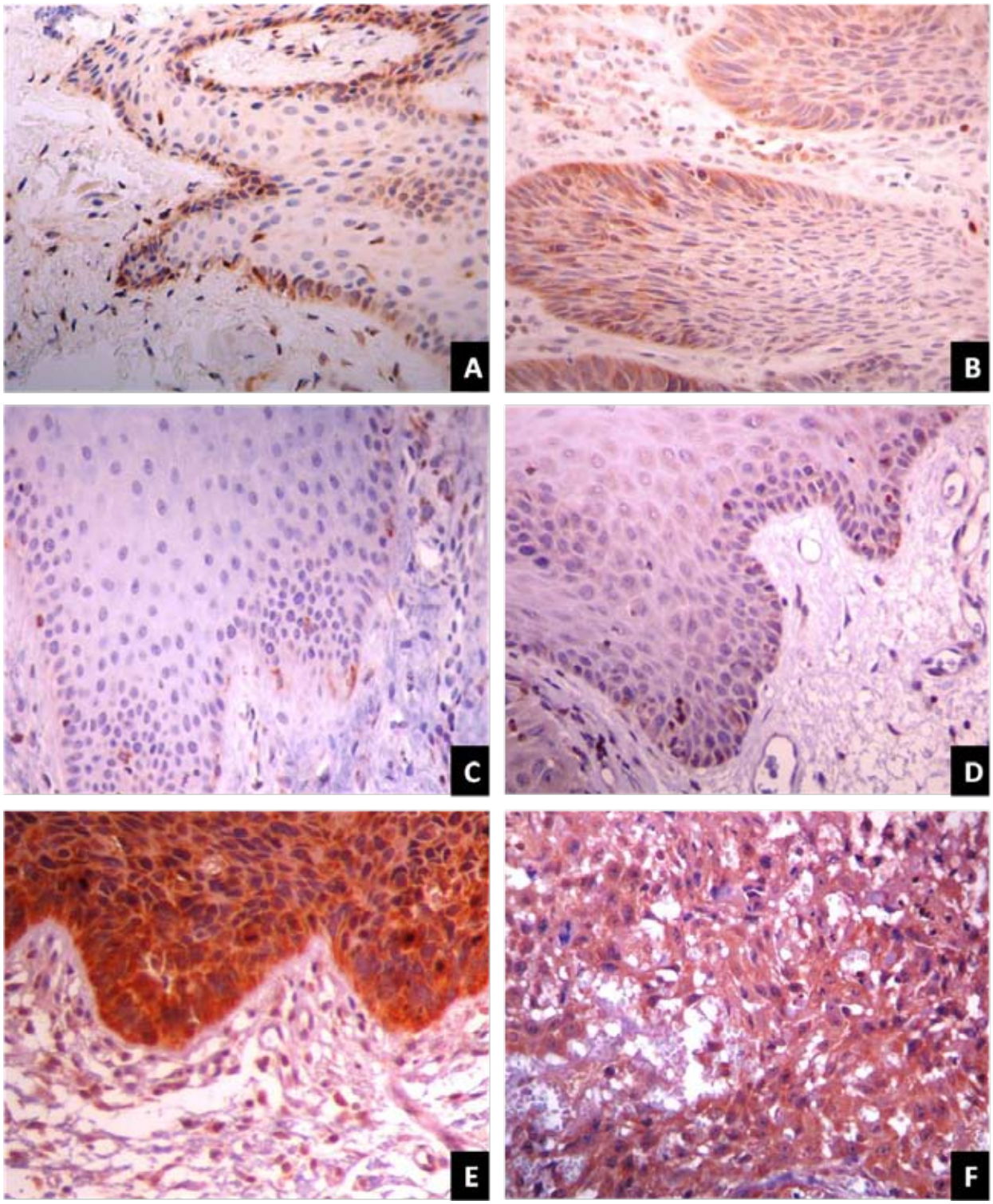


Figura 2– As fotomicroscopias ilustram a expressão de células Bcl-2 positivas em: (A) Mucosa oral normal, (B) Carcinoma verrucoso, (C) Leucoplasia sem displasia, (D) Leucoplasia com displasia, (E) e (F) Carcinoma espinocelular--(E) Células epiteliais com núcleo e citoplasma positivo; (F) Algumas células com citoplasma positivo e núcleo negativo (eusinófilico) — Setas amarela. Em (E) e (B) tem-se células inflamatórias positivas Setas amarela) para Bcl-2 no parênquima tumoral. Imunoistoquímica, aumento original de 40x.

DISCUSSÃO

No presente estudo, verificou-se que no grupo CEC 12 (80%) pacientes eram do gênero masculino e 3 (20%) eram do gênero feminino, o que está de acordo com o trabalho de Montoro et al (2008), no qual dos 45 pacientes com CEC 40 (88,8%) eram do gênero masculino. No grupo CV 4 (66,7%) pacientes eram do gênero feminino e apenas 2 (33,3%) eram do gênero masculino, sendo que estes resultados diferem dos resultados encontrados por Saito et al (1999) no qual 50% dos pacientes eram do gênero masculino e dos resultados de Oliveira et al (2006) . No trabalho de Adegboyega et al (2005) os resultados também foram diferentes, sendo que 89,5% dos pacientes eram do gênero masculino.

A idade dos pacientes variou entre 39 e 90 anos (média: 64 anos), faixa etária média também encontrada por outros pesquisadores (SAITO et al, 1999; CHAGÍN et al, 2000; NEVILLE & DAY, 2002; ADEGBOYEGA et al, 2005; OLIVEIRA et al, 2006).

No grupo CEC 13 (86,7%) pacientes eram tabagistas e 7 (46,7%) eram etilistas, resultados semelhantes aos encontrados por Llewellyn et al (2004). Já no grupo CV 3 (50%) pacientes eram tabagistas e 3 (50%) pacientes eram etilistas, o que se assemelha ao encontrado por Pereira et al (2007). Segundo Oliveira et al (2006) através de um estudo retrospectivo realizado na cidade de São Paulo, hábitos como o tabagismo e etilismo foram encontrados em 35 e 45% dos pacientes com CV, respectivamente (OLIVEIRA et al, 2006).

Os locais mais freqüentes de acometimento do CEC foram: soalho de boca e língua, o que corrobora com os resultados encontrados por Oliveira et al (2007).

Apesar da expressão das proteínas p53 e Bcl-2 nos grupos LSD e LCD não ter correlação com o prognóstico, pode-se observar que a expressão das duas proteínas na leucoplasia com e sem displasia foi maior em relação ao carcinoma verrucoso, podendo confirmar o comportamento biológico pouco agressivo deste tumor. Resultado similar também foi encontrado por Saito et al (1999), no qual a expressão de p53 foi consideravelmente menor no carcinoma verrucoso quando comparado à displasia severa.

De acordo com a análise dos dados não houve correlação da expressão das proteínas p53 e Bcl-2 com o prognóstico das lesões. Resultados semelhantes foram encontrados por Correa et al (2006) e Venturi et al (2004). Han et al (2002) encontrou resultados diferentes já que em seu trabalho a proteína p53 obteve valor prognóstico significativo diferentemente da proteína Bcl-2.

A expressão de Bcl-2 foi alta (>50%) em todos os casos de CEC, não sendo possível correlacionar sua expressão com o prognóstico desta lesão já que alguns pacientes tiveram sobrevida superior a 5 anos. Isso pode ser comprovado pelo trabalho de Montoro et al (2008), no qual foi observado a dificuldade de previsão do comportamento biológico e prognóstico do CEC de cavidade oral. Existe um grande número de tumores que em estádio inicial mostram um comportamento biológico agressivo com metástase regional precoce e morte, enquanto tumores em estádio avançado podem metastatizar-se e esses pacientes, depois do tratamento, obtêm longos períodos livres de doença (MONTORO, 2008).

CONCLUSÕES

Neste estudo não foi possível estabelecer uma correlação das proteínas p53 e Bcl-2 com o prognóstico das lesões de Carcinoma, provavelmente em decorrência do número relativamente reduzido da amostra para ambas as categorias de carcinomas. Com referência as lesões cancerizáveis foi observado que estas proteínas estão expressas e que de certa maneira podem contribuir para o processo de carcinogênese, embora, não tenha sido observada uma forte expressão quando comparado à mucosa normal.

Diante dos nossos resultados pode ser concluído que mais estudos devem ser conduzidos nesta linha de investigação com o intuito de elucidar a possível relação de marcadores biológicos como as proteínas p53 e Bcl-2 com o prognóstico de lesões cancerizáveis e carcinomas bucais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, N.F.; EL-SHARKAWI, S.L.; ABBAS, E.A.; EL-SHAER, M.A.M. Immunohistochemical study of p53 and angiogennesis in benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell cacinoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 103, p. 385-390, 2007.

ADEGBOYEGA, P.A.; BOROMOUND, N.; FREEMAN, D.H. Diagnostic utility of cell cycle and apoptosis regulatory proteins in verrucous squamous carcinoma. **Applied Immunohistochemistry Molecular Morphology**, v. 13, p. 171-177, 2005.

BOUQUOT, J.E. Oral verrucous carcinoma. Incidence in two US populations. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 86, p. 318-24, 1998.

CARROZZO, M.; CARBONE, M.; GADOLFO, S.; VALENTE, G.; COLOMBATTO, P.; GHISETTI, V. An atypical verrucous carcinoma of the tongue arising in a patient with oral lichen planus associated with hepatitis C virus infection. **Oral Oncology**, v. 33, Nº 03, p. 220-225, 1997.

CHAGÍN, L.A. Ethiopatogenics risk factors of verrucous carcinoma in the oral cavity. **Acta Odontológica Venezolana**, v. 38, Nº 2, p. 9-14, 2000.

CORREA, L.A.; RAPOPORT, A.; CARVALHO, M.B.; ALVES, V.A.F.; PEREZ, R.S. Relação do padrão de distribuição do p53 com variáveis clínicas no prognóstico do carcinoma espinocelular da hipofaringe. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, v. 35, nº 1, p. 37-41,2006.

GABRIEL, J.G.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L.S.; FIGUEIREDO, M.A.S. Considerações gerais e abordagem clínica da leucoplasia. **Revista Brasileira de Patologia Oral**, v. 3, n. 4, p. 187-194, 2004.

HAFIAN, H.; VENTEO, L.; SUKHANOVA, A.; NABIEV, L.; LEFEVRE, B.; PLUOT, M. Immunohistochemical Study of DNA Topoisomerase I, DNA Topoisomerase II, p53, and Ki-67 in Oral Preneoplastic Lesions and Oral Squamous Cell Carcinomas. **Human Pathology**. V. 35, n. 6, June, 2004.

HAN, H.; LANDRENEAU, R.J.; SANTUCCI, T.S.; TUNG, M.Y.; MACHEREY, R.S.; SHACKNEY, S.E.; STURGIS, C.D.; RAAB, S.S.; SILVERMAN, J.F. Prognostic Value of Immunohistochemical Expressions of p53, HER-2/neu, and bcl-2 in Stage I Non–Small-Cell Lung Cancer. **Human pathology**, v. 33, n. 1, 2002.

JYOTHIRMAYI, R.; SANKARANARAYANAN, R.; VARGHESE, C.; JACOB, R.; NAIR, M.K. Radiotherapy in the treatment of verrucous carcinoma of the oral cavity. **Oral Oncology**, v. 33, n. 2, p. 124-128, 1997.

KUO M.Y.P.; HSU, H.C.; CHIANG, C.P.; KOK, S.H.; KUO, Y.S.; HONG, C.Y. Infrequent p53 mutations in patients with areca quid chewing-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. **Journal of Oral Pathology and Medicine**. v. 28, p. 221–5, 1999.

KUROKAWA, H.; MATSUMOTO, S.; MURATA, T.; YAMASHITA, Y.; TOMOYOSE, T.; ZHANG, M.; FUKUYAMA, H.; TAKAHASHI, T. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dyspasia. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v.32, p.513-521, 2003.

LLEWELLYN, C.D.; JOHNSON, N.W.; WARNAKULASURIYA, K. A. A. S. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case–control study in Southern England. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v.33, p.525–532, 2004.

MARAKI, D.; BOECKING, A.; POMJANSKI, N.; MEGAHED, M.; BECKER, J. Verrucous carcinoma of the buccal mucosa: histopathological, cytological and DNA-cytometric features. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 35, p. 633-5, 2006.

MIGNOGNA, M.D.; FEDELE, S.; LO RUSSO, L. The world cancer report and the burden of oral cancer. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 2, p. 139-142, 2004.

Ministério da Saúde; Secretária de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Registro Hospitalar de Câncer: dados dos hospitais do INCA, relatório anual 2009**. Distribuição dos casos de câncer por localização topográfica, segundo o sexo. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

MONTORO, J.R.M.C.; HICZ, H.A.; SOUZA, L.; LIVINGSTONE, D.; MELO, D.H.; TIVERON, R.C.; MAMEDE, R.C.M. Fatores prognósticos no carcinoma espinocelular de cavidade oral. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. V. 74, n. 6, p. 861-866, 2008.

NEVILLE, B.W.; DAY, T.A. Oral Cancer and Precancerous Lesions. **CA Cancer J Clin**, v. 52, n. 4, p. 195-215, 2002.

OLIVEIRA, D.T; DE MORAES, R.V.; FIAMENGUI FILHO, J.F.; FANTON NETO, J.; LANDMAN, G.; KOWALSKI, L.P. Oral verrucous carcinoma: a retrospective study in São Paulo Region, Brazil. **Clinical Oral Investigations**, v. 10, p. 205-209, 2006.

PEREIRA, M.C.; OLIVEIRA, D.T.; LANDMAN, G.; KOWALSKI, L.P. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. **Journal of Canadian Dental Association**, v. 73, n. 4, p. 339-344, 2007.

PIATTELLI, A.; RUBINI, C. et al. Prevalence of p53, bcl-2, and Ki-67 Immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. **J Oral Maxillofacial Surgery**, v.60, p.532-540, 2002.

ROBBINS, S.L.; KUMAR, V.; COTRAN, R.S. **Patologia Estrutural e Funcional** ed. 5, Rio de Janeiro, editora Guanabara Koogan. cap. 7, p. 237, 1996.

SAITO, T.; NAKIJAMA, T.; MOGI, K. Immunohistochemical analusis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and ki-67 in oral câncer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 28, p. 226-232, 1999.

SCHILDT, E.B.; NYLANDER, K.; ERIKSSON, M.; HARDELL, L.; MAGNUSSON, A.; ROOS, G. Expression of p53, PCNA, Ki-67, and Bcl-2 in relation to risk factors in oral cancer – a molecular epidemiological study. **International Journal of Oncology**, v. 22, p. 861-868, 2003.

SPIRO, R. H. Verrucous carcinoma, then and now. **American Journal of Surgery**, p. 393-397, 1998.

STEWART, B.W.; KLEIHUES, P. **World cancer report**. Lyon: IARC Press; 2003.

VENTURI, B.R.M.; CABRAL, M.G.; LOURENÇO, S.Q.C. Carcinoma de células escamosas oral-contribuição de vírus oncogênicos e alguns marcadores celulares no desenvolvimento e prognóstico da lesão: uma revisão. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.70, n.3, p.385-392, 2004.

Léxico da língua Avá-Canoeiro (Tupi-Guarani): Flores e Frutos

Themis Nunes da Rocha Bruno, Mônica Veloso Borges

Faculdade de Letras/UFG

e-mails: themisnrb@yahoo.com.br; mvborges8@yahoo.com.br

Palavras chaves: Língua Avá-Canoeiro, Lexicografia, Flores e Frutos

Introdução

A língua Avá-Canoeiro, pertencente ao Tronco Tupi e à Família Tupi-Guarani, possui atualmente 22 indígenas distribuídos em dois grupos, um de 6 pessoas, que vivem na Área Indígena Avá-Canoeiro, próxima aos municípios de Minaçu e Colinas, no Estado de Goiás; e outro com 16, que vivem na Aldeia Canoanã, dos índios Javaé (Macro-Jê), próxima à cidade de Formoso do Araguaia, na Ilha do Bananal, no Estado do Tocantins. Porém, para esta pesquisa foi investigado somente o léxico da variedade de língua falada pelo grupo Avá-Canoeiro do Tocantins.

No Brasil, infelizmente, o desenvolvimento de pesquisas científicas sobre línguas indígenas tem ocorrido de forma lenta, e, como são deveres do lingüista documentar, analisar, comparar e, dentro do possível, ajudar a mapear a filogenética das línguas ainda vivas, é de grande relevância a documentação da língua Avá-Canoeiro, principalmente se pensarmos que esta é uma língua que se encontra em risco de extinção e possui pouquíssimos falantes, dos quais a maioria é crianças e já não a adquire como língua materna.

A documentação da língua Avá-Canoeiro é de fundamental importância, pois a confecção de um dicionário enciclopédico bilíngüe, resultado pretendido por um projeto maior denominado *"Estudos Sobre o Léxico da Língua Avá-Canoeiro (Tupi-Guarani): Uma Proposta de Dicionário",* e do qual este trabalho faz parte, contribuirá com a conservação/manutenção da língua deste povo. Poderá ainda num futuro próximo ser utilizado na aquisição/aprendizagem da língua pelos mais jovens dessa etnia.

Além disso, a documentação desta língua contribuirá com estudos posteriores, seja para um melhor entendimento de seu léxico, ou para a valorização da língua entre seus falantes, que, devido a tanta discriminação, quase deixaram totalmente de lado sua língua, dando espaço apenas a uma outra, o português, mais valorizada.

Os pontos abordados nesta pesquisa foram o léxico referente a flores e frutos e seus aspectos, contribuindo, assim, com a documentação da língua Avá-Canoeiro, especificamente na confecção do Dicionário Enciclopédico Bilíngüe Avá-Canoeiro/Português. Dessa forma, o intuito deste trabalho foi o de registrar o etnoconhecimento desse povo, no que concerne a esses aspectos.

Com este estudo espera-se ainda motivar os Avá-Canoeiro para o uso e a manutenção da língua Avá-Canoeiro na aldeia Canoanã; contribuir na melhoria da auto-estima dos Avá-Canoeiro, que se sentirão prestigiados ao verem o interesse por parte de não-indígenas em registrar sua língua e sua cultura; e o mais importante é subsidiar possíveis projetos de revitalização lingüístico-culturais que venham a ser realizados para o povo Avá-Canoeiro.

Objetivos

O objetivo principal deste projeto é contribuir para a documentação da língua Avá-Canoeiro, especificamente na confecção do Dicionário Enciclopédico Bilíngüe Avá-Canoeiro/Português, no que se refere a aves e árvores típicas da região dos Avá-Canoeiro no Estado do Tocantins, na região da aldeia Canoanã, próxima à cidade de Formoso do Araguaia. Assim, o intuito é registrar com o máximo de precisão e detalhamento possível o etnoconhecimento desse povo, no que concerne a esses aspectos.

Num sentido mais abrangente, tem-se como meta:

1. Colaborar com futuros estudos comparativos sobre a língua Avá-Canoeiro e demais línguas Tupi-Guarani do Subgrupo IV (como o Tapirapé, o Parakanã e o Asurini do Tocantins), no que se refere ao léxico para flores e frutos;
2. Motivar os Avá-Canoeiro para o uso e a manutenção da língua Avá-Canoeiro na aldeia Canoanã;

3. Contribuir na melhoria da auto-estima dos Avá-Canoeiro, que se sentem prestigiados ao verem o interesse por parte de não-indígenas em registrar sua língua;
4. Subsidiar possíveis projetos de revitalização lingüístico-culturais que venham a ser realizados para o povo Avá-Canoeiro.

Metodologia

O primeiro passo da pesquisa foi o aprofundamento na leitura acerca da língua Avá-Canoeiro, e sobre as teorias da Lexicografia e da Lexicologia. Além disso, foi necessária a investigação sobre flores e frutos da região onde vivem os Avá-Canoeiro. Para tanto, tive como bibliografia básica Biderman (1984, 2001), Borges (2006), Proença, Oliveira & Silva (2006) e Welker (2004), dentre outros.

Após essas leituras, iniciaram-se os trabalhos de campo. Em janeiro de 2009 foi realizada uma viagem à Aldeia Canoanã, com duração de 10 dias. Neste período, realizei coleta de dados por meio da utilização de CDs, fotos, postais e livros que continham gravuras e/ou desenhos para serem mostrados aos Avá-Canoeiro e facilitar a visualização e a identificação das flores e frutos pesquisados. Foram empregados na coleta de dados especialmente os trabalhos de Faria *et alii* (2002), Proença, Oliveira & Silva (2006) e Silva Jr. (2005).

Nesta viagem, também foram privilegiadas atividades que permitiram que os dados fossem coletados no momento em que eram enunciados, por exemplo, durante uma pescaria, uma caminhada pelo mato, uma coleta etc, contemplando assim uma melhor observação da realidade sociocultural desse povo. Além disso, houve coleta de palavras que diziam respeito ao léxico a ser obtido, por meio de gravação, garantindo, assim, que as transcrições fonética e fonológica tivessem mais exatidão. Assim, foi possível uma documentação o máximo possível detalhada das palavras, que posteriormente foram selecionadas e que farão parte do dicionário enciclopédico bilíngüe da língua.

Entretanto, mesmo com toda ênfase dada à participação dos Avá-Canoeiro, especialmente os mais velhos, a coleta de dados não foi uma tarefa fácil, pois houve certa dificuldade por parte deles em se lembrarem de alguns nomes. Além disso, houve certo comprometimento da pesquisa, pois os Avá-Canoeiro não sabiam os

nomes de diversas flores e frutos que lhes foram apresentados, através de desenhos/figuras, pois, além do fato de que muito da fauna e da flora nativa se perdeu, os Avá-Canoeiro sofrem com o esquecimento de sua língua.

Discussão

O estudo do léxico é um ramo da Lingüística denominado Lexicologia. Esse estudo serve de base à Lexicografia, que é o registro do léxico, ou seja, a produção em si do dicionário. O léxico, objeto de estudos destas ciências, Lexicologia e Lexicografia, pode ser definido, dentre outras maneiras, como o conjunto de palavras e expressões pertinentes a uma língua.

Porém, para estudos como este, com línguas de tradição oral, a melhor definição de léxico é a de "léxico mental", um tipo bastante particular, que de acordo com Schindler (*apud* Welker 2004), seria o conjunto de itens lexicais que se encontram estocados na mente dos falantes.

Para a realização de estudos como este, é importante que o lexicógrafo tenha uma boa noção sobre o modo como se organiza o léxico de uma língua, semântica ou pragmaticamente. Não basta somente o conhecimento de todas as palavras de uma língua, é necessário também conhecer como eles se portam no discurso e os seus significados no meio.

Portanto, um bom lexicógrafo deve conhecer a melhor forma de trabalhar as macro e microestruturas do dicionário, tendo em mente as problemáticas de se trabalhar em sua elaboração, pois o léxico, e a própria língua, estão intimamente ligados à cultura correspondente e às interações socioculturais. Além disso, o léxico é a parte da língua que vive em constante mudança – tanto semântica, quanto ortográfica. A língua é muito dinâmica, e, quanto mais social e tecnologicamente desenvolvida a sociedade, mais dinâmico é esse processo de mudança lingüística.

A construção de um dicionário apresenta duas características diferentes complementares. A primeira que diz respeito a quais verbetes serão incluídos na obra e de que modo isso será feito, e a segunda trata da organização de cada um dos verbetes e que formas fixas e variáveis eles devem apresentar. A primeira é designada **macroestrutura** e a segunda **microestrutura**.

Restringiremos-nos por ora à Macroestrutura. Existem várias maneiras de se organizar as entradas de um dicionário: por grafia, por pronúncia, ao relacionar as palavras por sua morfologia e etimologia, ou alfabeticamente. Ademais, o lexicógrafo precisa decidir o número dos verbetes ou entradas, que provavelmente estará de acordo com o tipo de dicionário pretendido. Segundo Biderman (2001), um bom dicionário de língua não necessita mais que 50.000 verbetes, pois esse número é suficiente para as necessidades do grande público.

É claro que um dicionário, por mais entradas que possua, nunca irá abarcar todo o léxico de uma língua, visto que esta sofre mudanças e influências, tais como os neologismos e os empréstimos, todo o tempo, principalmente agora em que vivemos em um mundo tão dinâmico. Assim, é preciso que se tenha um bom *corpus,* que, de acordo com Biderman (2001), seja de no mínimo de 10 milhões de ocorrências de todas as modalidades de discursos e uso.

A partir daí, se seleciona para o dicionário, primeiro aquilo que é mais recorrente na língua, depois o que é menos recorrente, mas importante e por fim termos técnicos e científicos que estejam vulgarizados. Mas infelizmente, o lexicógrafo irá se deparar com problemas de difícil resolução como o regionalismo e o arcaísmo.

Porém, para a composição da macroestrutura de um dicionário enciclopédico bilíngüe de uma língua oral e com pouquíssimos falantes, provavelmente teremos um *corpus* reduzido que não chegaria ao mínimo de ocorrências propostas por Biderman. Para tanto, nesse caso, toda e qualquer entrada que se conseguir deverá constar do dicionário, independente se é ou não recorrente nos enunciados. Pois dependemos da memória de nossos informantes.

A microestrutura da entrada ou verbete, segundo Rey-Debove (*apud* Welker 2004, p.), é constituída por um conjunto de "informações" ordenadas que se seguem à entrada. Existem várias possibilidades de organização da microestrutura, que variam de acordo com o que se pretenda colocar de informações aplicáveis a qualquer entrada. Outros elementos podem ser acrescentados à entrada, e à definição, ampliando a estrutura mínima como a *pronúncia* - transcrita em código próprio; *categoria gramatical* - traços sintáticos fundamentais; *etimologia* - origem da

palavra ou termo; *exemplos* - ocorrência/contextualização; idiotismos[1] e expressões estereotipadas são informações específicas.

Para este trabalho adotou-se a proposta do seguinte modelo de microestrutura de Vilela (1983): entrada + informação (etimológica/ortográfica/fonética/gramatical) + definição (ou explicação) + exemplos (ou aplicação em contextos), como poderá ser observado nos dados a seguir.

Resultados

Alguns dos dados obtidos na viagem a campo seguem distribuídos a seguir:

Abreviaturas

s.	substantivo
v. intrans. at.	verbo intransitivo ativo[2]
v. trans.	verbo transitivo
3sg	3ª pessoa do singular
CN	caso nuclear
adv	advérbio

a	s.	fruta,
ɪ-aɨ̃j	s.	1) semente. 2) caroço
akã	s.	galho
atɨm	v. trans	plantar
awati	s.	milho
ɨa	s.	cabaça

[1] Locuções ou modos de dizer privativos de um idioma e ordinariamente de caráter familiar ou vulgar e que se não traduzem literalmente em outras línguas. In: "Dicionário Universal da Língua Portuguesa". Versão 4.0 CDRom. Texto Editora, 1999.

[2] Os verbos intransitivos ativos na língua Avá-Canoeiro, segundo Borges (2006, p. 147), são aqueles que "indicam a categoria de pessoa por meio de prefixos da Série I e expressam predominantemente atividades e atos de volição e controle do participante da ação.".

ipotɨʁa; mae-potɨʁa	s.	flor
jitɨka	s.	batata-doce
juati	s.	espinho
kaju	s.	caju
kaju-apin	s.	castanha-de-caju
ka-kɨʁ	s.	1) folha; 2) mato.
kuʁuʁa	s.	abóbora
mae-apaɾ	s.	banana
maniok	s.	mandioca
-pe, -piɾik	s.	casca
peki	s.	pequi
uʁuku	s.	urucum
wana; mukaja	s.	coco
watʃuaja	s.	cagaita

Abaixo seguem exemplos de como serão as entradas no Dicionário Enciclopédico Bilíngüe Avá-Canoeiro/Português. Os desenhos foram produzidos pelos indígenas mais jovens envolvidos na pesquisa. São deles também as explicações dadas às palavras. As fotos, por sua vez, foram retiradas durante a última pesquisa de campo.

Peki /peki/ [pe ˈ ki] s. pequi, planta e fruto típico do bioma cerrado, importante na alimentação dos Avá-Canoeiro.

Ex:	o-eʁuɾ	peki-ø	ipɨɨj	'Ele trouxe muito pequi'
	[oˈeʁuɾ	peˈki	ˌɪpɨˈɨj]	
	3sg-trazer	pequi-CN	adv	



Kaju /kaju/ [ka ˈʒu] s. caju, fruto nativo do Brasil, e de grande importância na alimentação dos povos indígenas.

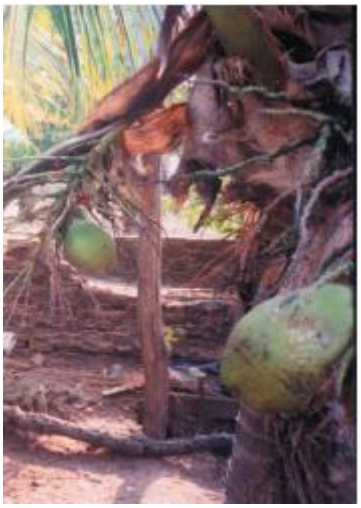
Ex:	kuɾum-ø	kaju-ø	o-u	'O menino comeu caju'
	[kuˈɾũm	kaˈʒu	ˈow]	
	menino-CN	caju-CN	3sg-comer	



wana /wana/ [ˈwɐ̃nə] s. coco, fruto do coqueiro, os cocos de espécies menores são usados na confecção de artesanatos, como anéis, colares etc.

Ex:	kuɾum-ø	wana-ø	o-u	'O menino comeu coco'
	[kuˈɾũm	ˈwɐ̃nə	ˈow]	

menino-CN coco-CN 3sg-comer



ɨa /ɨa/ [ˈɨə] s. cabaça, fruto seco, que quando maduro é utilizado na fabricação de artesanato e utensílios como: copo, cuia, vasilha; instrumento musical: maracá etc.

Ex:	papaj-ø	o-atɨm	ɨa-ø	'Papai plantou cabaça'
	[paˈpaj	oˈatɨm	ˈɨə]	
	papai-CN	3sg-plantar	cabaça-CN	



mae-apaɾ /mae-apaɾ/ [maˌeaˈpaɾə] s. banana, fruto bastante comum na alimentação dos povos indígenas, principalmente na preparação da banana assada na casca.

Ex:	a-putat	mae-apaɾ-ø	'Eu gosto de banana'
	[aˈpʰutatˀ	maˌeaˈpaɾə]	
	1 sg- querer, gostar	coisa-recurvada-CN	



Awati /awatʃi/ [aˈwatʃɪ] s. milho, cereal importante na alimentação, na produção de farinha e do mingau.

Ex:	Iawi-ø	awati	ko-ø	o-atɨm	'Iawi plantou roça de milho'
	[ɪaˈwi	aˈwatʃɪko		oˈatɨm]	

nome próprio-CN milho roça-CN 3sgA-plantar, enterrar



uʁuku /uʁuku/ [ʊˈʁukʊ**]** s. urucum, fruto de cor avermelhada utilizado nas pinturas corporais para rituais e festas. É usado também para fazer remédios.

Ex:	a-eʁuɾ	uʁuku -a	oka-**pe**	‘Eu trouxe urucum para casa’
	[oˈeʁuɾ	ʊˈʁukʊ	oˈkape]	
	1sg-trazer	urucum-CN	casa-**loc**	



Nos exemplos acima as entradas constituem-se da seguinte maneira: entrada + informação (fonológica, fonética, gramatical) + definição + exemplos. A entrada é dada em Avá-Canoeiro, seguida pelas transcrições fonológica e fonética, que ajudarão na pronúncia correta das palavras, além de indicar quais são os fonemas que as compõem. Logo após, há a informação gramatical, que auxilia na identificação da classe à qual pertence à palavra. A definição, dada em língua portuguesa, apresenta o significado e as características da entrada e, por último, o exemplo, que é de fundamental importância para que se compreenda a ordem sintática da língua e o uso real da palavra, ou seja, a palavra aparece em seu contexto de uso.

Considerações Finais

Esta pesquisa, sendo um recorte do projeto "ESTUDOS SOBRE O LÉXICO DA LÍNGUA AVÁ-CANOEIRO (TUPI-GUARANI): UMA PROPOSTA DE DICIONÁRIO", tinha como objetivo maior coletar o léxico referente a flores e frutos e o etnoconhecimento acerca desses aspectos, para compor o Dicionário Enciclopédico Bilíngüe dessa língua. Assim, espero ter colaborado com o projeto através de parte da documentação da língua.

Além disso, almejo ainda, que estudos comparativos do Avá-Canoeiro com outras línguas Tupi-Guarani, principalmente do Subgrupo IV, sejam realizados num futuro próximo. E que este trabalho, parte do projeto citado acima, sirva de incentivo ao povo Avá-Canoeiro, principalmente para os mais jovens; que seja um instrumento para a manutenção e uso dessa língua na aldeia Canoanã, que propicie subsídios para futuros projetos de revitalização lingüístico-cultural, além de contribuir com a melhoria da auto-estima deste povo.

Referências Bibliográficas

BARBOSA, M. A. "Contribuição ao Estudo de Aspectos da Tipologia de Obras Lexicográficas". *Publicação da Comissão Especial de Terminologia*. São Paulo: ABNT/IBICT, 1993.

BIDERMAN, M. T. C. “A Ciência da Lexicografia”. *ALFA* 28. São Paulo: UNESP, 1984. 01-26pp.

_____. “As Ciências do Léxico”. OLIVEIRA, A. M. P. P. & ISQUERDO, A. N. (orgs.). *As Ciências do Léxico: Lexicologia, Lexicografia, Terminologia.* 2ª ed. Campo Grande: Editora da UFMS, 2001. 13-22pp.

BORBA, F. S. *Organização de Dicionários. Uma introdução à Lexicografia*. São Paulo: Editora da UNESP, 2003.

BORGES, M. V. *Aspectos fonológicos e morfossintáticos da língua Avá-Canoeiro (Tupi-Guarani).* Tese de Doutorado em Lingüística. Campinas: Unicamp, 2006 (inédita).

FARIA, R. *et alii. Caminhando pelo cerrado: plantas herbáceo-arbustivas: caracteres vegetativos e organolépticos.* Brasília: Editora da UnB, 2002.

PROENÇA, C. C.; OLIVEIRA, R. S. & SILVA, A. P. *Flores e frutos do cerrado.* 2ª ed. Brasília: Editora Rede de Sementes do Cerrado, 2006.

SILVA JR., M. C. *100 árvores do cerrado.* Brasília: Editora Rede de Sementes do Cerrado, 2005.

VILELA, M. *Definição nos dicionários de português.* Porto: Asa, 1983.

WELKER, H. A. *Dicionários. Uma pequena introdução à Lexicografia*. Brasília: Thesaurus, 2004.

Áreas Protegidas no Estado de Goiás: Pouco Eficientes e Pouco Protegidas

Fanuel Nogueira Garcia[1]
Laerte Guimarães Ferreira[1]

[1]Universidade Federal de Goiás
Instituto de Estudos Sócio-Ambientais – IESA
Laboratório de Processamento de Imagens e Geoprocessamento – LAPIG
Caixa Postal 131 – 74001 – 940 – Campus Samambaia – Goiânia – GO, Brasil.
fanuel@geografia.grad.ufg.br
laerte@iesa.ufg.br

Palavras-chave: unidades de conservação, áreas prioritárias, corredores ecológicos

INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro, presente em 25% do território nacional e correspondendo a uma área de 204,7 milhões de hectares (IBGE, 2004), é considerada a savana tropical mais rica em termos de biodiversidade no mundo (RATTER et al., 1996). Em se tratando de recursos hídricos superficiais e subterrâneos, o Cerrado abriga grande parte das principais bacias hidrográficas do Brasil, ou seja, bacia do São Francisco, Araguaia/Tocantins, e Paraná (LIMA e SILVA, 2007; LIMA et al.,2007). A partir da década de 1970 o Bioma Cerrado foi submetido a uma acelerada e intensa ocupação econômica, movida principalmente pelo agronegócio, o que resultou na perda de grande parte da sua biodiversidade, ameaçando a sustentabilidade e impondo limites as oportunidades do futuro econômico e social deste bioma (DIAS, 2002; MYERS et al, 2000). Dados recentes, obtidos no âmbito do Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira (PROBIO), indicam que aproximadamente 47% das áreas nativas do Cerrado já foram convertidas para atividades de uso antrópico (cultura agrícola, pastagem cultivada, reflorestamento, área urbana e mineração) (SANO et al., 2009).

O Estado de Goiás, situado no “núcleo” do bioma Cerrado, com 97% do seu território inserido em seus domínios, encontra-se em situação ainda mais crítica, haja vista que a cobertura vegetal remanescente corresponde à apenas 35% da sua

área total (SANO et al., 2008). Igualmente grave é a distribuição altamente fragmentada destes remanescentes, o que interfere na viabilidade das espécies e no próprio potencial para conservação (Carvalho et al., 2009).

Aliado ao problema da fragmentação, as ameaças aos ambientes ripários é outra questão que merece atenção. Segundo Bonnet et al.,(2007), 61,97% destes ambientes, situados até 100m da linha de drenagem, não possuem cobertura vegetal nativa. A manutenção da vegetação natural nestes ambientes, que intercepta e controla a infiltração da precipitação, é fundamental para a disponibilidade dos recursos hídricos, controle das vazões máximas e redução do potencial erosivo pluvial (GERGEL et al., 2002; BONNET et al.,2007).

Mesmo com a reduzida e fragmentada vegetação remanescente, e os ambientes ripários fortemente ameaçados, a conversão do Cerrado goiano ainda vêem ocorrendo de maneira intensiva. Para o período entre 2002 e 2008, dados do Sistema Integrado de Alerta de Desmatamentos (SIAD Cerrado) (Ferreira et al., 2007; Rocha et al., 2009) indicam aproximadamente 2549,2 km² de novos desmatamentos.

Por outro lado, o Estado de Goiás e o Distrito Federal possuem apenas 4,89% de seus territórios protegidos na forma de unidades de conservação federais, estaduais, municipais e particulares (NOVAES et al., 2003), ainda que outras medidas estejam sendo adotadas com o intuito de promover a conservação da biodiversidade no Estado, como a implantação dos corredores ecológicos Paranã-Pirineus, Araguaia-Bananal e Cerrado Pantanal, bem como a atualização dos limites das áreas prioritárias (MMA, 2006).

Dentro deste contexto de intensa conversão do cerrado goiano e pouca proteção das áreas de vegetação remanescente, neste trabalho avaliamos o grau de eficácia e ameaças do SNUCs e SEUCs, dos corredores ecológicos e das áreas prioritárias em Goiás.

ÁREA DE ESTUDO & MÉTODOS DE ANÁLISE

A área de estudo compreende a totalidade do Estado de Goiás e Distrito Federal, abrangendo as unidades de conservação (uso sustentável e proteção integral), as áreas prioritárias (MMA, 2006), e os corredores ecológicos (figura 1).

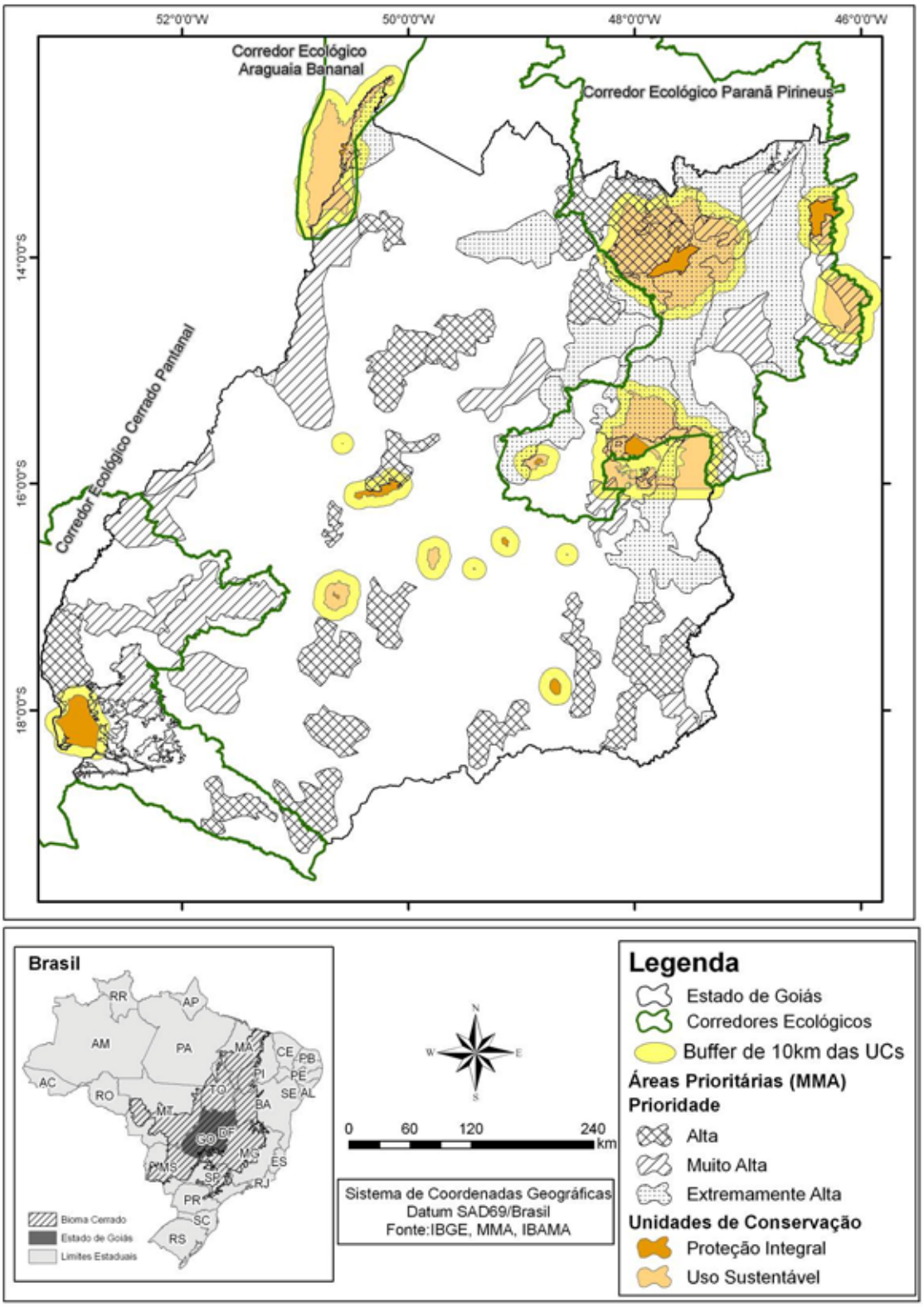


Figura 1: Mapa de localização da área de estudo, com destaque para as UCs (e respectivas zonas de amortecimento, i.e. *buffers* de 10 km), áreas prioritárias (MMA) e corredores ecológicos.

Para análise das ameaças em curso, foram considerados tanto os alertas de desmatamentos gerados pelo Sistema Integrado de Alertas de Desmatamentos (SIAD Cerrado) para o período de 2002-2008 (situados dentro das áreas prioritárias,

corredores ecológicos e *buffers*, i.e. as zonas de amortecimento de 10 km em torno das UCs), quanto o passivo ambiental (i.e. proporção de áreas remanescentes) no entorno das UCs (*buffers*), bem como no interior das áreas prioritárias (MMA) e corredores de biodiversidade.

Os dados sobre a vegetação remanescente foram extraídos do mapa de cobertura e uso da terra, elaborado no âmbito do projeto "Identificação de Áreas Prioritárias para Conservação da Biodiversidade em Goiás (PDIAP)" (SCARAMUZZA et al., 2008). As áreas prioritárias foram obtidas junto ao portal do Ministério do Meio Ambiente (http://www.mma.gov.br). Quanto aos limites das unidades de conservação para o Estado de Goiás, estes foram obtidos no portal do Sistema Estadual de Estatísticas e Informações Geográficas (www.sieg.go.gov.br).

Ao todo, foram consideradas 23 unidades de conservação, das quais, oito estão inseridas em Áreas de Proteção Ambiental (APAs). Assim, a análise de *buffers* foi restrita à 15 UCs.

Uma das dificuldades encontradas neste trabalho refere-se à escala espacial (1:250.000) do mapa de cobertura e uso da terra para Goiás (PDIAP), haja vista que quando se utiliza áreas relativamente pequenas, como é o caso do parque estadual Telma Ortega, próximo à Goiânia, com uma área de apenas 165 ha, não há detalhe suficiente para análise. No âmbito do PDIAP, toda a área deste parque consta como sendo pastagem, o que não condiz com a realidade.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A vegetação remanescente presente no Estado de Goiás, equivalente a 35% de seu território, está representada em cinco tipologias principais, com destaques para a Savana Arborizada e a Savana Parque, equivalentes a 57% e 28%, respectivamente (tabela 1 e figura 2).

Tabela 1: Principais tipologias de vegetação remanescentes do Estado de Goiás

Tipologias da Vegetação Remanescente	Área (km²)	Representatividade (%)
Floresta Estacional (Decidual e semidecidual)	6819,35	5,56%
Savana arborizada	70428,61	57,39%
Savana Florestada	7588,91	6,18%
Formação Pioneira	54,52	0,04%
Savana Gramíneo Lenhosa	2363,64	1,93%
Savana Parque	35460,03	28,90%
Total	**122715,06**	**100,00%**

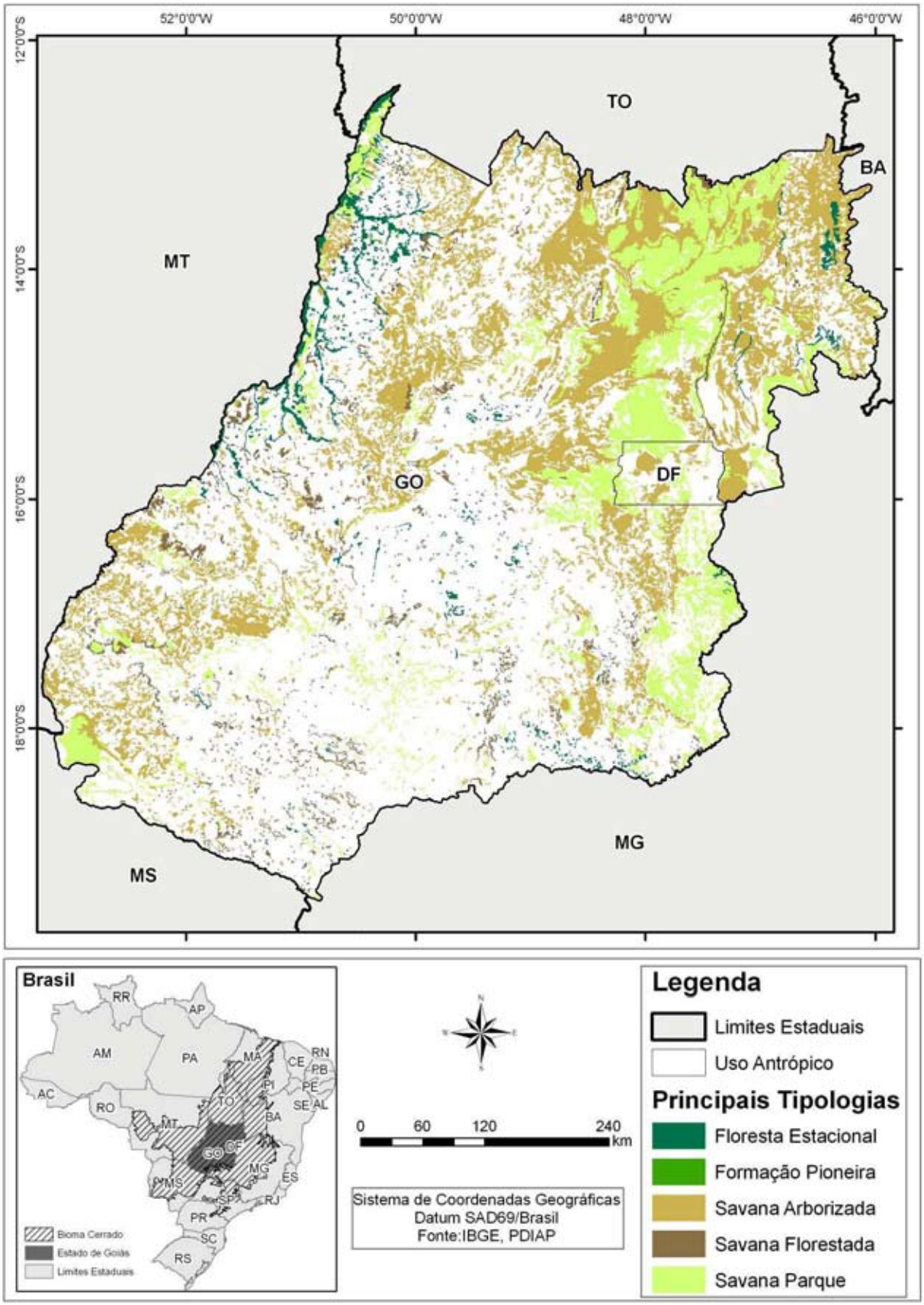


Figura 2: Mapa de distribuição das principais tipologias de vegetação remanescentes do Estado de Goiás

Destes 35% de vegetação remanescente, somente 12% estão na forma de unidades de conservação, totalizando 4,89% da área do Estado, muito inferior ao mínimo (10%) considerado necessário pela maioria dos especialistas (NOVAES et al., 2003). Estas UCs, em sua maioria de dimensões pequenas, encontram-se isoladas em relação a outras áreas protegidas ou até mesmo de áreas naturais, dificultando assim a manutenção da biodiversidade e de importantes processos ecológicos e evolutivos (AYRES et al., 2005). Em se tratando de conservação, outro elemento a se destacar é a preponderância do nordeste goiano em relação às demais regiões do Estado (figura 1).

As unidades de conservação de uso sustentável (US) preservam 79,85% das áreas de vegetação remanescente que se encontram sob forma de áreas protegidas, com destaque para as tipologias Savana Parque e Savana Arborizada, com 11,2% e 7,6%, respectivamente. Já as UCs de proteção integral (PI) são responsáveis por somente 20,15%, com ênfase também para as tipologias de Savana Parque e Savana Arborizada, com 11,2 % e 7,6 %, respectivamente.

Tabela 2: Principais tipologias de vegetação remanescente existentes nas UCs em Goiás

Tipologias da Vegetação Remanescente nas UCs	US (km²)	US(%)	PI(km²)	PI(%)
Floresta Estacional (decidual e semidecidual)	597,73	3,77%	182,34	1,15%
Savana arborizada	3832,33	24,15%	1206,52	7,60%
Savana Florestada	103,04	0,65%	6,84	0,04%
Formação Pioneira	0,00	0,00%	0,00	0,00%
Savana Gramíneo Lenhosa	498,84	3,14%	21,10	0,13%
Savana Parque	7641,52	48,15%	1781,07	11,22%
Total	**12673,45**	**79,85%**	**3197,88**	**20,15%**

Além de pouco representativas e isoladas, as áreas protegidas (UCs) se encontram sob fortes ameaças, tendo em vista que suas zonas de amortecimentos (até 10 km) apresentam um elevado índice de conversão (áreas nativas para uso antrópico) e uma elevada taxa de desmatamento (2002-2008). Em fato, 60% das zonas de amortecimento apresentam conversão superior a 70% (em vermelho na tabela 3), o que, segundo Bonnet et al., (2006), representa um passivo ambiental, em clara discrepância com o Código Florestal. Já os desmatamentos em curso, para o período entre 2002 e 2008, totalizaram 220,39 km² hectares.

Tabela 3: Unidades de conservação (US e PI) e respectivas taxas de conversão e desmatamentos ocorridos em um *Buffer* de 10 km

Unidades de Conservação	Conversão %	Desmat. (km²)
APA Meandros do Rio Araguaia, PE do Araguaia, FE do Araguaia	32,46	101,15
APA Nascente do Rio Vermelho	66,69	38,79
APA Planalto Central, APA Bacia do Rio Descoberto, PN de Brasília	40,54	28,79
APA Pouso Alto, PN Chapada dos Veadeiros	9,67	5,04
APA Serra da Jibóia	97,07	0,87
APA Serra das Galés, PE de Paraúna	88,38	2,13
APA Serra dos Pirineus, PE dos Pirineus	34,8	0,93
APA Serra Geral de Goiás, PE Terra Ronca	19,20	28,32
ARIE Águas de São João	72,58	0,98
FN Silvânia	89,35	1,75
PE Altamiro de Moura Pacheco	89,84	0,38
PE Serra de Caldas Novas	70,68	0,00
PE Serra Dourada	78,26	4,48
PE Telma Ortega	98,86	0,00
PN das Emas	72,53	6,71

Quanto aos corredores ecológicos, o corredor Cerrado-Pantanal aparece com 67% de sua área convertida, o que pode ser atribuído à sua localização (região sudeste do Estado de Goiás), onde o agronegócio é à base da economia regional. Em situação oposta, estão os corredores do Araguaia-Bananal e o Paranã-Pirineus com 25% e 31% de suas áreas ocupadas, respectivamente. O corredor Araguaia-Bananal situa-se no extremo noroeste do Estado, em uma área que tem em seus domínios a APA Meandros do Araguaia, a Floresta Nacional (FN) do Araguaia e o Parque Estadual do Araguaia. Já o corredor Paraná-Pirineus, situado na região nordeste do Estado, apresenta relevo bastante movimentado e solos pobres quimicamente, tendo nas atividades de subsistências e, em menor grau, na pecuária, sua base econômica. Ainda que estes fatores contribuam de forma decisiva com a alta conservação da região, o corredor Paraná-Pirineus foi o mais afetado com os desmatamentos detectados no período de 2002 a 2008 (tabela 4).

Tabela 4: Corredores Ecológicos presentes no Estado de Goiás e respectivas taxas de conversão e desmatamentos

Corredores Ecológicos	Área (km²)	Conversão (%)	Desmatamentos (km²)
Araguaia Bananal	2743,81	25,14	75
Cerrado Pantanal	42248,8	67,45	293,25
Paranã Pirineus	67012,1	31,68	796,63

As áreas prioritárias, agrupadas em três níveis de importância, apresentam valores relativamente baixos de conversão (tabela 5). Os menores índices de conversão são observados para as áreas de prioridade extremamente alta, haja vista que estão localizadas, predominantemente, em regiões com certa densidade de unidades de conservação, presença de corredores ecológicos e elevados índices de fragmentos de vegetação natural. Vale ressaltar que para estas áreas não existe nenhum tipo de política de manejo implantada; i.e. são apenas áreas com elevado potencial de conservação. Assim como observado nos corredores ecológicos, as áreas prioritárias mais conservadas são aquelas que estão perdendo as maiores áreas naturais (tabela 5).

Tabela 5: Áreas prioritárias para conservação da biodiversidade (MMA)

Áreas Prioritárias (Prioridade)	Área (km²)	Ocupação (%)	Desmatamento (km²)
Alta	43287,2	45,67%	230
Muito Alta	60813,4	32,77%	493
Extremamente Alta	103820	14,24%	836

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, analisamos as principais tipologias de vegetação remanescente encontradas nas unidades de conservação, bem como avaliamos o grau de eficácia e de ameaças em curso, tanto nestas unidades, quanto nos corredores ecológicos e áreas prioritárias em Goiás.

Foi identificado um déficit na quantidade de áreas protegidas (UCs), as quais correspondem a apenas 12% dos 35% da vegetação remanescente (principalmente das tipologias Savana Parque e Savana Arborizada) no Estado, concentrando-se, em sua maioria, na região nordeste do Estado de Goiás. As áreas protegidas (UCs) no Estado estão com seus ambientes fortemente ameaçados, tanto pela baixa quantidade de vegetação remanescente em suas zonas de amortecimentos, quanto pelos constantes desmatamentos que vêem ocorrendo nestas áreas.

Quanto aos corredores ecológicos e as áreas prioritárias (MMA), foram observados resultados mais satisfatórios, com menores índices de conversão (vegetação natural para atividades antrópicas). Porém, vale ressaltar que estas

áreas estão localizadas, principalmente, nas regiões mais afetadas pelos desmatamentos detectados entre 2002 e 2008.

As propostas de corredores ecológicos, quando implementadas de fato, são mais interessantes, em termos de viabilidade para conservação da biodiversidade, do que as próprias unidades de conservação. Mediante esse quadro de fragilidade do SNUCs e SEUCs em Goiás, faz se necessário a criação de novas áreas protegidas, interligando as UCs por meio de corredores ecológicos. Uma área com alto potencial para a criação de um corredor ecológico seria a bacia do Araguaia em Goiás, cujo foco seria a conexão do Parque Nacional das Emas com a APA Meandros do Araguaia, através da interligação de várias sub-bacias com elevado índice de prioridade, conforme recentemente por Couto (2009).

REFERÊNCIAS

AYRES, J. M.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; QUEIROZ, H. L.; PINTO, L. P.; MASTERSON, D.; CAVALCANTI, R. B. **Os corredores ecológicos das florestas tropicais do Brasil**. Belém: Sociedade Civil Maminaurá. 2005.

BONNET, B. R. P.; FERREIRA, L. G.; LOBO, F. C. **Sistema de Reserva Legal Extra-Propriedade no Bioma Cerrado: Uma Análise Preliminar no Contexto da Bacia Hidrográfica**. Revista Brasileira de Cartografia, n.59/2, ago. 2006.

BONNET, B. R. P.; FERREIRA, N. C.; FERREIRA JUNIOR, L. G.. **Ampliação de ambientes ripários como alternativa às reservas legais: Conciliando política florestal e conservação dos recursos hídricos**. Boletim Goiano de Geografia, v. 27, p. 97-115, 2007.

Carvalho, F.M.V. ; De Marco, P. ; FERREIRA JUNIOR, L. G. . **The Cerrado into-pieces: Habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil**. Biological Conservation, v. 142, p. 1392-1403, 2009.

COUTO, M. S. D. S. **Modelagem matemática para seleção de áreas prioritárias para conservação: métodos, cenários e contribuições para a gestão territorial em Goiás**. 2009. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) – Instituto de Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

DIAS, BRAULIO FERREIRA de SOUZA. **Conservação da Biodiversidade no Bioma Cerrado: histórico dos impactos antrópicos no Bioma Cerrado**. In: Faleiro, F. G.; Neto, A. L. F. (Ed.). Savanas: Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. Planaltina, DF: Embrapa, p. 303-333, 2008.

FERREIRA, Nilson Clementino ; FERREIRA JUNIOR, L. G. ; HUETE, Alfredo R ; FERREIRA, Manuel Eduardo . **An operational deforestation mapping system using**

MODIS data and spatial context analysis. International Journal of Remote Sensing, v. 28, p. 47-62, 2007.

GERGEL, S. E.; TURNER, M. G.; MILLER, J.R.; MELACK, J.M.; STANLEY, E.H. **Landscape indicators of human impacts to riverine systems**. Aquat. Sci., v. 64, February 2002.

IBGE. **Mapa de biomas do Brasil**. Escala 1:5.000.000. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. Disponível em: http://mapas.ibge.gov.br/biomas2/viewer.htm. Acesso em: 13 fev. 2007.
NOVAES; FERREIRA, L. G.; DIAS, R. **Identificação de Áreas Prioritárias para Conservação da Bio-Geodiversidade no Estado de Goiás**. Boletim Goiano de Geografia, UFG. Goiânia, v. 23(1), 41-58, 2003.

LIMA, J.E.F.W., SILVA, E.M. da. **Estimativa da contribuição hídrica superficial do Cerrado para as grandes regiões hidrográficas brasileiras**. In: Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, 17., 2007, São Paulo. Anais. CD-ROM, 2007.

LIMA, J.E.F.W., SILVA, E.M. da.; KOIDE, S. **The Challenge in managing water resources in the Cerrado Biome**, Brazil. In: IUGG General Assembly, 24, 2007, Perugia, Italy. Anais, 2007.

MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. **Biodiversity hotspots for conservation priorities**. Nature, v. 403: 853-858, 2000.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Atualização das Áreas Prioritárias 2006.** Disponível em: www.mma.gov.br**,** Acesso: 10 Julho 2009.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; ATKINSON, R.; RIBEIRO, J. F. **Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation II: comparison of the woody vegetation of 98 areas**. Edinburgh Journal of Botanics, v. 53, p.153-180, 1996.

ROCHA, Genival Fernandes ; FERREIRA JUNIOR, L. G. ; FERREIRA, Nilson Clementino ; FERREIRA, Manuel Eduardo ; Silva, G.N.F. . **Distribuição espacial dos dados de alertas de desmatamentos do bioma Cerrado para o período 2003-2007**. In: XIV SimpósioBrasileiro de Sensoriamento Remoto, 2009, Natal, RN. Anais do XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. São José dos Campos, SP : INPE, 2009. v. 1. p. 2983-2988.

SANO, E. E.; BARCELLOS, A. O.; BEZERRA, H. S. **Assessing the spatial distribution of cultivated pastures in the Brazilian savanna**. Pasturas Tropicales, Cali, v. 22, n. 3, p. 2-15, 2002.

SANO, E. E. et al. **Padrões de cobertura de solos do Estado de Goiás**. In: Ferreira, L. G. (Ed.). A encruzilhada socioambiental: biodiversidade, economia e sustentabilidade no cerrado. Goiânia: Ed. UFG, 2008.

SANO, E. E. ; ROSA, R. ; BRITO, J. L. ; FERREIRA JR, L. G. . **Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil**. Environmental Monitoring and Assessment, p. 1-12, 2009 (no prelo).

SCARAMUZZA, C. A. M. ; MACHADO, R. B. ; RODRIGUES, S.T. ; RAMOS NETO, M. B. ; PINAGÉ, E.R. ; DINIZ FILHO, J.A.F.. **Áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade em Goiás**. In: Ferreira, L.G.. (Org.). A encruzilhada socioambiental: biodiversidade, economia e sustentabilidade no Cerrado. Goiania: Editora da Universidade Federal de Goiás, 2008, v. , p. 13-66.

INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS E VAGINOSE BACTERIANA EM PACIENTES COM ESFREGAÇO CERVICAL ANORMAL

Caixeta, RCA[1], Alves RRF[2]; Carneiro, MAS[3]; Barros, NKS[1]; Ribeiro, AA[1]; Rabelo-Santos, SH[1]

[1]Faculdade de Farmácia/UFG
[2]Universidade Católica de Goiás
[3]Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG

1º Autor: rodrigofarmaciaufg@gmail.com
Orientadora: silvia.rabelo@pq.cnpq.br

PALAVRAS-CHAVE: Vaginose Bacteriana, HPV, *Chlamydia trachomatis*, Neoplasias cervicais

INTRODUÇÃO

Infecções cervicais são mais comuns em mulheres jovens (SILVA et al, 2006). Dentre as infecções cervicais, uma das mais comuns é a síndrome denominada vaginose bacteriana (VB) (TANAKA et al, 2007). A prevalência da VB é estimada entre 25% e 36% das mulheres que procuram o atendimento ginecológico (NAI et al, 2007). Esta síndrome é uma das alterações vaginais que pode provocar, além de leucorréia e mau cheiro, conseqüências mais graves, como parto prematuro e aumento do risco de aquisição e transmissão do HIV e HPV (SIMÕES et al, 2006; WATTS et al, 2005). É caracterizada pela substituição de lactobacilos predominantes na microbiota vaginal por uma mistura de microrganismos anaeróbios, que em condições normais estão presentes em pequena quantidade (BOYLE et al, 2003). Dentre esses microrganismos se destacam, principalmente, *Gardnerella vaginalis* e bactérias dos gêneros *Prevotella*, *Bacteroides* e *Mobiluncus* spp. (DEMBA et al, 2005).

A prevalência de infecções por Papilomavirus humano (HPV) também é alta em mulheres jovens podendo variar entre 2% a 44%, mostrando um pico em mulheres abaixo de 25 anos e outro após os 55 anos (BASEMAN & KOUTSKY, 2005). A mudança de padrões de comportamento nesse grupo, com diminuição da idade de início da vida sexual e aumento no número de parceiros sexuais, associa-se a maior probabilidade de infecção pelo HPV, contribuindo para aumentar o risco

de desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e invasivas da cérvice uterina (PEDROSA et al, 2008). Estudos têm demonstrado que a VB, por facilitar a aquisição da infecção por HPV, pode atuar como co-fator no processo da carcinogênese cervical através de suas nitrosaminas, embora não haja consenso a este respeito (WATTS et al, 2005; BOYLE et al, 2003).

Entre a população feminina de países subdesenvolvidos, aproximadamente 11-35% são expostas à infecção por *Chlamydia trachomatis* (CT) (SOARES et al, 2003). A CT é uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória que apresenta um ciclo biológico bifásico (elementar e reticular) e replicação dentro de vacúolos da célula hospedeira, originando inclusões citoplasmáticas características. Este microrganismo pode comprometer o trato genital causando estados patológicos como linfogranuloma venéreo, cervicite folicular e doença inflamatória pélvica, estando possivelmente associada à esterilidade em um número bastante significativo de mulheres em todo o mundo (MICHELON et al, 2005). A recorrência das infecções por CT é comum, especialmente nos indivíduos que se infectam antes dos 20 anos, e a imunidade desenvolvida é parcialmente protetora, considerando os seus 15 ou mais sorotipos. Episódios sucessivos de infecção aumentam o risco de se desenvolver seqüelas (SEADI et al, 2001). Vários estudos têm relatado que a infecção por CT não possui sintomas ou sinais característicos, dificultando o seu diagnóstico, porém, o aprimoramento de métodos laboratoriais permitiu um grande avanço no diagnóstico e avaliação epidemiológica das infecções provocadas pela CT (MELLES et al, 2000).

A infecção por CT é outro fator de risco associado à aquisição do HPV. O aumento da suscetibilidade ao vírus por esta bactéria pode estar associada à facilitação do acesso às células epiteliais proliferativas através de micro-abrasões ou por alterações das características das células epiteliais, aumentando a carga viral da infecção e facilitando a persistência. Alternativamente, a infecção concorrente por CT pode impedir a resolução da infecção por HPV através de uma indução de um padrão da resposta imune do tipo humoral. Há forte evidência epidemiológica que sugere que HPV e CT desempenham um papel central na etiologia da neoplasia intra-epitelial cervical e subseqüentemente no carcinoma cervical (TAMIM et al, 2002).

A associação entre a vaginose bacteriana e outras infecções sexualmente transmissíveis, como a infecção por HPV e por CT, provavelmente se baseia na

alteração do pH vaginal e à depleção dos lactobacilos protetores resultantes da síndrome definida (WATTS et al, 2005). Também é fato que VB tende a ser mais comum em mulheres diagnosticadas com lesão intra-epitelial cervical de alto grau (HSIL: NIC 2 ou NIC 3) que em mulheres sem evidências de anormalidades citológicas. Porém, recentes estudos relatam que VB não está associada com o desenvolvimento dessas lesões. (DISCACCIATI et al, 2006). Desta forma, relacionar os agentes infecciosos com a capacidade de produzir processos de morbidade no trato genital pode fornecer importantes informações no contexto da prevenção e do diagnóstico das infecções.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi analisar o padrão de microflora em pacientes encaminhada por esfregaço cervical anormal considerando infecções por *Chlamydia trachomatis* e por HPV e correlacionar os achados com fatores sócio-demográficos.

METODOLOGIA

Este estudo é parte de um projeto intitulado *Prevalência e genotipagem das infecções por Papilomavirus humano e soropositividade para Chlamydia trachomatis em mulheres portadoras de neoplasias cervicais,* cujo tamanho amostral foi de 154 mulheres encaminhadas ao Ambulatório de Patologia Cervical da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia por esfregaço cervical anormal.

Neste estudo, as mulheres foram submetidas a exame clínico e foi coletado material da ectocérvice e endocérvice, para um segundo exame citopatológico realizado através de método convencional. Este esfregaço serviu de fonte para a análise do padrão de flora bacteriana. Este material também foi colocado em uma solução tampão e utilizado para detecção de DNA-HPV por PCR e genotipagem através de hibridização reversa em pontos. Neste atendimento uma amostra de sangue foi colhida por profissional habilitado. Em seguida foi realizado um exame colposcópico com ácido acético a 5% e biópsia do colo do útero. Foi realizada conização uterina a frio ou com cirurgia de alta freqüência quando indicada.

A genotipagem do HPV-DNA foi realizada usando um teste de hibridização reversa o qual envolveu a hibridização de um *fragmento de DNA* de 450 pares de

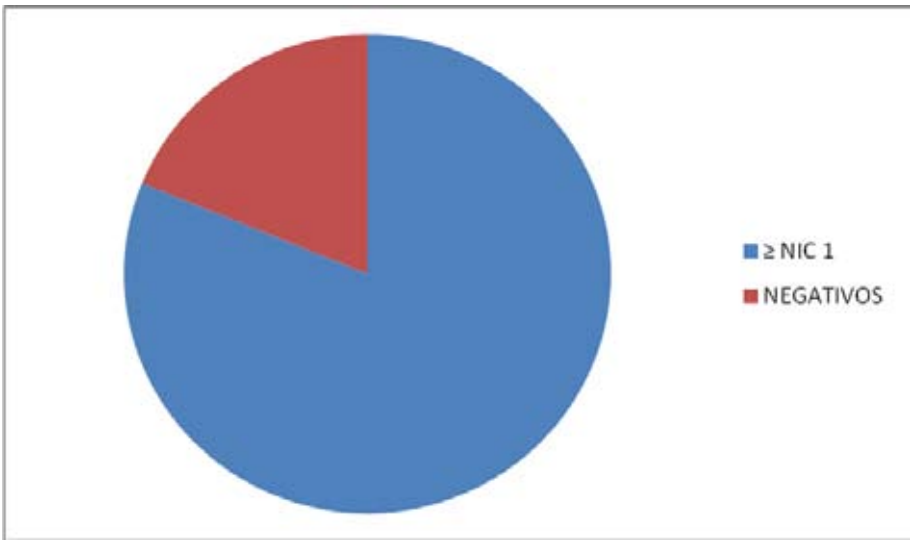
base a partir de um *primer* biotinilado PGMY aplicado em uma tira *nylon* contendo sondas imobilizadas de vários tipos de HPV. A tira contém 2 níveis de sondas controle de β-globina, 18 sondas de HPV de alto risco (HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82, e 83) e 9 de HPV de baixo risco (Sondas LR-HPV 6, 11, 40, 42, 53, 54, 57, 66, e 84). A mistura de amplificação de 100 uL continha 4mM de $MgCl_2$, 50mM de KCl, 7.5U de AmpliTaq Gold DNA polimerase (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 200 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, 600 mM de dUTP, 100 pmol de cada '*pool*' de *primer* PGMY09/PGMY11 biotiniladas e 2,5 pmol de cada 50 *primer* β-globina biotinilada, GH20 e PCO4. A seguir foi utilizado um protocolo de ultra-amplificação: ativação de AmpliTaq Gold para 9 minutos, a 95^0C, desnaturação de 1 minuto a 95^0C, anelamento por 1 minuto, a 55^0C, extensão a 72^0C por 1 minuto para um total de 40 ciclos, seguido de um 5-minutos terminal extensão escalar a 72^0C. A eletroforese em gel de Agarose foi realizada para identificar espécimes positivos para DNA-HPV. Os fragemntos de DNA foram desnaturados em 0.4N NaOH e 40 mL do produto desnaturado foram reagidos com 3 ml de tampão de hibridização reversa contendo genótipos de HPV e sonda β-globina em 2 concentrações imobilizadas em tiras de *nylon*. Hibridização positiva foi detectada por pela reação da biotina com a streptavidina mediada pela peroxidase.

O anticorpo sérico IgG anti CT foi determinado por técnica sorológica de imunoensaio enzimático (ELISA), com o teste SYM de IgG anti-CT (*Symbiosis Diagnostica Ltda*.). O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Amostras que apresentaram valores ≥1,1 foram consideradas positivas, enquanto as que apresentaram valores <0,9, negativas. As amostras com intervalo de valores de 0,9-1,1 foram consideradas indeterminadas e repetiram-se os testes.

RESULTADOS

Os diagnósticos histopatológicos finais incluíram 29 (19%) casos considerados como negativos para neoplasia e 125 (81%) casos com diagnósticos de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) mais graves do que NIC 1 (gráfico 1).

Gráfico 1. Distribuição dos Diagnósticos Histopatológicos Finais



A prevalência de infecção por HPV foi de 80% (120/154). Anticorpos anti CT foram detectados em 23.4% (36/154) das mulheres incluídas. Células indicadoras de VB foram observadas em 17.5 % (27/154) dos casos. A prevalência de infecção por CT, HPV e VB associadamente foi de 4,5% (7/154) (gráfico 2).

Considerando as mulheres VB positivas a prevalência de HPV foi 85,2% (23/27). A prevalência de infecção por CT nestas mulheres foi de 33,4% (9/27). Infecções por HPV e diagnóstico positivo ≥ NIC1 representaram 63% (17/27) do total de amostras positivas para VB (tabela 1).

Gráfico 2. Prevalência dos casos positivos para agentes infecciosos HPV, CT e VB.

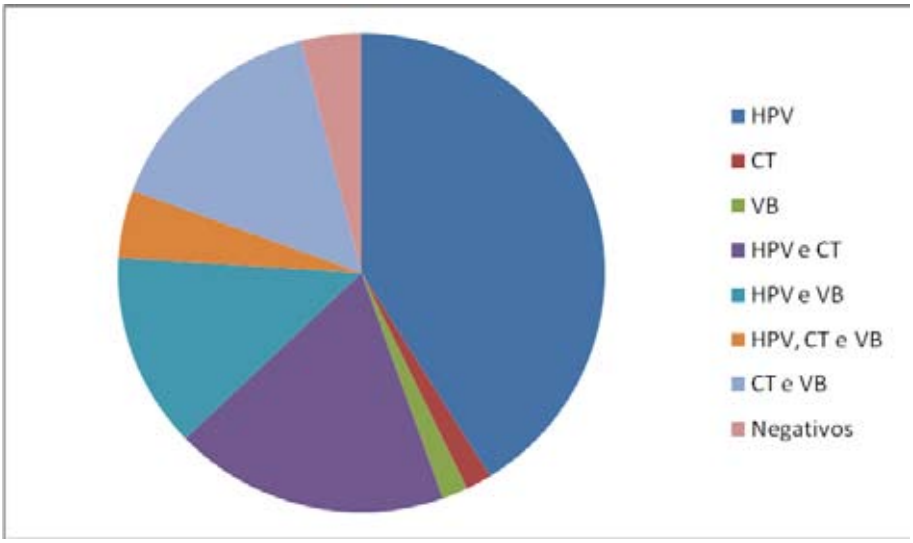


Tabela 1. Associação de positividade e negatividade para VB à presença ou ausência de HPV e CT.

DIAGNÓSTICO	Vaginose Bacteriana			
	POSITIVO		NEGATIVO	
	n	%	n	%
HPV Positivo	23	85,2	97	76,4
HPV Negativo	04	14,8	30	23,6
CT Positivo	09	33,4	28	22,0
CT Negativo	18	66,6	99	78,0
HPV Positivo e NIC Positivo	17	63,0	79	62,2
HPV Positivo e NIC Negativo	10	37,0	48	37,8

A população em estudo apresentou idade média de 27 anos. Mulheres com menos de 30 anos de idade representaram 40,2% (62/154) do total de casos. Mulheres com mais de 29 anos representaram em 59,8% (92/154) dos casos. As prevalências de VB e das infecçoes por HPV e CT foram semelhantes considerando os dois grupos etários. (tabela 2).

Tabela 2. Prevalência das infecções quanto à idade.

DIAGNÓSTICO	IDADE			
	< 30 anos		≥ 30 anos	
	n	%	n	%
HPV Positivo	49	79,0	71	77,0
HPV Negativo	13	21,0	21	23,0
CT Positivo	17	27,4	20	21,7
CT Negativo	45	72,6	73	78,3
VB Positivo	09	14,5	18	19,6
VB Negativo	53	85,5	74	80,4

Em relação aos fatores sócio-demográficos, 81,2% (125/154) das mulheres incluídas iniciaram a atividade sexual antes dos 19 anos (gráfico 3). Esta idade foi considerada devido à transição etária da adolescência para a idade adulta. A prevalência de HPV, CT e VB foi maior em mulheres com início da atividade sexual antes dos 19 anos (tabela 3).

Gráfico 3. Prevalência das pacientes com IAS < 19 anos e IAS ≥ 19 anos.

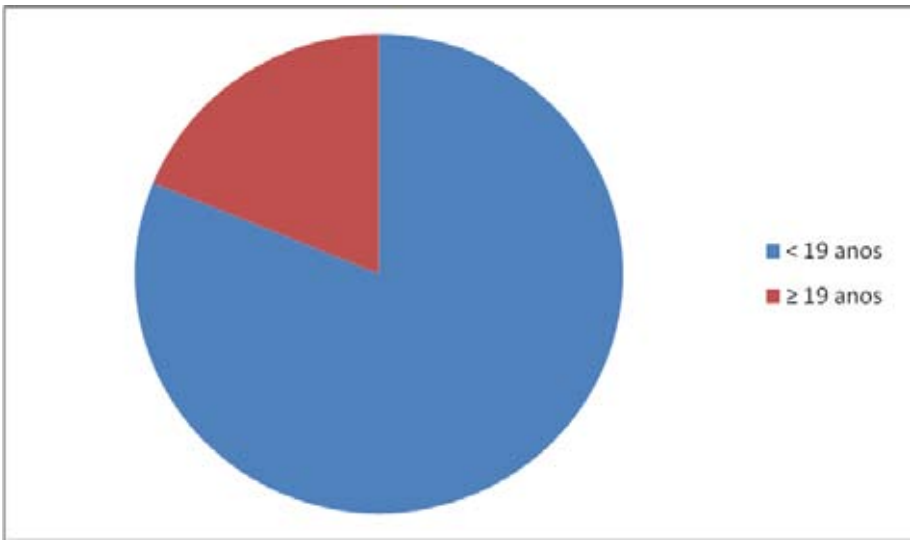


Tabela 3. Relação do Início da Atividade Sexual (IAS) e Diagnóstico de infecções

DIAGNÓSTICO	IAS			
	< 19 anos		≥ 19 anos	
	n	%	n	%
HPV Positivo	99	82,5	21	17,5
CT Positivo	31	83,8	06	16,2
VB Positivo	23	85,2	04	14,8

Considerando o número de parceiros sexuais, 22,1% (34/154) das pacientes relataram 1 parceiro, 49,3% (76/154) relataram de 2 a 4 parceiros e 28,6% (44/154) tiveram mais de 5 parceiros sexuais a partir do IAS (gráfico 4). A prevalência de infecção por HPV, CT e VB em mulheres que relataram um parceiro foi respectivamente de 67,6% (23/34), 20,6% (7/34), e 9% (3/34). Em relação às pacientes que tiveram de 2 a 4 parceiros sexuais, a infecção por HPV foi diagnosticado em 80,3% (61/76), enquanto que diagnósticos de CT e VB corresponderam, respectivamente, a 21% (16/76) e 19,8% (15/76) do total de casos. Considerando as pacientes com mais de 4 parceiros sexuais, a prevalência de infecção por HPV foi de em 81,8% (36/44), enquanto que as prevalências de infecção por CT e VB foram de 31,8% (14/44) e 20,4% (9/44) (tabela 4).

Gráfico 4. Prevalência do nº de parceiros sexuais entre a população de estudo

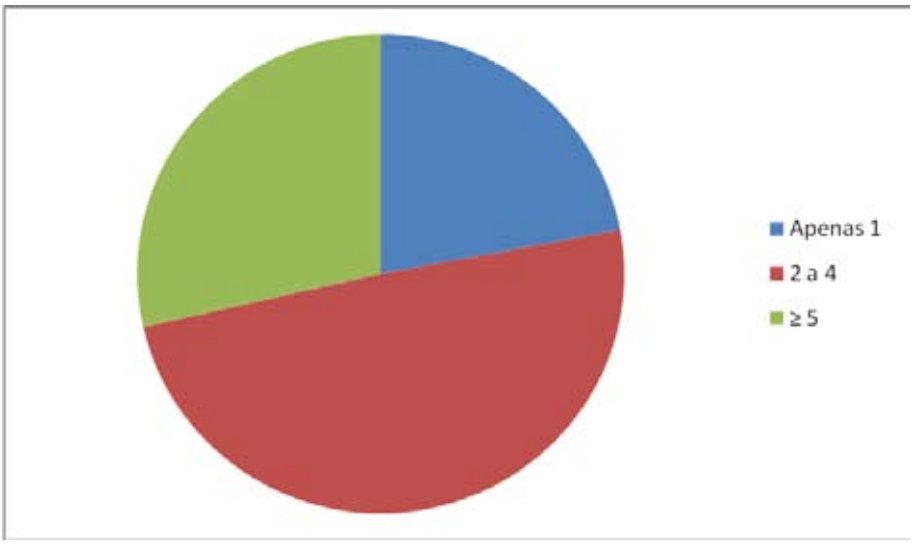


Tabela 4. Relação do nº de parceiros sexuais e o diagnóstico de infecções.

DIAGNÓSTICO	Nº de Parceiros Sexuais					
	Apenas 1		2 a 4		≥ 5	
	n	%	n	%	N	%
HPV Positivo	23	67,6	61	80,3	36	81,8
HPV Negativo	11	32,4	15	19,7	08	18,2
CT Positivo	07	20,6	16	21,0	14	31,8
CT Negativo	27	79,4	60	79,0	30	68,2
VB Positivo	03	9,0	15	19,8	09	20,4
VB Negativo	31	91,0	61	80,2	35	79,6

DISCUSSÃO

No atual estudo foi observada uma maior prevalência de HPV nos esfregaços cervicais anormais quando comparados às infecções por CT e VB. Um estudo na Malásia (SHARIFAH et al, 2009), onde o câncer cervical é a segunda maior causa de morbidade feminina, demonstrou 95% dos dos esfregaços citológicos diagnosticados com NIC e 100% dos carcinomas eram de que mulheres HPV positivas. CAMARA et al (2003) estudando a prevalência de genótipos de HPV em mulheres com lesões cervicais neoplásicas e pré-neoplásicas no Distrito Federal do Brasil, também identificou maiores prevalências deste vírus em esfregaços cervicais alterados, sendo HPV de alto risco um achado comum.

Houve maior prevalência de diagnósticos de CT em mulheres encaminhadas por esfregaço anormal quando comparardas a mulheres com diagnóstico de VB. CT é um agente comumente relacionado ao sexo sem proteção. (SOARES et al, 2003). De acordo com achados epidemiológicos citados por KUČINSKIENĖ et al (2006), os principais fatores de risco para a prevalência de CT são: freqüentes relações sexuais e falta de uso ou uso irregular da barreira de contracepção durante o coito, ectopia cervical, doenças sexualmente transmissíveis preexistentes, e desemprego. Por outro lado, VB não apresenta aspectos de IST, uma vez que é uma inversão de flora (WATTS et al, 2005). Contudo, estudos têm demonstrado que infecções sexualmente transmissíveis e VB constituem fatores de risco para aquisição de HPV, mas não se pode relatar o contrário (SOARES et al, 2003).

Considerando os casos positivos para VB, os diagnósticos positivos para HPV se mostraram altamente prevalentes. Vários estudos indicam que VB é fator de risco para aquisição de HPV (SIMÕES et al, 2006; TANAKA et al, 2007; NAI et al 2007; WATTS et al, 2005), sendo que relatos de sua conexão com NIC vêm sendo discutida há mais de 30 anos (BOYLE & SMITH, 1999). Esfregaços de Papanicolaou compatíveis com NIC, que não tiveram controle para o rastreamento de HPV, demonstraram ligação com VB (PLATZ-CHRISTENSEN et al *apud* BOYLE & SMITH, 1999), porém quando houve o controle esta associação não foi observada (PETERS et al *apud* BOYLE & SMITH, 1999). Por outro lado, GUIJON et al (1992) encontraram significante associação entre resultados histopatológicos de NIC e microbiota anormal. DISCACCIATI et al (2006) relataram uma alta freqüência de positividade para VB em mulheres com lesão intra-epitelial de alto grau (LIEAG).

Em relação aos fatores sócio-demográficos, o parâmetro idade evidenciou semelhança entre as prevalências de VB e infecções por HPV e CT antes e após os 30 anos. Nos estudos de TAMIM et al (2002), maiores prevalências de HPV e CT foram encontradas em mulheres após os 30 anos de idade, considerando que a média de idade neste estudo foi de 34,0±8,3 anos. BOYLE et al (2003) relataram uma maior prevalência de VB nas mulheres acima de 30 anos, sendo a média da população de 37,5 anos de idade. Entretanto, TANAKA et al (2007) observaram que VB ocorreu, principalmente na faixa etária de 15 a 19 anos e, em segundo lugar, na faixa dos 10 aos 14 anos.

Para o fator IAS, diagnósticos de VB e infecção cervical por HPV, CT apresentaram maiores prevalências em mulheres que iniciaram atividade sexual

antes dos 19 anos. GUO et al (2006) afirmaram que mulheres que iniciaram atividade sexual mais jovens têm maior predisposição para infecção por HPV. VB também foi observado com maior prevalência no grupo de mulheres com IAS < 19 anos nos estudos de BAYSLEY et al (2009). Em contraste, nos estudos de HARIJAONA et al (2009) observaram que mulheres com início da atividade sexual após os 20 anos de idade apresentaram maior freqüência de CT.

Considerando o número de parceiros sexuais, diagnósticos de infecção para HPV, CT e VB foi mais freqüente em mulheres que relataram mais de um parceiro sexual. Sabe-se que o aumento no número de parceiros sexuais associa-se a maior probabilidade de infecção pelo HPV (PEDROSA, 2008). TAMIM et al (2002) observaram que aproximadamente 56% das mulheres que relataram 1 parceiro sexual foram diagnosticadas com HPV e CT. Nos estudos de TANAKA et al (2007), 50% das mulheres com VB relataram ter tido dois ou 3 parceiros após o início da atividade sexual.

CONCLUSÃO

Em mulheres HPV positivas, a prevalência de VB foi menor do que a de CT o que pode ser explicado pelo fato de que as mulheres foram incluídas por esfregaço anormal e conseqüentemente com maior probabilidade de serem positivas para infecções sexualmente transmissíveis como HPV e CT e de diagnóstico histopatológico de NIC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASEMAN, J. G. & KOUTSKY, L. A. *The epidemiology of human papillomavirus infections - Review*; **Journal of Clinical Virology 32S:S16–S24**, 2005.
- BAYSLEY K.; CHANGALUCHA, J.; WEISS, H. A.; MUGEYE, K.; EVERETT, D.; HAMBLETON, I; HAY, P.; ROSS, T.; TANTON, C.; CHIRWA, T.; HAYES, R. & WATSON-JONES, D. *Bacterial vaginosis in female facility workers in north-western Tanzania: prevalence and risk factors*; **Sex Transm Infect 85: 370–375,** 2009.
- BOYLE, D.C.M.; BARTON, S. E.; UTHAYAKUMAR, S.; HAY, P. E.; POLLOCK, J. W.; STEER, P. J. & SMITH, J. R. *Is bacterial vaginosis*

associated with cervical intraepithelial neoplasia?; **Int. J. Gynecol. Cancer 13: 159-163**, 2003.

- BOYLE, D. C. M. & SMITH, J. R. *Infection and Cervical Intraepithelial Neoplasia*; **Int. J. Gynecol. Cancer 9: 177-186**, 1999.
- CAMARA G. N.; CERQUEIRA, D. M.; OLIVEIRA, A. P.; SILVA, E. O.; CARVALHO, L. G. & MARTINS, C. R. *Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil*; **Mem Inst Oswaldo Cruz 98 (7) :879-883,** 2003.
- DEMBA, E.; MORISON, L.; van der LOEFF, M. S.; AWASANA, A. A.; GOODING, E.; BAILEY, R.; MAYAUD, P. & WEST, B. *Bacterial vaginosis, vaginal flora patterns and vaginal hygiene practices in patients presenting with vaginal discharge syndrome in The Gambia, West Africa*; **BMC Infectious Diseases 5 (12),** 2005.
- DISCACCIATI, M. G.; SIMOES, J. A.; LOPES, S. E.; SILVA, S. M.; MONTEMOR, E. B. L.; RABELO-SANTOS, S. H. & WESTIN, M. C. A. *Is Bacterial Vaginosis Associated With Squamous Intraepithelial Lesion of the Uterine Cervix?*; **Diagnostic Cytopathology 34 (5): 323-325**, 2006.
- GUIJON, F.; PARASKEVAS M. & RAND, F. *Vaginal Microbial flora as a cofactor in the pathogenesis of uterine cervical intraephitelial neoplasia*; **Int. j. Obstet. Gynecol. 37: 185-191,** 1992.
- GUO, G. & TONG, Y. *Age at First Sexual Intercourse, Genes, and Social Context: Evidence from Twins and the Dopamine D4 Receptor Gene*; **Demography 43 (4): 747-769,** 2006.
- HARIJAONA, V.; RAMAMBASON, J. D.; MORISSET R.; RASAMINDRAKOTROKA, A. & RAVAOARINORO, M. *Prevalence of and risk factors for sexually-transmitted infections in hidden female sex workers*; **Med Mal Infect.**, 2009.
- KUČINSKIENĖ, V.; SUTAITE, I.; VALIUKEVICIENE, S.; MILASAUSKIENE, Z. & DOMEIKA, M. *Prevalence and risk factors of genital Chlamydia trachomatis infection*; **Medicina (Kaunas) 42 (11): 885-894**, 2006 — Review. English, Lithuanian.
- MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; LINHARES, I. M. & SIQUEIRA, L. F. G. *Avaliação de parâmetros para o diagnóstico laboratorial de infecção genital*

feminina pela Chlamydia trachomatis; **Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop. 33 (4):355-361,** 2000.

- MICHELON, J.; BOENO, A.; FILHO, E. V. C.; STEIBEL, G.; BERG, C. & TORRENS, M. C. T. *Diagnóstico da infecção por Chlamydia trachomatis - Revisão*; **Scientia Medica 15 (2): 115-120**, 2005.
- NAI, G. A.; MELLO, A. L. P.; FERREIRA, A. D. & BARBOSA, R. L. *Frequência de Gardnerella vaginalis em esfregaços vaginais de pacientes histerectomizadas*; **Rev. Assoc. Med. Bras. 53 (2): 162-165,** 2007
- PEDROSA, M. L.; MATTOS, I. E. & KOIFMAN, R. J. *Lesões intra-epiteliais cervicais em adolescentes: estudo dos achados citológicos entre 1999 e 2005, no Município do Rio de Janeiro, Brasil*; **Cad. Saúde Pública, 24 (12):2881-2890,** 2008.
- SEADI, C. F.; ORAVEC, R.; von POSER, B.; CANTARELLI, V. V. & ROSETTI, M. L. *Diagnóstico laboratorial da infecção pela Chlamydia trachomatis: vantagens e desvantagens das técnicas - Revisão;* **J. Bras. de Patol. e Med. Lab. 38 (2): 125-133,** 2002.
- SHARIFAH, N. A.; SEENI A.; NURISMAH, M. I.; CLARENCE-KO, C. H.; HALTA, A. Z.; HO N. P.; RAFAEE, T.; ADEEB, N. & JAMAL R. *Prevalence of human papillomavirus in abnormal cervical smears in Malaysian patients*; **Asian Pac J Cancer Prev. 10 (2): 303-306,** 2009.
- SILVA, T. T.; GUIMARÃES, M. L.; BARBOSA, M. I. C.; PINHEIRO, M. F. G. & MAIA, A F. *Identificação de tipos de papilomavirus e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical*; **Rev Bras Ginecol Obstet. 28(5): 285-291,** 2006.
- SIMÕES, J. A.; DISCACCIATI, M. G.; BROLAZO, E.; PORTUGAL, P. M.; PAUPÉRIO, R. P. S.; AROUTCHEVA, A. & LIN TAO, V. *Fatores Comportamentais e Características da Microbiota Vaginal envolvidos na gêneses da Vaginose Bacteriana em Profissionais do Sexo e Não-profissionais do sexo*; **DST – J. Brás. Doenças Sex. Transm. 18 (2): 108-112,** 2006.
- SOARES, V. L.; MESQUITA, A. N. T. S.; CAVALCANTE, F. G. T.; SILVA, Z. P.; HORA, V.; DIEDRICH, T.; SILVA, P. C.; MELO, P. G.; DACAL, A. R. C.; CARVALHO, M. F. & FELDMEIER, H. *Sexually transmitted infections in a*

female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors; **Tropical Medicine and International Health 8 (7): 595–603**, 2003.

- TAMIM, H.; FINANB, R. R.; SHARIDAC, H. E.; RASHIDC, M. & ALMAWID, W. Y. *Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and Chlamydia trachomatis;* **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 43: 277–281,** 2002.
- TANAKA, V. d'A.; FAGUNDES, L. J.; CATAPAN, A.; DAVIDSON, S. L.; BELDA, W.; ARNONE, M.; SOREANO, R. & MORAES, F. R. B. *Perfil epidemiológico de mulheres com Vaginose bacteriana, atendidas em um ambulatório de doenças sexualmente transmissíveis, em São Paulo, SP;* **An Bras. Dermatol. 82 (1):41-46,** 2007.
- WATTS, D. H.; FAZARRI, M.; MINKOFF, H.; HILLIER, S. L.; SHA, B.; GLESBY, M.; LEVINE, A. M.; BURK, R.; PALEFSKY, J. M; MOXLEY, M.; AHDIEH-GRANT, L. & STRICKLER, H. D. *Effects of Bacterial Vaginosis and Other Genital Infections on the Natural History of Human Papillomavirus Infection in HIV-1–Infected and High-Risk HIV-1–Uninfected Women*; **The Journal of Infectious Diseases 191:1129–1139,** 2005.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *Spermacoce poaya* A. Saint-Hilaire (*RUBIACEAE*) FRENTE CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS *IN VITRO*

Francyelli Mariana dos Santos Mello[1]; Elisângela de Paula Silveira Lacerda[1]

[1]Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 74001-970. Goiânia-Goiás, Brasil.
e-mail: silveiralacerda@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O uso dos produtos naturais iniciou-se há milhares de anos por populações de vários países com o intuito de tratar diversas patologias, sendo utilizados pela população como forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos. As plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial e, ainda hoje, elas são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (Maciel *et al.*, 2002; Veiga Jr & Mello, 2008).

A busca da população por estas plantas incentivou os pesquisadores e a indústria farmacêutica a investirem mais nas pesquisas de novos fármacos, despertando o interesse de estudos em áreas multidiciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica (Maciel *et al*., 2002).

A família Rubiaceae Juss., pertence a classe Magnoliopsida, ordem Rubiales e dividi-se em 3 subfamílias a Rubioideae, a Cinchonoideae e a Ixoroideae. Essa família apresenta cerca de 650 gêneros e 13.000 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, e poucas espécies em áreas temperadas e frias. No Brasil a família Rubiaceae é composta por cerca de 110 gêneros e 2.000 espécies (Delprete *et al.*, 2004). Quimicamente, a família destaca-se pela presença de alcalóides quinolínicos, quinina e cinchonina; isoquinolínicos, emetina; indólicos, iombina; e bases de purina como a cafeína, substância utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia de todo mundo (Schripsema *et al*., 2003).

A família Rubiaceae, também, se destaca por apresentar espécies de valor econômico e medicinal nos gêneros *Chichona, Coffea, Rubia, Borreria e Coutarea.*

O gênero *Borreria* (Rubiaceae - Rubioideae - Spermacoceae) possui cerca de 100 espécies (Cabral 1991), distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da América, África, Ásia e Austrália, apresentando maior diversidade no planalto brasileiro (Steyermark, 1972).

Spermacocae poaya, sinonímia *Borreria poaya*, é uma espécie pertencente à família Rubiaceae, tribo Spermacoceae e ao gênero B*orreria* (Flora Brasiliensis, 2009), utilizada como chá em casos de bronquite, asma e pneumonia, sendo popularmente conhecida como poaia-do-campo, poaia-rasteira, poaia-do-arador (Balbach, 1984). Nenhum estudo fitoquímico, farmacológico e/ou toxicológico foi encontrado na literatura a acerca da espécie *Spermacoce poaya*, até o presente momento.

2. OBJETIVOS

Com base no exposto, faz-se necessário investigamos a atividade citotóxica e antitumoral do extrato bruto etanólico das folhas de *S. poaya* frente células normais e tumorais. Uma vez que as plantas medicinais são consumidas sem comprovação dos seus efeitos farmacológicos e possíveis efeitos tóxicos, além disso, os tratamentos atuais para os diversos tipos de cânceres não são considerados satisfatórios, os estudos com plantas medicinais representam um novo viés para síntese de medicamentos menos agressivos ao organismo.

3. METODOLOGIA

Extrato bruto etanólico *Spermacoce poaya* (EBEfSp)

O extrato bruto etanólico das folhas de *S. poaya* (EBEfSp) foi, previamente, preparado no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG) e, posteriormente, fornecido ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética para a realização deste estudo.

Preparo do Meio de Cultura

Para a realização dos ensaios biológicos foi utilizado o meio de cultura celular RPMI-1640 (CULTILAB, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), e 0,1% Penicilina (10000

UI/ml)/Estreptomicina (10mg.ml^{-1}) (CULTILAB, Campinas, SP, Brasil), conforme o estabelecido pelo protocolo da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA , 2009).

Preparo da Droga Teste

O EBEfSp foi diluído em meio de cultura celular RPMI-1640 (CULTILAB, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), em aparelho de ultra-sônico (BRANSON, Danbury, CT, EUA), após um período de 40 minutos. O EBEfSp foi testado nas concentrações de 0.001 mg.mL^{-1}, 0.01 mg.mL^{-1}, 0.1 mg.mL^{-1} e 1 mg.mL^{-1}.

Preparo da Droga Controle

Como controle positivo foi utilizado um fármaco antineoplásico com amplo espectro de ação antitumoral, ciclofosfamida (BAXTER, Deerfield, IL, EUA). A ciclofosfamida foi diluída em meio de cultura celular RPMI-1640 (CULTILAB, Campinas, SP, Brasil), sem Soro Fetal Bovino, e utilizada na concentração de 5 mg. mL^{-1}.

Cultura celular

Neste estudo foram utilizadas duas linhagens de células tumorais, uma de leucemia mielóide crônica (K-562), fornecidas pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás (UFG) e tumor ascístico, Sarcoma 180, fornecida pelo Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia. A linhagem de célula normal, fibroblasto humano (HFF-1), também, foi fornecida pela Universidade Federal de Uberlândia. As células foram cultivadas em garrafas de cultura segundo protocolo estabelecido pela ATCC (ATCC, Rockville, MD, EUA ,2009) e mantidas em estufa (REVCO, Thermo Fisher Sci. Inc., Waltham, MA, EUA) a 37°C contendo 95% de ar e 5% de CO_2 até o momento do ensaio experimental. Para a realização dos ensaios foram utilizadas células que apresentavam viabilidade superior a 90%.

Ensaios *in vitro*

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* sobre as células normais, fez necessário tripsinizá-las para quantificação. As células HFF-1 foram

tratadas com 3 mL de tripsina (SIGMA – Aldrich Corp.; St. Louis, MO, EUA) na concentração de 2,5 $mg.mL^{-1}$ e incubadas em estufa a 37°C contendo 95% de ar e 5% de CO_2 por 5 minutos para sua remoção da garrafa de cultivo celular. Após o período de incubação, a tripsina foi retirada da garrafa de cultivo, sendo adicionado à garrafa 5mL de meio de cultura RPMI-1640 (CULTILAB, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) para inativar a ação da tripsina.

As células K-562, Sarcoma 180 e HFF-1 foram centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante descartado. O botão celular foi ressuspenso em 1mL de meio de cultura RPMI-1640 (CULTILAB, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) e antibióticos 100 UI/mL (estreptomicina e penicilina) (CULTILAB, Campinas, SP, Brasil). Em seguida, realizou-se a contagem das células viáveis em azul de tripano (VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil) para o ajuste da concentração em $2x10^5$ células/mL para a posterior realização dos ensaios de citotoxicidade.

Avaliação de citotoxicidade pelo método de redução do MTT

O princípio deste método consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela absorção do sal tetrazólio MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria, através da atividade enzimática de desidrogenases, a um produto chamado Azul de Formazan (Mosmann, 1983).

A suspensão celular obtida na concentração de $2x10^5$ células/mL foi adicionada em uma placa de 96 poços. As células HFF foram plaqueadas e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C contendo 95% de ar e 5% de CO_2; visando promover sua aderência no fundo dos poços de cultivo celular. Após as 24 horas de incubação as células foram tratadas com o extrato nas concentrações 0.001 $mg.mL^{-1}$, 0.01 $mg.mL^{-1}$, 0.1 $mg.mL^{-1}$ e 1 $mg.mL^{-1}$; e novamente incubadas por 24 horas em estufa a 37°C contendo 95% de ar e 5% CO_2. As células K-562 e Sarcoma 180 foram plaqueadas e tratadas com o EBEfSp nas concentrações 0.001 $mg.mL^{-1}$, 0.01 $mg.mL^{-1}$, 0.1 $mg.mL^{-1}$ e 1 $mg.mL^{-1}$, e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C contendo 95% de ar e 5% CO_2.

Após a incubação de 24 horas, foram adicionados aos poços de cultivo celular das linhagens utilizadas, 10 µL de MTT na concentração de 5 $mg.mL^{-1}$. A

placa foi novamente incubada em estufa a 37°C contendo 95% de ar e 5% de CO_2 e após 3 horas foram adicionados aos poços de cultivo celular 50µL SDS 10% / HCL 0.01 N para solubilizar os cristais de Formazan formado. A quantificação da densidade óptica foi medida após 24 horas do tratamento com SDS, em espectrofotômetro, Leitor para Elisa, utilizando-se filtro de interferência de 550 nm (Silveira-Lacerda *et al*., 2009).

A porcentagem de crescimento das células na presença do EBEfSp foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Viabilidade} = \frac{\text{Média da Densidade Óptica do tratado}}{\text{Média da Densidade Óptica do Controle negativo}} \times 100$$

Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripano

A avaliação da viabilidade da célula na presença do EBEfSp foi realizada segundo o método de exclusão de azul de tripano em células K-562. Esse método permite detectar células inviáveis, cuja membrana por apresentar danos, permite a incorporação do corante e coram-se em azul; enquanto que as células viáveis , por apresentarem membrana integra, bloqueiam a passagem do corante, ficando transparente (Mcateer & Davis, 1994 *apud* Ribeiro *et al*., 2003). O número total de células (células vivas e mortas) foi calculado segundo Gorjão (2005).

Análise estatística

Para a análise dos dados foram utilizados a Análise de Variância (ANOVA) e *posteriori* o teste de comparação múltipla de Tukey, com significância de $p<0.05$, para a comparação entre os grupos. Foi utilizado o Software GraphPad-Prism V3.02. Para todos os grupos consideraram-se estatisticamente significativos valores de p menores que 0.05 ($p<0.05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a atividade citotóxica *in vitro* do EBEfSp em células de leucemia mielóide crônica, K-562; Sarcoma 180 e células do prepúcio do pênis, HFF-1.

Três experimentos independentes, em triplicatas, foram realizados com K-562 utilizando o teste de redução do MTT e o de exclusão do Azul de Tripano. Ambos os testes demonstraram que o EBEfSp não foi citotóxico para as concentrações de

0.001 mg.mL^{-1}, 0.01 mg.mL^{-1}, 0.1 mg.mL^{-1} e 1 mg.mL^{-1}. Os testes de MTT (Figura 1) demonstraram um percentual muito baixo de proliferação, 3.46%; 5%; 6.84% e 9.93%, para às concentrações citadas acima e os testes de Azul de Tripano (Figura 2) apresentaram um percentual de viabilidade celular de 85.41%; 90.91%; 89.2% e 83.6%, respectivamente, para as 0.001 mg.mL^{-1}, 0.01 mg.mL^{-1}, 0.1 mg.mL^{-1} e 1 mg.mL^{-1}. Não houve diferença significativa em nenhum dos tratamentos do EBEfSp em relação ao controle negativo.

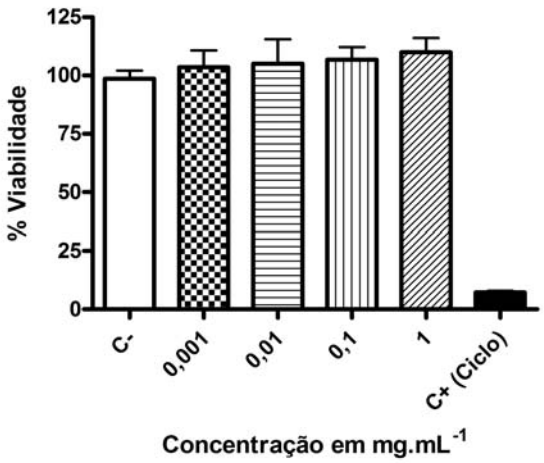


Figura 1. Viabilidade celular de células K562 após 24 horas de exposição ao tratamento com o EBEfSp pelo teste de MTT. A figura mostra a média e o desvio padrão dos tratamentos.

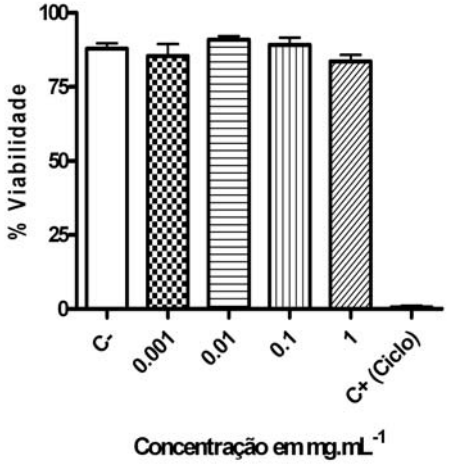


Figura 2. Viabilidade celular de células K562 após 24 horas de exposição ao tratamento com o EBEfSp pelo teste de Azul de Tripano. A figura mostra a média e o desvio padrão dos tratamentos.

O teste de MTT e o teste de Azul de Tripano foram utilizados com a mesma finalidade neste estudo, medir a viabilidade celular. Porém, esses testes têm objetivos distintos. O teste de redução do MTT mede indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática das mitocôndrias (Mosmann, 1983), enquanto o teste de exclusão do Azul de Tripano avalia a permeabilidade da membrana celular. Portanto, mesmo a membrana sendo lisada por um agente citotóxico, organelas citoplasmáticas podem, ainda, manter sua atividade fisiológica (Valadares *et al.,* 2007), contudo, é possível obtermos resultados diferentes para o mesmo tratamento. Os testes utilizados neste estudo nos apresentaram resultados semelhantes, o teste de MTT mostrou que houve proliferação celular e o teste de Azul de Tripano evidenciou viabilidade celular superior a 80%, após tratamento com o EBEfSp com exposição de 24 horas.

Na literatura encontramos diversos estudos com plantas da família Rubiaceae para avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória, antioxidante. Peixoto Neto *et al.* (2002) testou o potencial antibactericida do extrato metanólico das raízes de *Borreria verticilata* (Rubiaceae) frente cepas multiresistentes de *Pseudomonas aeruginosa.* O extrato de *B.verticilata* exibiu uma ampla atividade antibacteriana, provavelmente pela presença dos alcalóides indólicos.

Niño *et al.* (2006) testaram trinta extratos de oitos plantas da família Asteraceae e duas plantas da famíla Rubiaceae em duas bactérias Gram-positivas, duas Gram-negativas e três fungos. Os autores relataram que a espécie mais importante da pesquisa foi *Gonzalagunia rosea* Standl (Rubiaceae) devido à atividade intensa e moderada dos extratos de metanol e diclorometano contra os fungos *F.solani* e *C.albicans*, respectivamente, bem como a intensa atividade citotóxica do extrato metanólico testada através do bioensaio de *Artemia salina*.

Galianthe é a primeira ramificação do táxon *Spermacoce* (Karehed *et al.*, 2008) sendo encontrados na literatura, além de estudos antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes; estudos antitumorais com espécies do gênero. O extrato bruto das partes aéreas de *G. brasiliensis* (Rubiaceae) foi submetido à avaliação da atividade antiproliferativa em culturas de células tumorais, entre elas K-562. Nesse estudo de Moura *et al.* (2006) obteve que o extrato de *Galianthe brasiliensis* inibiu em 66% na concentração de 25 µg/mL e ainda, morte celular de 65% na maior concentração testada, 250 µg/mL. Os autores acreditam que a atividade antiproliferativa observada pode ser relacionada ao ácido ursólico e asperulosídeo presentes na planta, que possuem atividade anti-tumoral comprovada.

Estudo realizado com metal pesado em células K562 obteve resultados parecidos com os apresentados no presente estudo. Huang *et al.* (2008) expôs as células na presença de Cádmio (Cd) na concentração de 2 µM por 24 e 48 horas, o teste de MTT mostrou que houve proliferação celular de 83% e 92%, respectivamente. Isso ocorreu porque é sabido que o Cd pode iniciar a indução de pró-oncogenes e resultar na proliferação celular pela inibição da defesa antioxidante, por alteração das concentrações de espécies reativas de oxigênio em células e pela inibição da metilação do DNA para hipometilação (Takiguchi *et al.*, 2003 *apud* Huang *et al.,* 2008).

O teste de MTT realizado com o Sarcoma 180 demonstrou com os três experimentos independentes, em triplicatas, que para as concentrações testadas o

EBEfSp não foi citotóxico (Figura 3), não deferindo estatisticamente nas concentrações testadas entre as concentrações testadas e em relação ao controle negativo.

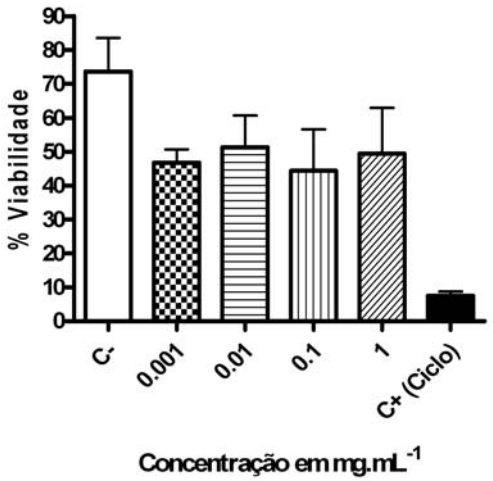


Figura 3. Viabilidade celular de células Sarcoma 180 após 24 horas de exposição ao tratamento com o EBEfSp pelo teste de MTT. A figura mostra à média e o desvio padrão dos tratamentos.

Estudos com plantas frente células de Sarcoma 180 apresentaram resultados mais satisfatórios que os obtidos pela planta *Spermacoce poaya.* O extrato bruto etanólico do caule da planta *Siolmatra brasiliensis* foi testado em diferentes concentrações em células de tumor ascístico mantidos na cavidade intraperitonial de camundongos Swiss, Sarcoma 180. Lima *et al.* (2006) demonstraram que houve citotoxicidade de 34% do extrato bruto dessa planta na concentração de 5 $mg.mL^{-1}$ em células de Sarcoma 180.

Florêncio *et al.* (2007) testou em concentração única o polissacarídeo da goma do cajueiro roxo*, Anacaradium occidentale,* em células de Sarcoma 180 mantidas na região peritoneal de camundongos. Os dados preliminares desse estudo mostraram que o polissacarídeo extraído da goma do cajueiro *Anacaradium occidentale* apresenta uma provável ação antitumoral in vivo, pois os animais tratados com o polissacarídeo na concentração de 100mg/Kg exibiram tumores com peso médio reduzido quando comparados ao grupo controle.

A planta *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) testada por Machado & Melo Júnior (2009) também apresentou efeito inibitório do crescimento tumoral frente o Sarcoma 180, reduzindo num percentual de 52.8% a massa tumoral.

O EBEfSp as células HFF-1, apresentou baixa a moderada citotoxicidade, inibindo em 42.48%; 12.96%; 21.48% e 21.27% o crescimento celular, nos tratamentos com as respectivas concentrações 0.001 $mg.mL^{-1}$, 0.01 $mg.mL^{-1}$, 0.1 $mg.mL^{-1}$ e 1 $mg.mL^{-1}$ (Figura 4). O controle positivo ciclosfosfamida apresentou uma citotoxicidade baixa quando comparada com a inibição perante as células K-562, 92.78%. A ciclofosfamida, um agente antineoplásico, tem propriedades alquilantes, complexando-se com o DNA, de forma indiscriminada entre as células normais e canceros (Valadares *et al*., 2007).

A inibição celular do controle positivo foi de 52.26%. Os tratamentos não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo, porém a concentração de 0.1 $mg.mL^{-1}$ apresentou diferença estatisticamente significante em relação ao controle negativo, $p<0.05$, e os tratamentos nas concentrações 0.01 $mg.mL^{-1}$ (12.96%) e 0.1 $mg.mL^{-1}$ (21.48%) mostraram-se estatisticamente diferentes com $p<0.05$. Apesar da Ciclofosfamida não ter expressado, numericamente, uma ação inibitória muito satisfatória, o teste estatístico indicou uma diferença significante de $p<0.05$ do controle negativo para com o controle positivo. Portanto, a ciclofosfamida e a concentração de 0.1 $mg.mL^{-1}$ exibiram atividade antiproliferativa perante células de fibroblasto.

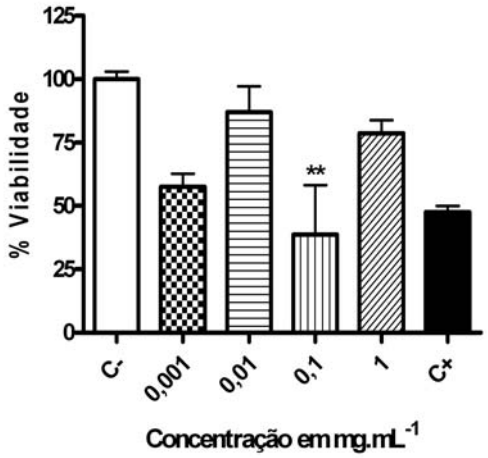


Figura 4. Viabilidade celular de células HFF-1 após 24 horas de exposição ao tratamento com o EBESp pelo teste de MTT. A figura mostra a média e o desvio padrão dos tratamentos. ** p< 0,01 em relação ao controle negativo.

Lima *et al.* (2006) em seus estudos com a *Siolmatra brasiliensis* (Cucurbitaceae) obtiveram resultados semelhantes aos apresentados nesse estudo. Macrófagos mantidos na cavidade intraperitonial de camundongos Swiss foram

tratados com o extrato etanólico da planta em diversas concentrações. O resultado obtido pelos autores mostraram que nas concentrações de 2.5 $mg.mL^{-1}$ e 5 $mg.mL^{-1}$ o extrato vegetal foi citotóxico em 46% e 36%, respectivamente.

Segundo Veiga Jr. *et al*. (2005) planta medicinal é um agente xenobiótico, ou seja, um composto estranho ao organismo humano, que apresenta produtos de biotransformação potencialmente tóxicos, assim não possuem somente efeitos imediatos e facilmente correlacionados com sua ingestão, mas também efeitos que se instalam em longo prazo e de forma assintomática, podendo levar a um quadro clínico severo, algumas vezes fatal.

É preocupante o resultando do presente estudo frente células de fibroblasto, pois diversas plantas com ação medicinal podem causar ação tóxica ao organismo. Morais *et al*. (2005) comprovou a ação cicatrizante, antibacteriana, antifúngica e antivirótica da babosa, *Aloe vera* (Liliaceae), pela presença de antraquinonas, porém em doses altas não dever ser usada por via oral, pois causa ação nefrotóxica pelo teor aumentado do seu principal príncipio ativo (Matos, 2000 *apud* Silveira *et al.* 2008). O jatobá, *Hymenaea courbail L*. (Fabaceae), assim como a *Spermacoce poaya* (Rubiaceae) é utilizada como expectorante, segundo Veiga Jr *et al.* (2005) doses elevadas dessa planta podem desencadear reações alérgicas.

Como exemplos de efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas Veiga Jr *et al.*(2005) citou os efeitos hepatotóxicos de apiol, safrol, lignanas e alcalóides pirrolizidínicos; a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contém terpenos e saponinas. Na literatura encontramos relatos de plantas contendo alcalóides pirrolizidínicos relacionado ao comprometido do fígado e danos hepáticos agudos, principalmente envolvendo plantas como a cavalinha (*Teucrium chamaedrys* L..), confrei (*Symphytum offi cinale* L.*),* valeriana (*Valeriana offi cinalis* L) (Seeff, 2007).

Outras plantas são potencialmente perigosas, destacando-se algumas da família Solanaceae. Apesar de menos citado que as espécies da família Solanaceae, o gênero *Palicourea*, talvez, seja o mais conhecido da família Rubiaceae por causar toxicidade. É sabido que *Palicourea marcgravii* é altamente tóxica para bovinos, mas sabe-se também que a *P. coriacea* utilizada com fins teurapêuticos, em pesquisa realizada com camundongo Swiss não apresentou toxicidade (Pereira *et al*., 2006).

Novos estudos devem ser realizados com a planta *Spermacoce poaya* para elucidar seus mecanismos de ação, afinal em células tumorais de leucemia mielóide e Sarcoma 180 seu efeito foi proliferativo, já em células normais o seu efeito foi citotóxico. Vale ressaltar que os estudos apresentados com as células HFF-1, fibroblasto, são preliminares referentes a um teste independente, em triplicata, de MTT. Contudo, isso não diminui nossa preocupação a respeito do uso dessa planta, já que pelo exposto na literatura altas concentrações são as responsáveis pela toxicidade da planta, e os resultados indicam que a concentração de 0.1 $mg.mL^{-1}$ é a mais expressiva na atividade antiproliferativa.

Portanto, o estudo da atividade citotóxica da planta *S.poaya* deve ser continuada tanto em outras linhagens tumorais, como em outras células humanas normais, mesmo porque encontramos, em maior número, relatados na literatura estudos com exposição superior a 24 horas. Além de estudos toxicológicos, faz necessário o estudo fitoquímico do gênero, em especial da espécie, para relacionar com os resultados obtidos *in vitro.* Pois se sabe que a planta em estudo pertence à subfamília Rubioideae, sendo essa caracterizada, basicamente, pela presença de antraquinonas, triterpenos, alcalóides e flavonóides (Bolzani *et al*., 2001).

5. CONCLUSÃO

O EBEfSp expressou atividade proliferativa, frente células tumorais de leucêmia mielóide crônica, K562, e tumor ascístico, Sarcoma 180; e atividade citotóxica perante células de fibroblasto do prépucio do pênis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.T.C.C. 2009. American Type Culture Collection. Disponível em <http://www.atcc.org>. Acesso em: 21 de maio 2009.

BALBACH, A., **A flora nacional na medicina doméstica**. São Paulo: Edições a edificação do lar. 18ª ed. 919p. 1984.

BOLZANI, V.S.; YONG, M.C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; SILVA, D.H.S. & LOPES, M.N. **Secondary Metabolites from Brazilian Rubiaceae**

Plant Species: Chemotaxonomical and biological significance. Recent Research Development in Phytochemistry. Vol. 5. p.19-31. 2001.

CABRAL, E.L. **Rehabilitación del gênero *Galianthe* (Rubiaceae)**. Boletin de la Sociedad Argentina de Botânica. Vol. 27. p. 217-231. 1991.

DELPRETE, P. G.; SMITH, L. B. & KLEIN, R. M. **Rubiáceas: flora ilustrada catarinense**. Santa Catarina: Herbário Barbosa Rodrigues. 344p. 2004.

DE MOURA, V. M.; SANTOS, D. P.; SANTIN, S.M. de O; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. **Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (Rubiaceae).** Química Nova, Vol. 29, p. 452-455. 2006.

FLORA BRASILIENSIS. 2009. Disponível em <http://florabrasiliensis.cria.org.br>. Acesso em: 15 de junho de 2009.

FLORÊNCIO, A.P.S.; MELO, J.H.L.; MOTA, C.R.F.C.; MELO-JÚNIOR, M.R.; ARAÚJO, R.V.S. **Estudo da atividade anti-tumoral do polissacarídeo (PJU) extraído de Anacardium occidentale frente a um modelo experimental do sarcoma 180.** Revista Eletrônica de Farmácia. Vol. IV (1). p. 61-65. 2007.

GORJÃO, R. Contagem de células. In: PERES, C. M. & CURI, R. **Como cultivar células**. Xed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 5, p. 22-24. 2005.

HUANG, D.; ZHANG, Y.; QI, Y.; CHEN, C.; JI, W. **Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium-stimulated K562 cell proliferation.** Toxicology Letters. Vol. 179. p.43-47. 2008.

KAREHED, J.; GROENINCKX, I; DESSEIN, S.; MOTLEY, T.J.; BREMER, B. **The phylogenetic utility of chloroplast and nuclear DNA markers and the phylogeny of the Rubiaceae tribe Spermacoceae**. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 49. p. 843–866. 2008.

LIMA, A. P, F. C. PEREIRA, C. A. S. T. VILANOVA-COSTA, A. S. B. B. RIBEIRO & E. P. SILVEIRA-LACERDA. **Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica da planta *Siolmatra brasiliensis*.** Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento. Vol. 3, p. 44-46. 2006.

MACHADO, M.C.F. DE P. & MELO-JUNIOR, M.R. **Avaliação do efeito antitumoral da *Kalanchoe brasiliensis sobre o sarcoma 180 em camundongos.*** Revista Eletrônica de Farmácia Vol 6(1). p. 1-6, 2009.

MACIEL, M.A.M; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F. E ECHEVARRIA, A. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** *Quimica Nova,* Vol. 25, Nº. 3, 429-438. 2002.

MELO, A.S. & BARBOSA, M.R.V. **O gênero *Borreria* G.Mey (Rubiaceae) na Mata do Buraquinho, João Pessoa, Paraíba**. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, Vol. 5(2). p. 627-629. 2007.

MORAIS, S.M.; DANTAS, J.D.P; SILVA, A.R.A.; MAGALHÃES, E.F. **Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará.** Revista Brasileira de Farmacognosia. Vol. 5(2). p. 169-177. 2005.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. Journal Immunological Methods. Vol. 65, p. 55-63. 1983.

NIÑO, J.; NARVÁEZ, D.M.; MOSQUERA, O.M.; CORREA, Y.M. **Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight ASTERACEAE and two RUBIACEAE plants from Colombian biodiversity.** Brazilian Journal of Microbiology. Vol. 37. p. 566-570. 2006.

PEIXOTO NETO, P.A. DE S.; SILVA, M.V.; CAMPOS, N.V.C.; CAETANO, Z.P.L.C. **Antibacterial activity of *Borreria verticillata* roots.** Fitoterapia. Vol. 73. p. 529–531. 2002.

PEREIRA, N.R; RIBEIRO, A.L.T.; BARBOSA, C.E.S.; KATO, L.; SILVEIRA-LACERDA, E.P. **Avaliação da toxicidade aguda de *Palicourea coriaceae* (CHAM) K. Schum em camundongo Swiss.** Revista Eletrônica de Farmácia. Vol. 5, Nº 2, p. 56-58. 2006.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Metagênese ambiental**. Ed. Ulbra. p. 215. 2003.

ROBBRECHT, E. **Tropical Woody Rubiaceae**. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. Opera Botanica Belgica. Vol. 1. p. 1-271. 1988.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D. & GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFSC/ Editora da UFRGS, p.679-705. 2003.

SEEFF, L.B. **Herbal hepatotoxicity**. Clinics in Liver Disease. Vol. 11. p. 577-596. 2007.

SILVEIRA, P.F., BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. **Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade.** Revista Brasileira de Farmacognosia. Vol. 8(4). p. 618-626. 2008.

SILVEIRA-LACERDA, E.P.; VILANOVA-COSTA, C.A.S.T.; PEREIRA, F.C. HAMAGUCHI, A.; PAVANIN, L.A.; GOURLART, L.R.; HOMSI-BANDEBURGO,M.I.; SOARES, A.M.; SANTOS, W.B.; NOMZO, A. **The ruthenium complex cis(dichloro) tetrammieruthenium (III) chloride presents immune stimulatory activity on human peripheral blood mononuclear cells**. Biological Trace Element Research. 2009.

STEYERMARK, J.A. 1972. ***Borreria* G.F. Meyer. The Botany of the Guayana Highland-part IX.** Memoirs of the New York Botanical Garden. Vol. 23. p. 805-831. 1972.

VALADARES, M.C.; CASTRO, N.C.; LUIZ CARLOS DA CUNHA, L.C. ***Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Vol. 43, Nº. 4, p. 631-638. 2007.

VEIGA JR, V.F. & MELLO, J.C.P. **As monografias sobre plantas medicinais.** Revista Brasileira de Farmacognosia. Vol. 18. p. 464-471. 2008.

VEIGA Jr, V.F.; MACIEL, M.A.M. & PINTO, A.C. **Plantas medicinais: Cura segura?** Química Nova. Vol. 28, Nº. 3, p. 519-528. 2005.

ÁREA DO CONHECIMENTO: ( ) EXATAS (x)HUMANAS ( )VIDA

Título do Projeto

GESTÃO DA PROPRIEDADE INTELECTUAL E DA INOVAÇÃO TECNOLÓGIA

Nome do Grupo de Pesquisa Cadastrado no Diretório de Grupos de Pesquisa do CNPq:

Estado, Governo e Sociedade

Orientador:

DR. NIVALDO DOS SANTOS

Unidade Acadêmica/Departamento:

FACULDADE DE DIREITO

PLANO DE TRABALHO

Edital PIBIC – UFG 2008

Título do Plano de Trabalho

ANÁLISE PRINCIPIOLÓGICA CONSTITUCIONAL DA PROPRIEDADE INTELECTUAL SOB A LUZ DO DIREITO PÚBLICO

Aluno

LUDMILLA EVELIN DE FARIA

Matrícula

052610

Resumo

Ao longo de sua história, o sistema de propriedade intelectual sofreu profundas modificações, motivadas, predominantemente, pela inserção de novas tecnologias e pela ânsia por proteção e garantia estatal. Em seu conceito originário, propriedade intelectual diz respeito ao conjunto de direitos concedidos pelo Estado àqueles que são inventores ou responsáveis por qualquer produção de origem intelectual. Assim, para que se tenha a existência da P.I. é imprescindível que haja: invenções, obras literárias e artísticas, símbolos, nomes, imagens, desenhos ou modelos utilizados pelo comércio. Os novos desafios, estabelecidos pela inserção de novas tecnologias à P.I., impõem a realização de novos questionamentos acerca das permissões, ou não, bem como do que pode ser objeto de apropriação, e caracterizado como monopólio legal temporário.

O estudo do sistema jurídico de proteção à propriedade intelectual torna-se cada vez mais importante ao passo que novos acordos e tratados internacionais, voltados à uniformização e à homogenização das regras e princípios de proteção da P.I, são ratificados. Eis, pois, que muito embora seja o Brasil um dos únicos países que se ocupou detidamente em contextualizar o fenômeno da propriedade intelectual em sua carta política, os demais países, produtos diretos da era global, estão preocupados também com os novos efeitos da P.I.

Nesse sentido, o presente estudo tem o escopo de analisar a dimensão principiológica da Propriedade Intelectual sob a luz do Direito Público. As grandes e céleres mudanças nessa área, como a gestão aberta, livre e compartilhada de conteúdos e informação tornou-se algo real e efetivo nesse meio. Matéria essa pouco discutida no meio acadêmico merece especial atenção não apenas daqueles que operam na área, mas de quaisquer outros grupos, que acreditam na difusão e sociabilização do conhecimento, e, que concebem a sua proteção como um instrumento de inclusão e de desenvolvimento econômico e sócio-cultural de um país. Tal análise justifica-se em função de interferências inovadoras e necessárias trazidas pela Propriedade Intelectual no mundo moderno, que atinge diversos campos do conhecimento, e alcança extraordinariamente a vida humana. Por fim, o estudo pretende sugerir um modelo que justifique a proteção à propriedade intelectual, que se insere no berço principiológico exposto na Constituição Federal de 1988, tendo-se em vista principalmente as novas demandas no cenário internacional, envolvidas por dilemas ligados à soberania estatal, bem como à territorialidade.

Pretende-se, pois, utilizar-se do arcabouço doutrinário nacional sobre a propriedade intelectual, com significativa observância ao Direito comparado, principalmente no que se refere às teorias principiológicas existentes, bem como na sistematização dos pontos comuns e divergentes das leis dos principais países que promoveram a elaboração dos tratados no final do século XIX, a fim de se chegar a conclusão de quais princípios merecem maior atenção dos operadores do direito face às constantes transformações globais.

1. INTRODUÇÃO

A propriedade intelectual foi pormenorizada e inserida de forma expressa em nosso texto constitucional. Tendo em vista a importância concedida a esse ramo do direito no ordenamento jurídico brasileiro, o presente estudo ocupa-se em analisar as bases constitucionais principiológicas desse intrigante e inovador ramo.

Posto isso, poder-se-á depreender que a propriedade intelectual, em tempos atuais, está arraigada de forma surpreendente, e quase natural, no cotidiano das pessoas, seja em sua relação com o Estado, seja com os demais membros da sociedade através das invenções de natureza intelectual.

A discussão acerca da base principiológica da P.I. torna-se cada vez mais importante, principalmente, quando se remete à crescente demanda de problemas advindos das novas tecnologias.

Além desse estudo específico, pretende-se ainda pontuar os documentos que historicamente contribuíram para a concepção do que se tem hoje sobre o tema Propriedade Intelectual. Nesse aspecto, será imprescindível ressaltar a importância da Convenção de Paris, de 1883, que deu origem ao hoje denominado Sistema Internacional da Propriedade Industrial. Dessa convenção, o Brasil foi um dos primeiros signatários. A CUP, assim como é chamada a Convenção de Paris, foi elaborada com o intuito de permitir razoável grau de flexibilidade às legislações nacionais, desde que fossem respeitados alguns princípios fundamentais, de observância obrigatória, constituindo assim, pelos países contratantes, os princípios gerais de proteção aos Direitos de Propriedade Industrial.

Em face de tais documentos que remontam a momentos peculiares, e de novos documentos assinados por aqueles que vêem a propriedade intelectual como um dos instrumentos do mundo moderno, pretende-se com a análise dos princípios constitucionais traçar os novos meios para a resolução de problemas que afetarão diretamente ao Direito de Propriedade Intelectual e chamarão à discussão princípios ligados ao Direito Internacional, inseridos em diversos documentos.

A par disso, analisar-se-á de que maneira pode o ordenamento jurídico pacificar e resolver conflitos e disparidades advindas da P.I., de forma a orientar os titulares de direitos a melhor forma de proceder quanto aos modos de comercialização, circulação, utilização e produção dos bens intelectuais ou dos produtos e serviços que incorporam e possam vir a incorporar as criações intelectuais.

2. Metodologia do Plano de Trabalho

O presente estudo possui como um dos métodos de abordagem o método dedutivo. Justifica-se a utilização do referido método, pois se preocupa esta análise em partir de concepções gerais para se chegar a idéias específicas e pormenorizadas.

De grande relevância para o bom êxito da pesquisa em comento, necessário será a utilização do método comparativo concomitantemente com o método acima citado. Justifica-se a utilização deste método, pois além do arcabouço doutrinário e da legislação nacional, restringido à Constituição e a Lei de Propriedade Industrial, serão analisados tópicos em obras e legislações estrangeiras, restritas ao objeto em comento. Utilizar-se-á da *internet,* a qual possibilita o acesso a materiais variados

Além dos referidos métodos, busca-se ainda uma análise histórica documental, no intuito de se melhor verificar as disparidades dos anseios passados em confronto com os atuais. Combinado com os anteriores, este método poderá diagnosticar acertadamente os anseios de épocas passadas, bem como os anseios que exsurgem das demandas atuais.

O trabalho será desenvolvido tanto em nível teórico como em nível prático, dividindo a pesquisa em partes: Primeiro, através de revisão bibliográfica a partir de obras que tratam sobre o tema, livros, periódicos, relatórios, teses, dissertações, artigos de jornais e revistas especializadas; e documental especialmente por materiais divulgados pela internet, legislação nacional e acordos internacionais. Segundo, por meio de atividades de campo, isto é, intercâmbio com outras instituições que tratam da matéria; visita a órgãos jurisdicionais; palestras aos outros acadêmicos pesquisadores acerca do tema em questão; troca de informações com *Experts* na área de P.I. no Brasil e no exterior; participação em eventos locais, regionais, nacionais e internacionais que tratem do tema.

3. Resultados Esperados na Execução do Plano de Trabalho

Pretende-se de maneira geral que o projeto alcance o objetivo de analisar a dimensão principiológica da Propriedade Intelectual sob a luz do Direito Público; pontuar as deficiências decorrentes de um má interpretação principiológica; e por fim, se chegar a conclusão de quais princípios merecem maior atenção dos operadores do direito face às constantes transformações globais, restringindo-se ao campo da Propriedade Intelectual.

De forma específica o projeto se dispõe a:

- Analisar o fundamento da interpretação principiológica;
- Analisar os princípios constitucionais que sejam adequados para atuarem junto às necessidades da Propriedade Intelectual;
- Difundir a importância da análise principiológica da Propriedade Intelectual, sob a luz do Direito Público.

6. Etapas e Cronograma de Execução do Plano de Trabalho

Atividades/ Mês	Agosto/08 - Outubro/08	Novembro/08 - Fevereiro/09	Março/09- Maio/09	Junho/09- Julho/09
Revisão Bibliográfica	X			
Análise e Implementação.		X		
Coleta de Dados			X	
Elaboração do Relatório Final				X

7. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, Marcus Elidius M. de. *Propriedade industrial frente à concorrência desleal*. In: SIMÃO FILHO, Adalberto, DE LUCCA, Adalberto. *Direito empresarial contemporâneo*. São Paulo: Juarez de Oliveira, 2000, p. 107-136.

BOGSCH, Arpad. *Brief history of the first 25 years of the world intellectual property organization*. WIPO, 1984.

CARMINATI, Antonella. *A aplicação do TRIPS na ordem jurídica interna*. Revista da ABPI, n. 17, 1995, p. 13-17.

DOMINGUES, Douglas Gabriel. *Direito industrial – patentes*. Rio de Janeiro: Companhia Editora Forense, 1980.

EMERICK, Maria Celeste. *O resultado das estratégias das instituições brasileiras*. In: *Proteção à tecnologia*. Pesquisa Fapesp, n. 50, jan./fev. 2000, p. 11-12.

GAMA CERQUEIRA, João da. *Tratado da propriedade industrial*. V. II. Tomo II, parte III. Rio de Janeiro: Forense, 1956.

LICKS, Otto B. *O acordo sobre aspectos dos direitos de propriedade intelectual relacionados ao comércio: anexo 1C ao acordo de Marraqueche constitutivo da organização mundial de comércio (OMC). A negocialização do trips e sua internacionalização*. In: *Guerra comercial ou integração mundial pelo comércio?*, CASELLA, Paulo Borba e MERCADANTE, Araminta de Azevedo (coords), 1ª edição, 1998, p. 607-649.

LAFER, Celso. *Comércio e relações internacionais*. São Paulo: Perspectiva, 1977.

_____. *Paradoxos e possibilidades – estudos sobre a ordem mundial e sobre a política exterior do Brasil num sistema internacional em transformação*. Rio de Janeiro: Nova fronteira, 1982.

NAZO, Georgete Nacarato. *A propriedade intelectual e o TRIPS*. In: *Guerra comercial ou integração mundial pelo comércio?*, CASELLA, Paulo Borba e MERCADANTE, Araminta de Azevedo (coords), 1ª edição, 1998, p. 650-659.

A Produção Acadêmica Sobre Professores: Estudo Interinstitucional da Região Centro-Oeste.

Bolsista: Gisselly V. Souza Delmond (PIBIC) e-mail: gsdelmond@gmail.com
Orientadora: Drª.Ruth Catarina C. R. de Souza e-mail: ruthcatarina@gmail.com

Faculdade de Educação-UFG

Palavras Chave: formação de professores, pesquisa interinstitucional, produção acadêmica, Centro Oeste.

O presente texto tem por objetivo apresentar a pesquisa A Produção acadêmica sobre professores um estudo interinstitucional da região centro oeste, a qual se desenvolve em parceria com sete universidades que buscam caracterizar regionalmente sua produção. Na UFG/FE essa pesquisa está inserida na linha de pesquisa Formação e Profissionalização docente. O subprojeto trabalhado na iniciação científica, tem o mesmo título e objetivos dessa pesquisa maior.

Com o merecido significativo destaque que vêm ocorrendo na atualidade "a formação e a atuação do professor estão entre os temas mais recorrentes da literatura educacional, não só brasileira, da atualidade" (SOUZA et alii, 2008, p.3).

Dessa forma procurando analisar suas respectivas produções que versam sobre o professor no período de 1999 a 2005, as universidades que compõem esse grupo que são: Universidade de Brasília (UNB), Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Universidade Federal de Goiás (UFG), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), e Universidade de Uberaba (Uniube), visam analisar os principais temas estudados, os referenciais teóricos, os métodos, tipos de pesquisa e procedimentos de pesquisa, a concepção de educação e de professor que os autores apresentam.

Este estudo é feito num esforço contribuir para a reflexão que busca superar a fragmentação da produção dos trabalhos em educação, e de criar condições de produzir sínteses dos conhecimentos capazes de ajudar a pensar essa problemática a partir da realidade regional, nacional e das suas articulações com a globalidade.

A pesquisa conta com um amplo numero de pesquisadores, e essa é mais uma das riquezas dessa pesquisa, na qual vários olhares e perspectivas diferentes constroem esse trabalho.

Em cada universidade, constituiu-se um grupo de pesquisa formado por professores pesquisadores, estudantes da pós-graduação e de iniciação científica. O trabalho cooperativo estabelecido permite formar novos pesquisadores por meio de uma participação efetiva dos estudantes de iniciação científica em todo o processo. A equipe UFG, conta com três professores pesquisadores, quatro bolsistas de graduação do programa de iniciação cientifica, dois monitores e dez (colaboradores alunos e ex-alunos do Programa de Pós-Graduação em Educação da FE/UFG).

A metodologia consiste na leitura integral das dissertações no intuito de se analisar os principais temas estudados, os referenciais teóricos, os métodos, os tipos e de procedimentos de pesquisa e o ideário pedagógico apresentado pelos autores. Estudos similares buscaram analisar as investigações sobre professores no Brasil (ANDRÉ et aliii, 1999; BRZEZINSKI e GARRIDO, 2001; LAROCA et allii, 2005; LISITA e PIMENTA, 2005), entretanto nenhum destes se propôs a ler as dissertações e teses na íntegra. A escolha desta metodologia vem em decorrência de verificarmos que, na sua maioria, as informações dos resumos não traduzem o trabalho desenvolvido pelos discentes e não fornecem elementos consistentes para a investigação.

Partiu-se nessa pesquisa do ano de 1999, dando complementaridade à análise do programa de pós-graduação da FE/UFG iniciado por Toschi et allii (2003), cuja pesquisa analisou a produção desde 1979, ano da primeira defesa, até o ano de 1998 classificando as dissertações conforme as categorias temáticas mais presentes: formação, profissionalização e prática docente.

A realização da pesquisa implicou selecionar as dissertações que em cada programa tratavam do tema professor. A escolha se deu por meio da leitura do título e do resumo, somando-se 72 na UFG, dentre as 156 defendidas no período de 1999 a 2005. Destas, 72 foram lidas e analisadas, isso após a reprodução de cópias de cada uma, na qual são mantidas num arquivo restrito aos pesquisadores participantes.

Após a reprodução, procedeu-se leitura integral das mesmas pelos pesquisadores e seqüente avaliação da produção segundo a Ficha de Análise elaborada identificando: a) os temas do texto (os aspectos em que o autor se detém); b) o

referencial teórico (o quadro teórico em que se insere o texto); c) o ideário pedagógico (concepção sobre professor e educação); d) tipo de pesquisa.

A tabulação foi feita posteriormente às discussões das fichas pelo grupo, que estão sendo armazenadas em banco de dados interinstitucional virtual, cujo acesso no presente momento da pesquisa tem sido restrito ao grupo.

Essa ficha foi discutida e reformulada pelos pesquisadores ao longo do processo quando houve necessidade de fazê-lo para que pudesse expressar o rigor e o aprofundamento dos estudos realizados pelas equipes. Essas reformulações eram discutidas e decididas em seminários do grupo interinstitucional, que foram sendo realizados a cada quatro meses. Os pesquisadores das diferentes instituições promoveram 14 seminários desde 2005 com o objetivo de estudar temas pertinentes à problemática da pesquisa, avaliar e redirecionar, quando necessário, os trabalhos.

Estes encontros também foram essenciais para a constituição do grupo, que apesar de todas as dificuldades financeiras de cada instituição hoje se consolida e se fortalece. Nos seminários aconteceram momentos de palestras, comunicações orais e workshop, e momentos de debates, reuniões e relatos sobre o andamento da pesquisa em cada programa. Planejou-se de forma que os programas revezassem na realização dos seminários, em forma de rodízio. Contudo além dos encontros nos seminários interinstitucionais, foi estabelecido o contato entre os membros do grupo através da Internet, possibilitando permanente diálogo entre todos. A formação do grupo interinstitucional exigiu um esforço de todos os integrantes e consideramos que foi o primeiro ganho desta pesquisa. A pesquisa conta atualmente no sítio da UFG, com um link de divulgação da PACOP[1], é possível ter acesso a textos em comum ao grupo, a fotos dos seminários interinstitucionais, além dos nomes e projetos dos participantes da pesquisa, sendo isso considerado pelo grupo como mais uma conquista da equipe.

Os estudantes de iniciação científica que participam da pesquisa têm procurado realizar as viagens necessárias para participar desses encontros/seminários e divulgar a pesquisa. Apesar de algumas dificuldades, foi realizado em Uberlândia, no dia 20 de abril de 2007, durante o oitavo seminário da pesquisa, o I Encontro dos Estudantes de Iniciação Científica da PACOP Foi um marco na ampliação da comunicação entre os alunos de graduação participantes de programas de iniciação

[1] PACOP é sigla que foi dada pelo CNPQ a pesquisa que significa pesquisa acadêmica do Centro-o Oeste sobre professores (PACOP).

científica e que desenvolvem subprojetos integrados a PACOP. O segundo Encontro foi realizado em Campo Grande na UFMS, e o terceiro na UFG durante o nosso décimo primeiro seminário da pesquisa no qual também foi aberto á participação de outros estudantes de iniciação cientifica participantes de outras pesquisas. Foi um importante passo para consolidar o grupo de estudantes da pesquisa, que propiciou um momento para troca de estudos e experiências, sobre o andamento da pesquisa, bem como reflexões coletivas acerca da importância da iniciação científica para a formação

A elaboração de um encontro envolvendo os bolsistas da Pesquisa *A produção acadêmica sobre professores: um estudo interinstitucional da Região Centro-Oeste* foi iniciativa de uma das estudantes participantes da pesquisa, e a cada encontro da pesquisa, ele tem se fortalecido, em razão desse rico momento de intercâmbio de experiências entre os bolsistas participantes da pesquisa, tanto no que diz respeito ao andamento dos subprojetos, como o próprio repensar acerca da pesquisa acadêmica e da formação proporcionada pela participação em programas de iniciação à pesquisa.

Tendo completada a primeira fase do trabalho e publicado seus resultados iniciais (publicados no Conpex de 2008) o grupo passou então a preencher as fichas de aprofundamento que abrange os seguintes aspectos: temas estudados, referencial teórico, tipos de pesquisa, método e concepções de educação e de professor. Decidiu-se que todos iriam preencher as fichas de aprofundamento de 20% de sua produção selecionada e que esses dados seriam socializados para que cada equipe pudesse fazer o aprofundamento de seu tema abarcando dados de todas as instituições participantes. Cada instituição participante ficou responsável pelo aprofundamento de uma categoria, a UFG ficou responsável pelo aprofundamento do Método.

Para a equipe da UFG esse trabalho iniciou-se com o estudo de vários textos referentes ao tema (FAZENDA, 2002; FREITAS, 2002; GATTI, 2002; LANE, 1984; LEGOFF, 2005; Sanfelice, 2005; SOUZA *et alii*, 2006a; 2006c; BOGDAN, BIKLEN, 1994; TRIVINOS, 1992; THIOLLENT, 1980). A partir das leituras e discussões destes e de outros textos, a equipe elaborou uma ficha que permitisse o aprofundamento das análises. É importante ressaltar que os alunos de iniciação cientifica, também realizam estudos não só com a equipe integrante, mas também em grupos de estudos semanais de estudantes de iniciação científica, no intuito de

introdução dos mesmos no processo rico e conflituosos que é a pesquisa em educação.

Essa ficha foi testada aplicando-a a diferentes dissertações por diferentes leitores. À medida que surgiam dificuldades ela foi sendo aperfeiçoada. Também foi apresentada a especialistas do método Materialismo Histórico Dialético, Fenomenológico e Positivista que deram novas sugestões para seu aperfeiçoamento. A cada alteração da ficha ela voltava a ser testada pelos diferentes leitores. Os participantes procuram exercitar a categoria da totalidade ao combinar análise e síntese, articulando o conhecimento com a realidade, seus determinantes e nexos internos.

Quando a equipe de pesquisadores da UFG sentiu que já tinha mais clareza dessa ficha ela foi enviada às demais equipes para sua análise e foi rediscutida em seminários, reescrita a partir de novas colaborações até que chegasse ao seu modelo atual que está sendo aplicada por todas as equipes.

Decidiu-se que todos iriam preencher as fichas de aprofundamento de 20% de sua produção e que esses dados seriam socializados para que cada equipe pudesse fazer o aprofundamento de seu tema abarcando dados de todas as instituições participantes.

Esse longo processo de construção da ficha de aprofundamento sobre método também ocorreu com as demais fichas das outras equipes.

O grupo interinstitucional está nessa etapa da pesquisa discutindo os dados obtidos após a aplicação das fichas de aprofundamento em 20% da produção selecionada, ou seja, em 11 trabalhos de 72 dissertações.

O resumo e a categorização dos textos foram armazenados através de um programa especial de processamento de dados, que permite a consulta para identificar os textos produzidos sobre a temática em cada ano ou período e, ainda, identificá-los segundo as categorias, inclusive a porcentagem de cada categoria. Portanto esse programa possibilitará, posteriormente, outras análises quantitativas e qualitativas sobre o tema.

Conforme as respostas às fichas de análise, as dissertações foram classificadas a partir de três categorias temáticas: formação, profissionalização e prática docente. A categoria temática mais estudada tem sido a formação com 5 de 11 trabalhos, seguidos das categorias profissionalização com 1 e prática docente também com 1 trabalho. Há também o que chamamos de temas articulados, que são os temas que

foram trabalhos juntos, ou relacionados, sendo que 2 trabalhos abordam os temas formação, profissionalização e prática docente, e ainda 2 trabalhos relacionam os temas formação e prática docente.

A equipe interinstitucional considera de suma importância revelar se e como o ideário pedagógico vem sendo trabalhado nos trabalhos do Centro-Oeste Pode-se observar após a primeira fase do trabalho que os autores das dissertações e teses sobre professores têm se preocupado em esclarecer a concepção que têm sobre a educação e sobre o professor (SOUZA et alii, 2006b; 2007).Nesta segunda fase a ficha de aprofundamento, considera algumas tendências para qualificar a concepção de educação e de professor, sendo elas a tradicional, a escolanovista, tecnicista, crítico reprodutivista, racionalidade técnica, tendência critica, e pós crítica. Foi observado a partir da ficha de aprofundamento que, 100% dos trabalhos adotavam a tendência crítica ao desenvolverem o idea´ri pedagógico, sendo que todos os 11 trabalhos respondiam quase plenamente as três primeiras categorias estabelecidas na tendência crítica.

A primeira fase do trabalho revelou que há uma "predominância de pesquisas empíricas na produção sobre o professor da Região Centro-Oeste, seguindo tendência constatada também por André *et alii* (1999), Brzezinski e Garrido (2001) e Toschi *et alii* (2003)" (SOUZA et alii, 2008). Na UFG, o aprofundamento do estudo mostrou que das 11 dissertações 9 são empíricas e 2 teóricas, e quanto aos tipos de pesquisa que o estudo de caso continua a predominar, como já havia sido notado na primeira etapa, com 7 trabalhos evidenciados,

Em relação aos referenciais teóricos na UFG, segundo análise de sua produção (SOUZA *et alii*, 2006a; 2007) destacam-se como principais teóricos utilizados: Karl Marx, Antonio Gramsci, Paulo Freire, Gaudêncio Frigotto, José Carlos Libâneo e Ricardo Antunes. Outras informações contidas nas fichas esclarecem os resultados da análise dos referenciais teóricos,. A ficha também aponta dados sobre quais autores foram utilizados para fundamentar cada tema abordado, bem como sobre as obras consultadas, o ano de suas publicações e ainda a apropriação que os pós-graduandos têm feito das idéias desses autores.

A ficha de aprofundamento elaborada a partir dos dados obtidos na primeira ficha de análise contempla três grandes métodos: Materialismo-Histórico-Dialético, Fenomenológico, Positivista.Analisando o método de pesquisa na UFG tema de aprofundamento da equipe dessa instituição, o que tem maior percentual é o método

Materialismo Histórico Dialético, sendo identificado em 10 das dissertações, enquanto que o Fenomenológico não aparece, e o Positivista foi identificado em 1 das 11 dissertações.

A análise da equipe UFG, foi bastante criteriosa, sendo que a ficha de aprofundamento, no tema Método e mais especificamente no Materialismo Histórico Dialético tem 7 categorias algo que nos chamou mais atenção, é o fato que das 10 dissertações identificadas neste tema, apenas as 3 primeiras categorias foram contempladas plenamente.

Todas as informações construídas nesta investigação, tem conduzido o grupo de pesquisadores a refletir sobre a historia dos programas de pós-graduação, dos mestrandos, dos professores orientadores, pois para todos não se pode secundarizar a influência desta contextualização nos referidos trabalhos.

Segundo Gatti (2001) o aprimoramento metodológico da produção tem início apenas em meados da década de 70, em decorrência da expansão dos cursos de mestrado e doutorado. As fragilidades que Gatti (2001, p. 75) tem encontrado ao examinar as pesquisas educacionais no país levam-na a questionar "se há um domínio consistente de métodos e técnicas de investigação, qualquer que seja a abordagem em que o pesquisador se situa". Na continuidade da pesquisa, juntamo-nos às interrogações de Gatti (2001) sobre a questão do método, mas, ainda, questionamos se algumas das características que temos encontrado poderiam estar refletindo mudanças no paradigma de conhecimento, ou ainda, se seriam apontamentos de novas formas de fazer ciência dados os objetos de uma temporalidade transitória.

No próximo semestre iremos relacionar os dados da UFG com os dados das outras instituições, tais resultados serão posteriormente publicados.

O envolvimento dos membros do grupo no estudo e aperfeiçoamento dos instrumentos utilizados na PACOP foi exemplar na construção dessa pesquisa. Todos que participaram do processo professores, alunos da pós-graduação, e do programa de iniciação científica declaram a riqueza de sua aprendizagem.

Podemos dizer que a prioridade dessa pesquisa tem se situado na dinâmica do processo e que temos incorporado no nosso fazer a concepção de Rogoff (1998, p. 123) para quem "o processo é o produto", isso significa colocar a ênfase nas mudanças contidas em nossas atividades comuns. A idéia chave dessa concepção é que participando das atividades planejadas no processo da pesquisa em curso, todos nós, alunos e professores compartilhamos seus significados. Através de

nossos esforços e de nossas ações para compreender os diferentes desafios que nos são colocados nessa investigação todos aportam, de maneira contínua, sua contribuição. Nesse sentido a participação de todos e de cada um que desenvolve esse projeto pode ser considerado, em si mesmo, como o processo de apropriação que nos tem colocado no papel de parceiros.

Fichas de aprofundamento do tema Método:

MÉTODO MATERIALISMO-HISTÓRICO-DIALÉTICO	SIM	NÃO	OBSERVAÇÕES
1. Aborda o objeto na perspectiva histórica, a partir de suas origens.			
2. Busca na história as origens do problema, do todo e não de tudo.			
3. Trabalha com os sujeitos típicos a serem pesquisados.			
4. Concreto pensado: evidencia o objeto que estava oculto, movimento dialético.			
5. Utiliza categorias para análise: trabalho, alienação, ideologia, classe social, contradição, negação, totalidade, universalidade.			
6. Articula teoria e prática e a denomina práxis.			
7. Apresentação dos dados evidenciando seus nexos internos e contraditórios com a totalidade. Na análise apresenta o método de investigação e método de exposição.			
Teóricos: Marx; Gramsci; Adorno; Marcuse; Mészáros; Saviani; Frigotto.			
Referencial utilizado:			

MÉTODO FENOMENOLÓGICO	SIM	NÃO	OBSERVAÇÕES
1. Orienta o olhar para o fenômeno, para o "ser-no-mundo".			
2. Enfatiza a descrição densa e exaustiva do fenômeno e seus significados.			
3. Norteia-se pelo círculo hermenêutico (compreensão, interpretação e nova compreensão).			
4. A investigação é direcionada para compreender e desvelar o fenômeno.			
5. Epoché: suspensão de crenças, pré-conceitos e teorias a respeito do mundo e da existência.			
1. O quadro referencial é flexível e é direcionado pela/para compreensão do fenômeno .			
7. Reflexão exploratória e contínua: característica do inacabado, admitindo novas interpretações.			

Teóricos: Husserl; Heidegger; Merleau-Ponty; Jaspers; Paul Ricoeur; Bachelard; Joel Martins; Maria Aparecida Bicudo; Vitória Espósito;			
Referencial utilizado:			

MÉTODO POSITIVISTA	SIM	NÃO	O
1. Concebe a realidade como uma propriedade do mundo empírico e não do observador, independente do sujeito.			
2. Segue o paradigma hipotético-dedutivo: hipóteses que são testadas por meio de experimentos ou análises estatísticas			
3. Busca fatos ou causas de um objeto, dando pouca importância aos aspectos subjetivos dos indivíduos.			
4. Mensura sistemática e estatisticamente as relações entre variáveis.			
5. A análise dos dados é feita numa relação linear de causa-efeito			
6. Considera os aspectos contextuais, no entanto não os prioriza na análise;u)o site de dados: ver um modo de que todos envolvidos tenham acesso aos dados (todas as instituições); uniformizar as fichas no banco de dados			
Teóricos: Durkheim; Skinner; Parkson; Raymond Boudon			
Referencial utilizado:			

REFERÊNCIAS:

ANDRÉ, Marli. et allii Estado da arte na formação de professores no Brasil: In: Educação & Sociedade, ano XX, nº. 68/ especial. Campinas/SP: CEDES, dez, 1999.

BRZEZINSKI, Iria.; GARRIDO, Elsa. Análise dos trabalhos do GT Formação de professores: o que revelam as pesquisas do período 1992-1998. In: Revista Brasileira de Educação, nº. 18. Rio de Janeiro: Anped, Campinas: Ed. Associados, set/ out/nov/dez, 2001.

BOGDAN, R. C. e BIKLEN, S. K. *Investigação Qualitativa em Educação*. Portugal: Porto Editora, 1994.

FAZENDA, Ivani. *Metodologia da pesquisa educacional*. 8ª edição,SPaulo, Cortez, 2002.

FREITAS, Maria Teresa de Assunção. A abordagem sócio-histórica como orientadora da pesquisa qualitativa. *In: Cadernos de Pesquisa*, nº. 116, jul./ 2002, p. 21-39.

GATTI, Bernadete A. A Construção da Pesquisa em Educação no Brasil. Brasília: Plano Editora 2002.

LAROCCA, P. ; ROSSO, A. J. & SOUZA, P. de A formulação dos objetivos de pesquisa na pós-graduação em Educação: uma discussão necessária. *In*: *Revista Brasileira de Pós-Graduação*, v. 2, n.º 3. p118-133, mar., 2005.

LANE, S. *Psicologia Social*: O homem e em movimento. S. Paulo, Ed Brasiliense, 1984.

LE GOFF, Jacques. *A História Nova*. São Paulo: Martins Fontes, 2005.

LISITA, Verbena M. S. de S.; PIMENTA, Selma G. Pesquisas sobre professores e sua formação – uma análise de pesquisas desenvolvidas no programa de pós-graduação da FE/USP de 1990 a 1998. Anais do XII ENDIPE, Curitiba-PR, 2004.

LÜDKE, Menga; ANDRÉ, Marli. Pesquisa em educação: abordagens qualitativas. São Paulo: EPU, 1986.

TOSCHI, Mirza S et aliii. O estado do conhecimento do professor na região centro-oeste. Anais do VI EPECO, 2003.

TRIVINOS, A. N. S. *Introdução a Pesquisa em Ciências Sociais*: a pesquisa qualitativa em educação. 1 a. edição. São Paulo: Atlas, 1992.

THIOLLENT, M. J. M. *Crítica Metodológica*, investigação social e enquête operária. São Paulo: Polis, 1980.

SanFelice, J.L. Dialética e Pesquisa em Educação. *In* Lombardi, j.C. e Saviani D. (orgs) *Marxismo e educação*: debates contemporâneos . Campinas, SP, autores Associados, 2005.

Souza, Ruth Catarina C. R. de; GUIMARÃES, Valter S., MAGALHÃES, Solange M.de O. A PRODUÇÃO SOBRE O PROFESSOR NO CENTRO-OESTE - um estudo interinstitucional. Campo Grande-MS. INTERMEIO - Revista do Programa de Pós-Graduação em Educação, 2008.

_____ A produção acadêmica sobre professores:estudo interinstitucional da Região Centro-Oeste. *In*: *Anais do VIII encontro de pesquisa em educação da Região Centro-Oeste*. Ética educação e Democracia. Cuiabá, 2006.

Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da ceftazidima livre e encapsulada em lipossomas unilamelares frente à cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a esse antimicrobiano.

Etyene Barbosa Bento[a], Luísa Zaiden Carvalho Martins de Sá[a], Ieda Maria Sapateiro Torres[a]

[a]Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-Go, Brasil

email: etybento@gmail.com , luisa_zaiden@hotmail.com, ieda.mst@uol.com.br

Palavras-chave: antimicrobiano, resistência bacteriana, lipossomas

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno gram-negativo oportunista que pode causar sérias infecções nosocomiais e que tem causado sérias doenças em vários pacientes debilitados, especialmente naqueles com feridas, queimaduras, transplantados de órgãos e doenças respiratórias, incluindo fibrose cística. A taxa de mortalidade por sepse provocada por *P. aeruginosa* é alta e excede a taxa de mortalidade de todos os outros microrganismos gram-negativos (OMRI, SUNTRES, SHEK, 2002).

Bactérias gram-negativas, como a *P. aeruginosa,* apresentam muita resistência a antimicrobianos, seja essa resistência de caráter mutacional ou adaptativo. O desenvolvimento de resistência torna bastante complicado o tratamento das infecções causadas por essas bactérias (ALIPOUR et al. 2007). A emergência de resistência bacteriana é resultante de complexos fatores inter-relacionados. Na *P. aeruginosa,* a inativação de antibióticos β-lactâmicos, como por exemplo, a cefepima, é mediada por enzimas β-lactamases e cefalosporinases que destroem a integridade estrutural desses agentes, tornando-os inefetivos. Além disso, alterações na permeabilidade da membrana externa e sistemas de efluxo podem inibir a atividade desses antibióticos e drasticamente diminuir a suscetibilidade antibiótica (ONG et al. 2007).

Considerando-se a importância da barreira de penetração na resistência antibiótica na bactéria, o desenvolvimento de sistemas coloidais de liberação controlada de fármacos é de grande importância. A efetividade de alguns agentes antimicrobianos pode ser aumentada pela incorporação dos mesmos dentro de formulações lipossomais. A encapsulação de fármacos em lipossomas é um efetivo método para reduzir sua toxicidade, prolongando seu tempo de circulação depois de administração intravenosa e aumentando a acúmulo do fármaco no sítio da doença, garantindo assim a efetividade destes antibióticos, não somente nos tratamentos de cepas não resistentes, mas também contribuindo para superar a resistência bacteriana (BEAULAC, SACHETELLI, LAGACE, 1998; MAURER et al. 1998; ELLBOGEN et al. 2003).

Várias formas lipossomais de fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e polimixinas B demonstraram redução na concentração inibitória mínima (CIM) em comparação com o fármaco livre contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DRULIS-KAWA et al. 2006). A função desses transportadores é aumentar o potencial terapêutico de um fármaco, impedindo que esse se perca no trajeto para um alvo específico, evitando simultaneamente a ocorrência de efeitos secundários nocivos em outra parte do organismo (SANTOS, CASTANHO, 2002).

2 OBJETIVOS

Obtenção e caracterização de lipossomas contendo ceftazidima, visando investigar a ação do antimicrobiano livre e encapsulado em lipossomas sobre a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) frente à cepa de *P. aeruginosa* resistentes a esses antimicrobianos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produtos Químicos

Ceftazidima foi obtida de ADVAN PHARMA CHEM CO.,LTD, China, lote 6117CJ81J-A, fosfatidilcolina de soja foi obtida de Lipoid, Gmb; colesterol de Avanti Polar Lipids , acetato de tocoferol foi obtido de Sigma, cloreto de sódio PA, lote

0605957 da Vetec, clorofórmio PA, lote 27630 da Quimex, álcool etílico, lote 0603300 da Vetec, cloreto de trifenil tetrazolium da Vetec.

3.2 Microrganismo

Pseudomonas aeruginosa SPM-1 foi adquirida do Instituto Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil. Este microrganismo foi estocado a -20°C em caldo trypticase soy broth (Difco), suplementado com 10% (v/v) de glicerina até o uso. Para o experimento, este microrganismo foi inoculado em Trypticase Soy Agar inclinado e incubado por 24 h a 37°C.

3.3 Preparação de lipossomas com ceftazidima (BANGHAM et al. 1965).

Lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico. Resumidamente, 40 mM de Fosfatidilcolina de soja (PC), 20 mM de colesterol (Chol) e 0,04 mM de alfa-tocoferol foram dissolvidos em 2 mL de clorofórmio. O clorofórmio foi evaporado sob atmosfera de Nitrogênio, levando á obtenção de um filme lipídico fino na base do frasco. O filme lipídico foi hidratado com 8 mL de uma solução de ceftazidima (37,66 mg/mL em cloreto de sódio 0,9%). A dispersão coloidal de lipossomas foi sonicada por 12 minutos (Processador Ultrassônico - Misonix, Modelo XL 2020), para obtenção de lipossomas unilamelares. A determinação do tamanho dos lipossomas foi realizada empregando-se a técnica de espalhamento de luz, utilizando-se equipamento ZetaSizer Nano S (Malvern Instruments, Ltd. Malvern UK). O fármaco não encapsulado foi separado por ultracentrifugação a 50.000 rpm, por uma hora e meia e a 4°C. Antes de ser levada a ultracentrífuga, a preparação de lipossomas foi diluída na proporção 1:1 com solução de NaCl 0,9%. Após a ultracentrifugação, os pellets de lipossomas foram ressuspendidos em 1 mL de solução de NaCl 0,9%. O sobrenadante contendo o fármaco livre foi reservado para a sua quantificação, com base na curva de calibração.

3.4 Determinação da eficiência de encapsulação da ceftazidima em lipossomas unilamelares.

A eficiência de encapsulação (expressa em porcentagem) foi calculada dividindo-se a concentração encontrada de ceftazidima nos lipossomas pela concentração de ceftazidima livre, usada na preparação destes lipossomas.

A quantificação da ceftazidima encapsulada foi feita pela técnica de espectrofotometria utilizando-se Espectrofotômetro Ultravioleta-Visível (UV-VIS), marca Varian, modelo Cary 50, sendo que os cálculos foram efetuados com base na curva padrão preparada com ceftazidima padrão Ph. Eur. CRS (*Official Chemical Reference Standard Ceftazidime* - Lot n°1b – *European Pharmacopoeia Chemical Reference Substance*). A leitura da amostra foi realizada após o rompimento de 10 µL de lipossomas com 7 mL de etanol para liberar o fármaco encapsulado.

3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (RUKHOLM et al. 2006)

3.5.1 Preparação e padronização do inóculo

As cepas de *P. aeruginosa* SPM-1 foram repicadas em Trypticase Soy Agar inclinado e incubadas a 35ºC por 24 horas. Algumas colônias, desenvolvidas no ágar foram transferidas para salina estéril até a obtenção de uma turbidez óptica comparável à metade da escala 1,0 de McFarland, as quais foram observadas contra um papel de fundo branco. A fim de se verificar que a concentração final do inóculo obtida rotineiramente no teste de macrodiluição em caldo era de $5x10^{-7}$ UFC/mL, foram realizadas a cada ensaio, a partir da suspensão padronizada, diluições seriadas até a 10^{-7}, as quais foram semeadas e enumeradas pela técnica de semeadura em profundidade, utilizando-se o Trypticase Soy Agar, com incubação a 35ºC por 24 horas.

3.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

A atividade antimicrobiana de ceftazidima encapsulada em lipossomas foi determinada em comparação com o fármaco livre pela determinação da CIM frente à cepa de *P. aeruginosa* SPM1. Os testes da CIM foram realizados pelo método de

macrodiluição em caldo, como recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Diluições seriadas da ceftazidima livre (4096, 2048, 1024, 512, 256 e 128 µg/mL) e da ceftazidima encapsulada em lipossomas (4096, 2048, 1024, 512, 256 µg/mL) foram preparadas em caldo Mueller-Hinton. Imediatamente após a preparação, 1 mL de cada diluição acima foi inoculada com 1 mL da suspensão bacteriana para obter um inóculo final de 5 x 10^5 UFC/mL. Os tubos foram incubados por 18 a 24 horas a 35°C. A CIM para a ceftazidima livre como para a ceftazidima encapsulada em lipossomas unilamelares foi a mais baixa concentração de ceftazidima a qual nenhum crescimento visível a olho nu foi detectado depois de 18 a 24 horas. Controles positivos consistiram da bactéria no meio de cultura. Controles negativos (esterilidade) consistiram de meio não inoculado. Cada ensaio foi repetido três vezes e em três diferentes dias para garantir a reprodutibilidade dos testes.

3.5.3 Incubação dos tubos e interpretação dos resultados

Os tubos foram incubados a 35ºC por 18 a 24 horas. Decorrido este intervalo de tempo foi acrescentado a cada um dos tubos 500 µL de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifenil tetrazolium; VETEC) a 0,5% e os tubos foram novamente incubados por mais uma hora a 35ºC (AYRES et al. 2008). Após esta última incubação a presença de uma coloração vermelha nos tubos foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório da ceftazidima, enquanto a ausência da coloração vermelha foi considerada prova positiva da ação inibitória da ceftazidima.

3.5.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).

A determinação da CBM foi realizada também pelo método de macrodiluição em caldo. Resumidamente, culturas overnight de *P. aeruginosa* SPM1 em um inóculo final de cerca de 5 x 10^5 foram incubados com a ceftazidima livre e com a ceftazidima encapsulada em lipossomas unilamelares a um, dois e quatro vezes suas respectivas CIMs. Tubos controle não continham antibiótico. Os tubos foram incubados a 37°C por 2, 18 e 24 horas. Ao final de cada período, diluições decimais seriadas foram preparadas em solução salina estéril a 0,9% e 1 mL destas diluições

foram semeadas em placas de Trypticase Soy Agar em triplicata. As UFC de cada diluição nos tempos determinados foram contadas depois de 18 horas. Placas com 30–300 colônias foram utilizadas para as contagens. A CBM considerada foi a mais baixa concentração da ceftazidima livre ou encapsulada em lipossomas unilamelares que promoveu a redução de 99,9% do inóculo inicial adicionado. Cada ensaio foi repetido três vezes e em três diferentes dias para garantir a reprodutibilidade dos testes.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação dos Parâmetros Analíticos para a Ceftazidima

4.1.1 Determinação da curva de calibração da ceftazidima por espectrofotometria

Após a leitura das soluções de padrão primário de ceftazidima (Ph. Eur. CRS), realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 254 nm, obteve-se pela regressão linear da curva o coeficiente de correlação de 0,9993 (Figura 1), expressa pela equação:

$$y = 40{,}818 \times \text{concentração} + 0{,}0114$$

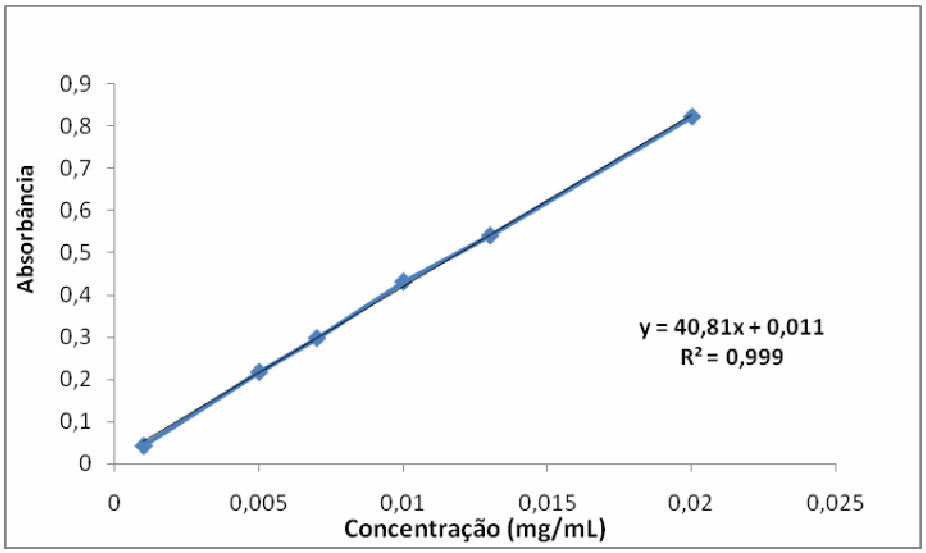


Figura 1: Curva de calibração da ceftazidima padrão USP em NaCl a 0,9% por espectrofotometria

4.2 Cálculo da Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação da ceftazidima em lipossomas compostos de PC:Chol nas concentrações de 2:1 foi de 2,52% e a capacidade de encapsulação foi estimada ser de 7,6 mg de ceftazidima/mL e de 0,034 mg ceftazidima/mg de PC. Os tamanhos dos lipossomas apresentaram diâmetro médio de 228nm e o índice de polidispersibilidade de 0,591.

A determinação da quantidade de fármaco associada às nanopartículas é especialmente complexa devido ao tamanho reduzido destas, que dificulta a separação da fração de fármaco livre da fração associada. Uma técnica de separação bastante utilizada é a ultracentrifugação, na qual a concentração de fármaco livre, presente na suspensão, é determinada no sobrenadante, após a centrifugação (SCHAFFAZICK et al. 2003).

4.3. Atividade Antimicrobiana da Ceftazidima Livre e Encapsulada em Lipossomas Unilamelares

Os valores do CIM para a ceftazidima encapsulada em lipossomas unilamelares para a cepa de *P. aeruginosa* SPM1 foi de 512 µg/mL ao passo que para a ceftazidima livre foi de 1024 µg/mL. Estes resultados demonstram que a cepa de *P. aeruginosa* SPM-1 é resistente ao antimicrobiano testado de acordo com o NCCLS M7 -A6 (Methods for Diluition Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition).

4.4 Determinação da CBM da Ceftazidima Livre e Encapsulada em Lipossomas Unilamelares

A determinação da CBM foi realizada em um período de 24 horas com a bactéria (*P. aeruginosa* SPM1) sendo exposta a 1, 2 e 4 vezes a sua CIM da ceftazidima livre ou encapsulada em lipossomas unilamelares. As Tabelas 1 e 2 nos mostram respectivamente a porcentagem de redução da *P. aeruginosa* SPM1 frente ao fármaco livre e encapsulado em lipossomas, levando-se em consideração a concentração e o tempo de contato com a ceftazidima.

Tabela 1: Parâmetros de redução do número de UFC frente às concentrações de 4096, 2048 e 1024 µg/mL de ceftazidima livre, nos intervalos de tempos de 0, 2, 18 e 24 horas de incubação.

Concentração de Ceftazidima Livre(µg/mL)						
Tempo (horas)	1024		2048		4096	
	Contagem de UFC	Redução (%)	Contagem de UFC	Redução (%)	Contagem de UFC	Redução (%)
0	$2,79x10^6$	-	$2,79x10^6$	-	$2,79x10^6$	-
2	$1,85x10^5$	93,37%	$2,4x10^5$	91,39%	$8,0x10^4$	97,13%
18	$2,45x10^3$	99,91%	$7,25x10^2$	99,97%	$2,5x10^2$	99,99%
24	$3,43x10^4$	98,76%	$1,5x10^2$	99,99%	0	100%

Tabela 2: Parâmetros de redução do número de UFC frente às concentrações de 2048, 1024 e 512 µg/mL de Ceftazidima encapsulada em lipossomas,nos intervalos de tempos de 0, 2, 18 e 24 horas de incubação.

Concentração de Ceftazidima encapsulada em lipossomas(µg/mL)						
Tempo (horas)	512		1024		2048	
	Contagem de UFC	Redução (%)	Contagem de UFC	Redução (%)	Contagem de UFC	Redução (%)
0	$5,8x10^6$	-	$5,8x10^6$	-	$2,79x10^6$	-
2	$5,0x10^4$	99,13%	$4,65x10^4$	99,19%	$6,5x10^4$	97,67%
18	$1,58x10^4$	99,72%	$1,0x10^4$	99,82%	$3,57x10^3$	99,87%
24	$6,79x10^4$	98,8%	$2,6x10^3$	99,95%	$2,77x10^3$	99,90%

A ceftazidima livre conseguiu eliminar 99,9% dos microrganismos inoculados com 1 x MIC (1024 µg/mL) em 18 horas. Entretanto esta concentração não conseguiu manter esta porcentagem de eliminação, havendo recuperação dos microrganismos em 24 horas de contato. A redução de 99,9% dos microrganismos

inoculados só foi mantida nas 24 horas de contato com a concentração de ceftazidima livre de 2 x CIM (2048 µg/mL).

A ceftazidima encapsulada em lipossomas unilamelares mostrou-se mais efetiva ao reduzir 99,9% do inoculo com 1024 µg/mL em 24 horas de contato. Além disto, na forma encapsulada não houve recuperação bacteriana em nenhuma das concentrações utilizadas e em nenhum dos tempos de incubação. Esses resultados demonstraram uma redução de 50% da CBM, indicando a potencialização da atividade antibacteriana da ceftazidima encapsulada.

5 DISCUSSÃO

Bacilos Gram-negativos não fermentadores como a *P. aeruginosa* tem se tornado um importante patógeno oportunista envolvido em sérias infecções adquiridas em hospitais, principalmente em pneumonias nosocomiais, especialmente em pacientes confinados em Unidades de Terapia Intensiva. O controle destas pneumonias nosocomiais para este patógeno representa um desafio terapêutico devido a um aumento dos níveis de resistência deste microrganismo para a maioria das classes dos agentes antimicrobianos (OMRI, SUNTRES, SHEK, 2002).

A encapsulação das ceftazidima em lipossomas unilamelares mostrou um efetivo aumento na atividade antibacteriana quando comparada com a ceftazidima livre, como indicado pelo seu CIM de 512 µg/mL. Esta redução de 50% da concentração inibitória mínima da ceftazidima encapsulada em lipossomas unilamelares provavelmente se deva à fusão da membrana lipossomal com a membrana externa das bactérias Gram-negativas, aumentando o aporte intracelular do fármaco, ou ainda reduzindo a capacidade do microrganismo em utilizar seus mecanismos de resistência (BEAULAC, SACHETELLI, LAGACE, 1998). Nossos dados vêm ao encontro dos resultados publicados por Rukholm et al. (2006), e por Mugabe, Azghani, Omri, (2005), onde também demonstraram significativa redução na CIM de antibióticos encapsulados em lipossomas.

No trabalho realizado por Rukholm et al. (2006), os lipossomas de gentamicina preparados com diferentes composições lipídicas de 1,2-dipalmitoil-*sn*-

glycero-3-fosfatidilcolina (DPPC) e 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) e 1,2-distearoil-*sn*-glycero-3-fosfatidilcolina (DSPC) e colesterol na média molar de 2:1 mostraram significante diminuição da CIM variando entre 2 e 256 vezes frente a todas as cepas resistentes mucóides e não mucóides de *P. aeruginosa* testadas (2 de isolamento clínico e 1 cepa de laboratório). Estas formulações aumentaram a susceptibilidade destes microrganismos passando-os de altamente resistentes a resistentes intermediários ou susceptíveis. Outro trabalho, também com lipossomas de gentamicina preparados com DMPC/colesterol na média molar de 2:1, mostraram reduções da CIM em 2, 4 e 16 vezes contra cepas de *P. aeruginosa* (1 cepa de laboratório e duas cepas clínicas). Por outro lado não houve significante diferença entre os valores da CIM e da CBM para cada cepa testada levando-se em consideração a formulação antibiótica, uma vez que a CBM foi igual ou 2 vezes a CIM (MUGABE, AZGHANI, OMRI, 2005).

Reduções na CIM também foram encontradas ao encapsularem amicacina, netilmicina e tobramicina em lipossomas compostos de fosfatidilcolina de ovo e colesterol na proporção molar de 7:1. Os resultados encontrados quando se encapsularam amicacina foi de redução de 4 vezes a CIM para o *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922 e em 8 vezes para o *Streptococcus faecalis* ATCC 29 212, ao passo que ao testarem estes lipossomas contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 obtiveram uma diminuição da sensibilidade em 8 vezes. Com os lipossomas de netilmicina conseguiram a redução da concentração inibitória mínima quando comparados com o fármaco livre em 2 vezes para a *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922 e para uma cepa clínica de *Xanthomonas Maltophilia*; em 8 vezes para outra cepa clínica de *X. maltophilia* e de 16 vezes para o *S. faecalis* ATCC 29212, sendo que frente ao *S. aureus* ATCC 29213 obtiveram um aumento da CIM em 2 vezes. A tobramicina encapsulada nestes lipossomas apresentou uma redução da CIM em duas vezes frente às três cepas clínicas de *X. maltophilia* e do *S. faecalis* ATCC 29212 e um aumento da sensibilidade em 2, 4 e 8 vezes a sua CIM, respectivamente frente à *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (OMRI, RAVAOARINORO, 1996).

A concentração bactericida mínima da ceftazidima encapsulada em lipossomas unilamelares também apresentou redução de 50% (1024 µg/mL) em

relação ao fármaco livre no tempo de 24 horas, enquanto a ceftazidima livre apresentou efeito bactericida na concentração de 2048 µg/mL no tempo de 18 horas. Entretanto, como mostrado nas Tabelas 1 e 2, na forma encapsulada não houve recuperação bacteriana em nenhuma das concentrações utilizadas e em nenhum dos tempos de incubação, indicando a prolongada atividade antibacteriana da ceftazidima encapsulada em lipossomas. Estes dados vem ao encontro dos resultados de outros pesquisadores onde as curvas de morte confirmaram uma mais alta ação antimicrobiana de formulações lipossomais de aminoglicosídeos do que dos antibióticos livres. Neste trabalho a amicacina encapsulada em liposomas compostos de DPPC/colesterol na média molar de 2:1 erradicaram cepas clínicas de *P. aeruginosa* com uma concentração de 8 µg/mL, enquanto o antibiótico livre a uma concentração de 256 µg/mL foi inativo (MUGABE et al. 2006).

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível a preparação e obtenção de lipossomas de ceftazidima de tamanho homogêneo, através do método de hidratação do filme lipídico, seguido de sonicação da dispersão aquosa de fosfolipídios auto-organizados em vesículas e posterior ultracentrifugação, onde se obteve a separação do fármaco livre e encapsulado.

A CIM da ceftazidima lipossomal foi 50% menor que do fármaco livre. Assim como a ceftazidima encapsulada foi mais eficiente quanto ao efeito bactericida sobre a *P. aeruginosa,* não havendo recuperação microbiana após 24 horas de incubação. Esses resultados indicam que os lipossomas de ceftazidima são mais efetivos que o fármaco livre contra a cepa resistente de *P. aeruginosa,* comprovando que o emprego de lipossomas como sistemas carreadores de antimicrobianos pode ser eficaz.

Os resultados encontrados neste trabalho abrem perspectivas para futura investigações pré-clínicas (*in vivo)* e clínicas da utilização de cefalosporinas encapsuladas em lipossomas na terapêutica de infecções causadas por microrganismos resistentes a este antimicrobiano.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIPOUR M.; HALWANI M.; OMRI A.; SUNTRES Z. E. Antimicrobial effectiveness of liposomal polymyxin B against resistant Gram-negative bacterial strains. *International Journal of Pharmaceutics.* v. 355 (2008) 293–298, 2007.

AYRES, M. C. C. ; BRANDÃO,M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA,H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Antibacterial activity of useful plants and chemical constituents of the roots of Copernicia prunifera. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. João Pessoa, v. 18, n. 1, 90-97, Mar. 2008.

BANGHAM, A. D., STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal Molecular Biology,* London, v.13, p. 238-252, 1965.

BEAULAC, C.; SACHETELLI, S.; LAGAGE, J. In-vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated antibiotic against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.41, p. 35-41, 1998.

DRULIS-KAWA, Z.; GUBERNATOR, J.; DOROTKIEWICZ-JACH, A.; DOROSZKIEWICZ, W.; KOZUBEK, A. In vitro antimicrobial of lipossomal meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* strains. *International Journal of Pharmaceutics.* v. 315, p. 59-66, 2006.

ELLBOGEN M. H., OLSEN K.M., GENTRY-NIELSEN M.J., PREHEIM L.C. Efficacy of lipossome-encapsulated ciprofloxacin compared with ciprofloxacin and ceftriaxone in rat model of pneumococcal pneumonia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 51, p. 83-91, 2003.

MAURER N., WONG K. F., HOPE M. J., CULLIS P. R. Anomalous solubility behavior of the antibiotic ciprofloxacin encapsulated in liposomes: a ^{1}H-NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta.* v. 1374, p. 9 -20, 1998.

MUGABE, C.; AZGHANI, A. O.; OMRI, A. Liposome-mediated gentamicin delivery: development and activity against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* v.55, p. 269-271, 2005.

MUGABE, C.; HALWANI, M.; AZGHANI, R.; LAFRENIE, R. M.; OMRI, A. Mechanism Of Enhanced Activity Of Lipossome-Entrapped Aminoglycosides Against Resistant Strains Of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 50, n. 6, p. 2016-2022, 2006.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1 – 56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 – 1898 USA, 2003.

OMRI A., RAVAOARINORO M. Preparation, properties and the effects of amikacin, netilmicin and tobramycin in free and liposomal formulations on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 7, p. 9-14, 1996.

OMRI, A.; SUNTRES, Z. E.; SHEK, P. N. Enhanced activity of liposomal polimyxin B against *Pseudomonas aeruginosa* in rat model of lung infection. *Biochemical Pharmacology*. v. 64, p. 1407-1413, 2002.

ONG, C. T.; TESSIER, P. R.; LI, C.; NIGHTINGALE, C. H.; NICOLAU, D. P. Comparative in vivo efficacy of meropenem, imipenem, and cefepime against *Pseudomonas aeruginosa* expressing MexA-MexB-OprM efflux pumps. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* v. 57, p.153-161, 2007.

RUKHOLM, G.; MUGABE, C.; AZGHANI, A. O.; OMRI, A. Antibacterial activity of liposomal gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*: a time-kill study. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 27, p. 247-252, 2006.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: A bala mágica acertou? *Química Nova*. São Paulo. v. 25, n 6b, p. 1181-1185, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, São Paulo, v. 26, n. 5, Oct. 2003.

CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA TRANSGÊNICAS E CONVENCIONAIS QUANTO AO TEOR DE PROTEÍNA NO GRÃO

CARDOSO JÚNIOR, Luiz Antonio[1]; **DUARTE**, João Batista[2];
MONTEIRO, Pedro Manuel Figueira de Oliveira[3];
SANTOS JÚNIOR, Neucy Nunes[4]; **SANTOS**, Dhiogo Albert Rosa dos[4]

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da introgressão do gene de resistência ao herbicida glifosato (RR) em soja, sobre o teor de proteína no grão, em cultivares recomendadas para a região central do Brasil. Foram analisadas amostras de grãos (100 g) de treze cultivares, ensaiadas em blocos completos casualizados, por dois anos (semeaduras em 16/dez./2006 e 07/dez./2007). O teor de proteína foi determinado pelo método de extração Kjeldahl, que se baseia na determinação do nitrogênio total após digestão completa da amostra. Os resultados indicaram diferenciação entre as cultivares, em termos do teor de proteína e produtividade de grãos, assim como interação da introgressão do gene RR com os genótipos das cultivares. Além disso, observou-se forte influência do ambiente na manifestação dessa interação, pois o comportamento relativo dos genótipos não se mostrou estável de um ano para o outro.

Palavras-chave: *Glycine max*; transgenia; OGM; soja RR; proteína.

INTRODUÇÃO

A soja atualmente é um dos principais grãos na produção nacional. O Brasil configura-se como o segundo maior produtor mundial de soja, superado apenas pelos Estados Unidos. Na safra passada, 2007/2008, o Brasil teve um recorde de produção, atingindo mais de 60 milhões de toneladas de grãos; já nesta safra (2008/2009), devido a estiagens, a produção nacional foi pouco mais de 58 milhões de toneladas, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento – Conab (BRASIL, 2009).

Comparativamente às principais oleaginosas cultivadas (algodão, amendoim, girassol, canola ou colza, linho, copra e palma), a soja ocupa papel de destaque. Sua cultura responde por aproximadamente 50% da colheita mundial, sendo a oleaginosa mais cultivada no mundo, com uma safra de cerca de 200 milhões de toneladas de grãos (AGRIANUAL, 2004). Dados do

[1] Alunos de iniciação científica (PIVIC/PIBIC-UFG/CNPq). Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos – luizantonio.cj@gmail.com
[2] Orientador/ Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos / UFG – jbduarte@agro.ufg.br
[3] Pesquisador da Agência Goiana de Desenvolvimento Rural e Fundiário (AgenciaRural-GO).
[4] Acadêmicos do Curso de Agronomia, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos / UFG.

Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior mostram que a soja tem uma importante participação também nas exportações brasileiras. Em 2006, foram US$ 9,3 bilhões, o que representou 6,77% do total exportado (EMBRAPA, 2009).

A principal utilização da soja é como matéria-prima para a indústria de esmagamento, que produz óleo e farelo. Esses derivados da soja são matérias-prima para vários segmentos industriais. A fração óleo é usada, principalmente, pela indústria alimentícia na produção de óleos refinados, gorduras hidrogenadas, margarinas, maioneses etc. A fração protéica assume papel de grande importância para a avicultura do Brasil e de outros países, devido à alta concentração em aminoácidos essenciais, especialmente lisina, além de seu considerável valor energético. Assim, devido ao alto valor nutricional na dieta, a soja tem-se destacado também na indústria de produção de rações (SANTOS et al., 2005).

As principais cultivares recomendadas para a alimentação humana plantadas no Brasil apresentaram teor médio de proteína de 39,5% e teor médio de óleo de 23% (VIEIRA; CABRAL; PAULA, 1999). Estes autores estudaram seis cultivares de soja, destinadas à alimentação humana, e constataram que estas apresentavam excelente balanço de aminoácidos essenciais, podendo ser consideradas como fontes de proteína de alta qualidade. Entre as cultivares encontraram também valores diferentes quando ao teor de ácidos graxos polinsaturados. Variedades com maiores quantidades de ácidos graxos insaturados permitem uma dieta melhor quanto à qualidade do óleo.

A larga utilização da soja na alimentação humana e animal decorre basicamente de dois fatores principais, o alto teor protéico e o elevado teor de óleo no seu grão (ROCHA; VELLO, 1999). Apesar da importância assumida nesse contexto, o melhoramento da soja para composição nutricional do grão não tem sido priorizado nos programas das grandes empresas de pesquisa. Isso revela a necessidade de se trabalhar o melhoramento da cultura visando à qualidade nutricional de seu grão.

Os trabalhos de genética vegetal com uso de técnicas de biotecnologia, como, por exemplo, a de DNA recombinante, levaram, no início da década de 1990, ao desenvolvimento da soja transgênica RR (*Roundup Read*), resistente

à molécula do herbicida glifosato (BORÉM; GIÚDICE; COSTA, 2002; BORÉM; ROMANO; SÁ, 2007). Essa tecnologia representou um marco para a sojicultura mundial, pois o glifosato, sendo uma molécula considerada de baixo custo e sem seletividade, propiciou, aos produtores, menores custos de produção e maior eficiência no controle das plantas daninhas (CALVO, 2005). A polêmica em torno dos organismos geneticamente modificados (OGM), entretanto, tem sido grande, sobretudo do ponto de vista ideológico, embora especialistas no assunto entendam que este deva ser encarado, sobretudo, do ponto de vista científico (BORÉM; PATTERNIANI; CASTRO, 2004).

No contexto dessas preocupações, há a problemática do possível fluxo gênico entre OGM e organismos nativos. No caso da soja, entretanto, uma espécie essencialmente autógama e exótica, a probabilidade de isso acontecer pode ser considerada nula, pois não há parentes silvestres no Brasil (BORÉM; MIRANDA, 2005). A despeito da ausência de evidencias científicas, a preocupação resume-se no fato da possível criação de “super-ervas” daninhas, o que tem sido difundido em artigos veiculados na mídia não especializada (BORÉM; ROMANO; SÁ, 2007). Assim, a única possibilidade desse fluxo gênico, em soja, seria mesmo com as lavouras de soja cultivada (SCHUSTER et al., 2007), o que não traria problemas. Enfim, para elucidação das questões levantadas, justificam-se estudos detalhados acerca do tema, entre os quais se destacam aqueles que se propõem a avaliar os impactos dessa tecnologia sobre a qualidade nutricional dos alimentos.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo agregar informações sobre aos aspectos nutricionais associados ao grão da soja, em cultivares convencionais e transgênicas recomendadas para cultivo na região central do Brasil. Especificamente, o propósito do trabalho foi avaliar possíveis diferenças entre genótipos de soja em suas versões convencional e transgênica, no que tange ao teor de proteína no grão.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados grãos provenientes de dois experimentos de avaliação de cultivares de soja transgênicas e convencionais, conduzidos no âmbito do

mesmo projeto (CARDOSO JÚNIOR et al., 2008). Ambos foram conduzidos na Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos / UFG, sendo o primeiro, na safra 2006/2007, com treze tratamentos (Tabela 1) e quatro repetições, e o outro, em 2007/2008, com os mesmos tratamentos em três repetições. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, com parcelas de quatro fileiras de 5,0 m. As amostras de grãos foram provenientes das duas fileiras centrais, descartando-se 0,5 m em cada extremidade.

Tabela 1. Cultivares de soja recomendadas para cultivo na região central do Brasil e avaliadas experimentalmente, classificadas segundo os tipos convencional (Conv.) e transgênica (RR), identificadas também segundo os genótipos originais que receberam a introgressão do gene RR.

Cultivar	Tipo	Genótipo Original	Cultivar	Tipo	Genótipo Original
BRSGO Luziania	Conv	BRSGO Luziania	Emgopa 316	Conv	Emgopa 316
GO 05 5548 RR	RR	BRSGO Luziania	GO 05 5539 RR	RR	Emgopa 316
BRSGO Mineiros	Conv	BRSGO Mineiros	MSOY 6101	Conv	MSOY 6101
GO 05 5555 RR	RR	BRSGO Mineiros	BRS Favorita RR	RR	BRS Favorita RR
Emgopa 302	Conv	Emgopa 302	BRS Valiosa RR	RR	BRS Valiosa RR
GO 05 5533 RR	RR	Emgopa 302	-	-	-
Emgopa 315	Conv	Emgopa 315	-	-	-
GO 05 5704 RR	RR	Emgopa 315	-	-	-

Para a obtenção dos teores médios de proteína foi utilizada a metodologia descrita e recomendada pela AOAC “Official Methods of Analysis” (DEUTSCH, 1995) e pelo CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Mayz y Trigo) (VILLEGAS; ORTEGA; BAUER, 1985). Assim, empregou-se o método de Kjeldahl, que se baseia na determinação do nitrogênio total após digestão completa da amostra. No processo de digestão, pesa-se aproximadamente 0,30 g da amostra de grãos de cada parcela, diretamente em tubos de micro Kjeldahl, aos quais foram adicionados 1,0 g de mistura catalítica, juntamente com 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, em aparelho digestor, à temperatura inicial de 40°C. Foi realizado aquecimento gradativo (3°C por minuto) até atingir a temperatura de 400º C. Esta foi mantida até o aparecimento de uma solução límpida de coloração esverdeada, que corresponde ao ponto de completa digestão da matéria orgânica. Após esse

processo, os tubos foram retirados do aparelho digestor e resfriados até 60°C; posteriormente, foram adicionados 2,0 mL de água destilada, aos poucos, pela parede do tubo para evitar a cristalização da solução, o que dificultaria a destilação.

Para avaliar a variabilidade entre as cultivares, no que tange ao teor de proteína no grão, foi realizada análise de variância segundo o modelo do delineamento (blocos completos casualizados). Esta análise foi detalhada segundo dois tipos de desdobramento dos efeitos de tratamentos (cultivares). No primeiro deles (I), avaliaram-se as diferenças entre os tipos de cultivares, "convencionais" e "transgênicas", e as diferenças entre cultivares dentro de cada um destes tipos. No segundo (II), avaliou-se a interação entre os genótipos originais das cultivares e os tipos; isto é, o efeito diferencial da introgressão do gene RR sobre as respectivas cultivares convencionais. Avaliou-se também o efeito do tipo, convencional ou transgênico, dentro de cada cultivar.

Todas essas análises foram implementadas no aplicativo computacional SAS® (SAS Institute Inc., 2009), utilizando-se o seu procedimento *proc glm* (*procedure for general linear models*), para ajuste de modelos lineares, e recursos específicos de seus comandos *contrast* e *lsmeans*, para a estimação dos efeitos dos contrastes de interesse. As rotinas computacionais foram construídas com base em recomendações de Duarte (2000) e Pimentel-Gomes e Garcia (2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cultivares avaliadas mostraram produtividades de grãos variando de 935 kg/ha a 2.535 kg/ha, no experimento conduzido na safra 2006/2007, e de 1.732 kg/ha a 3.023 kg/ha, no experimento da safra 2007/2008 (Tabela 2). Isso representa uma amplitude mínima de quase 1.300 kg, que revela grande variabilidade no potencial produtivo dos genótipos. A menor produtividade média no primeiro experimento, possivelmente, ocorreu devido ao atraso na sua semeadura (16/dez./2006), em relação à época mais adequada para a região (novembro), aliado à falta de chuva no período de enchimento dos grãos. Isso implicou em florescimento mais precoce neste experimento (47 dias

contra 50 dias no segundo) e em menor produtividade média de grãos. Esses resultados corroboram aqueles encontrados por Maehler et al. (2003), que também obtiveram menor rendimento sob baixa disponibilidade de água no solo, bem como os de Mascarenhas et al. (1996), que tiveram o mesmo problema sob estiagem.

Tabela 2. Médias de produtividade de grãos (kg/ha) e de teor de proteína no grão (%), em dois experimentos de competição de cultivares de soja convencionais (Conv) e transgências (RR), conduzidos em Goiânia-GO (Exp.1: safra 2006/2007, Exp.2: safra 2007/2008).

Cultivar original	Tipo	Grãos (kg/ha)		Proteína (%)	
		Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2
BRSGO Luziania	Conv	1.681	2.736	36.77	36.57
BRSGO Luziania (GO_05_5548)	RR	2.535	2.866	37.83	35.30
BRSGO Mineiros	Conv	1.893	3.023	36.82	35.35
BRSGO Mineiros (GO_05_5555)	RR	1.244	2.523	36.73	36.39
Emgopa 302	Conv	1.307	2.435	37.91	35.47
Emgopa 302 (GO_05_5533)	RR	935	1.732	38.11	37.79
Emgopa 315	Conv	2.059	2.838	35.58	35.64
Emgopa 315 (GO_05_5704)	RR	2.270	2.630	36.61	34.09
Emgopa 316	Conv	1.913	2.204	38.56	36.73
Emgopa 316 (GO_05_5539)	RR	1.050	2.699	37.17	35.36
MSOY 6101	Conv	1.280	2.486	36.77	35.13
BRS Favorita RR	RR	1.744	2.745	38.73	34.09
BRS Valiosa RR	RR	1.970	2.382	37.40	34.85
Médias	-	*1.683,3*	*2.548,6*	*37,30*	*35,54*
CVg (%)	-	*26,02*	*9,39*	*1,34*	*2,51*
CVe (%)	-	*25,42*	*16,23*	*3,95*	*2,86*

Quanto ao conteúdo de proteína no grão, as cultivares mostraram teores médios variando de 35,6% a 38,7%, no primeiro experimento, e de 34,1% a 37,8%, no segundo, com diferença inferior a 2,0% de um experimento para o outro (Tabela 2). A variabilidade entre as cultivares, com respeito a este caráter, mostrou ser, portanto, bem inferior àquela demonstrada na produtividade de grãos. Enquanto nesta variável o coeficiente de variação genética (CVg) chegou a superar 25%; em teor de proteína, esse coeficiente não atingiu 3%. Isso refletiu também na variação ambiental (CVe) incidente sobre ambos os caracteres.

Analisando-se os dois experimentos, verificaram-se diferenças altamente significativas ($p<0,01$) entre as cultivares quanto à produtividade de grãos, no primeiro deles; porém, essas diferenças não alcançaram significância ($p>0,05$) no segundo (Tabela 3). Isso pode ter ocorrido em razão de o primeiro ensaio contar com quatro repetições e o segundo com apenas três, o que acarretou diminuição nos graus de liberdade para a estimativa do resíduo, diminuindo o poder de discriminação do teste F na análise da variância. Quanto ao teor de proteína, a análise de variância revelou diferenças significativas entre os genótipos apenas no segundo experimento. Santos Junior et al. (2005) e Moraes et al. (2006), em pesquisas semelhantes, encontraram diferenças significativas entre genótipos de soja, confirmando o que foi verificado no segundo experimento.

Tabela 3. Resultados da análise da variância, em termos de quadrados médios e significâncias estatísticas, para os dados de produtividade de grãos (kg/ha) e teor de proteína (%), em dois experimentos de competição de cultivares de soja convencionais (Conv) e transgências (RR), conduzidos em Goiânia-GO (Exp.1: safra 2006/2007, Exp.2: safra 2007/2008), com base no modelo (I) de desdobramento dos efeitos de genótipos.

Fontes de Variação	GL[1]	Grãos (kg/ha)		Proteína (%)	
		Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2
Blocos	g_B	1189917,46**	82363,80	6,9422*	3,3934
Genótipos (G)	12	950662,24**	343036,12	3,1658	3,4204**
Tipo: Conv vs. RR	1	268009,64	185842,18	0,2706	0,2100
Genótipos/Tipo	11	1036960,82**	359474,81	3,2224	3,5209**
G / Tipo "Conv"	5	433555,54	269350,28	4,3035	1,3447
G / Tipo "RR"	6	1539798,54**	434578,58*	2,3216	5,3346**
Erro	g_E	183163,98	171039,28	2,1669	1,0328

[1] GL: graus de liberdade ($g_B = 3$, em Exp.1, e $g_B = 2$, em Exp.2; $g_E = 36$, em Exp.1, e $g_E = 27$, em Exp.2).
* ou **: valores significativos a 5% ou a 1% de probabilidade, respectivamente.

Em geral, não se observaram diferenças significativas entre os tipos convencionais e transgênicos, no que tange aos caracteres avaliados (Tabela 4). Contudo, ao se avaliar esse efeito dentro de cada cultivar, as significâncias estatísticas apareceram em ambos os caracteres. Em produtividade de grãos, as diferenças se manifestaram dentro das cultivares originais BRSGO Luziania, BRSGO Mineiros e Emgopa 316, no primeiro experimento, e da cultivar Emgopa 302, no segundo experimento. Isso revela uma interação da introgressão do gene RR com o genoma dessas cultivares, no que tange a este

caráter. O sentido dessa interação, entretanto, não parece ser unidirecional, pois, ora a cultivar RR foi a mais produtiva (BRSGO Luziania), ora isso se inverteu (BRSGO Mineiros, Emgopa 316 e Emgopa 302). Assim, excetuando-se BRSGO Luziania, houve predominância de rendimentos superiores nas versões convencionais dessas cultivares. Tais resultados, entretanto, não foram consistentes nos dois experimentos, revelando efeito ambiental marcante sobre as estimativas obtidas.

Tabela 4. Resultados da análise da variância, em termos de quadrados médios e significâncias estatísticas, para os dados de produtividade de grãos (kg/ha) e teor de proteína (%), em dois experimentos de competição de cultivares de soja convencionais (Conv) e transgências (RR), conduzidos em Goiânia-GO (Exp.1: safra 2006/2007, Exp.2: safra 2007/2008), com base no modelo (II) de desdobramento dos efeitos de genótipos.

Fontes de Variação	GL[1]	Grãos (kg/ha)		Proteína (%)	
		Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2
Blocos	g_B	1189917,5**	82363,8	6,9422*	3,3934
Genótipos (G)	12	950662,2**	343036,1	3,1658	3,4204**
Cultivar original (Cv)	7	1036351,6**	362894,6	4,2325	3,2190*
Tipo (T)	(1)	268009,6	185842,2	0,2706	0,2100
Int. Cv x T	(4)	971368,9**	347582,2	2,0230	4,5755**
(Tipo / Cv)	(5)	830697,0**	315234,2	1,6725	3,7024*
Tipo / Cv.Luziania	1	1457607,4**	25194,2	2,2791	2,4193
Tipo / Cv.Mineiros	1	840196,8*	375000,0	0,0153	1,6017
Tipo / Cv.Emg.302	1	277102,9	742790,5*	0,0820	8,0736**
Tipo / Cv.Emg.315	1	89126,4	65104,2	2,1218	3,5883
Tipo / Cv.Emg.316	1	1489451,7**	368082,2	3,8642	2,8291
Erro	g_E	183163,98	171039,28	2,1669	1,0328

[1] GL: graus de liberdade (g_B = 3, em Exp.1, e g_B = 2, em Exp.2; g_E = 36, em Exp.1, e g_E = 27, em Exp.2).
* ou **: valores significativos a 5% ou a 1% de probabilidade, respectivamente.

Essa diferença entre a versão convencional e transgênica da mesma cultivar, entretanto, não se mostrou consistente nos dois anos (Tabelas 2 e 4), o que impossibilita emitir conclusão mais definitiva a esse respeito. Além disso, deve-se ressaltar que não se pode atribuir as diferenças observadas, exclusivamente, ao gene RR, pois o número de retrocruzamentos realizados para a reconstituição dos respectivos genitores recorrentes (entre três e cinco) não é suficiente para emitir tal afirmação. Daí a razão porque, neste trabalho, adotou-se a expressão “efeito da introgressão do gene RR”, o que permite

considerar, conjuntamente, os efeitos deste gene e os de outros genes ainda remanescentes do parental doador, inerentes do processo de retrocruzamento.

Quanto ao teor de proteína, ao se comparar as cultivares convencionais com suas versões transgênicas, verificaram-se diferenças significativas ($p<0,01$) tão somente no segundo experimento (Tabela 4), sendo a cultivar Emgopa 302 o único genótipo que revelou variação significativa. Neste caso, a vantagem manifestou-se em favor da versão transgênica, com conteúdo protéico 2,3% superior ao da versão convencional. Essa vantagem, embora reforce a possível interação da introgressão do gene RR com o genoma específico de cada cultivar, não pode ser considerada conclusiva, nem pode ser generalizada em favor das variedades transgênicas. Primeiramente, porque a diferença não se confirmou no primeiro experimento, mesmo dentro da própria cultivar, e, em segundo lugar, porque outras cultivares mostraram tendência inversa (ex. Emgopa 315, Emgopa 316). No caso da primeira, a vantagem, embora não significativa a 5%, praticamente se manifestou em favor da versão convencional ($p<0,075$), com diferença média de 1,6%. Porém, também neste caso, a vantagem não se confirmou no primeiro experimento.

Vale salientar que a interação geral entre cultivares e tipo (convencional e transgênica), quanto ao teor protéico, também não se mostrou consistente nos dois experimentos, tal como se observou para o caráter produtividade de grãos. No caso do teor de proteína, o efeito significativo ($p<0,01$) somente foi verificado no segundo experimento (Tabela 4). Isso reitera, portanto, o efeito ambiental marcante sobre as estimativas obtidas para ambos os caracteres. Assim, estudos adicionais sob condições mais controladas (ex. ensaios em casa de vegetação) são necessários para se confirmar ou refutar variações observadas e hipóteses levantadas a partir deste estudo.

CONCLUSÕES

Conclui-se haver diferenciação entre as cultivares avaliadas, em termos de produtividade de grãos e teor de proteína no grão. Apesar disso, não é possível ainda estabelecer, com base nestes caracteres, uma recomendação generalizada de cultivares. Isso porque, sob determinadas condições, algumas cultivares manifestam efeito favorável da introgressão do gene RR,

aumentando-se a produtividade de grãos e/ou o teor de proteínas, embora outras manifestem exatamente o efeito contrário. Isso indica interação entre a introgressão do gene e o genoma específico de cada cultivar. Por outro lado, a inconsistência desse efeito (forte influência do ambiente na manifestação dessa interação), de um ano para o outro, impossibilita assegurar a sua direção e magnitude, mesmo dentro de cultivares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL 2004. Soja, mercado & perspectivas. In: **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativos / Gerdau Produtos Agropecuários. 2004. p. 423-462.

BORÉM, A.; GIÚDICE, M.P. del; COSTA,N.M.B. (Ed.). **Alimentos geneticamente modificados.** Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 2002. 305 p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 5. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 525 p.

BORÉM, A.; PATTERNIANI, E.; CASTRO, L. A. B. de. **Transgênicos**: A verdade que você precisa saber. Brasília: AP Vídeo e Comunicação. 2004. 57 p.

BORÉM, A.; ROMANO, E.; SÁ, M. F. G. de. **Fluxo gênico e transgênico**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 199 p.

BRASIL – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra Brasileira de grãos 2008/2009** – Sétimo Levantamento – Abr/2009. Disponivel em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/7 graos_08.09.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2009.

CALVO, E. S.; KIIHL, R. A. S. Soja – melhoramento genético: de onde partimos para onde vamos. **Visão Agrícola - A cadeia produtiva da soja**, v. 5, n. 1, p. 50-53, jan./ jun. 2005.

CARDOSO JÚNIOR, L. A.; DUARTE, J. B.; MONTEIRO, P. M. F. de O.; SANTOS JÚNIOR, N. N.; SANTOS, D. A. R. dos. Caracterização de cultivares de soja transgênicas e convencionais quanto à produtividade e teor de óleo no grão. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG – CONPEEX, 5. 2008, Goiânia. **Anais eletrônicos ...** [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2008.

DEUTSCH, M. J. (Ed.). **AOAC official methods of analysis of the association of official analytical chemistry**. Vitamins and other nutrients. chapter 45, p. 65, Arlington, 1995.

DUARTE, J. B. **Sobre o emprego e a análise estatística do delineamento em blocos aumentados no melhoramento genético vegetal**. 2000. 293 p. Tese (Doutroado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/ Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

EMBRAPA SOJA. **Soja Área e Produção** - Safra 2007/2008. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294&cod_pai=17 > Acesso em: 28 jul. 2009.

MASCARENHAS, H.A.A.; TANAKA, R.T.; GALLO, P.B.; PEREIRA, J.C.V.N.A.; AMBROSANO, G.M.B.; CARMELLO, Q.A.C. Efeito da calagem sobre a produtividade de grãos, óleo e proteína em cultivares precoces de soja. **Scientia Agrícola,** Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 164-172, jan./abr. 1996.

MAEHLER, A. R.; COSTA, J. A. PIRES, J. L. F.; RAMBO, L. Qualidade de grãos de duas cultivares de soja em função da disponibilidade de água no solo e arranjo de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 213-218, mar./abr. 2003.

MORAES, R. M. A. de; JOSÉ, I. C.; RAMOS, F. G.; BARRO, E. G. de; MOREIRA, M. A.. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.5, p.725-729, mai. 2006

PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C.H. **Estatística aplicada a experimentos agronômicos e florestais**: exposição com exemplos e orientações para uso em aplicativos. Piracicaba: Fealq, 2002. 309 p.

ROCHA, M. DE M.; VELLO, N. A. Interação genótipos e locais para rendimento de grãos de linhagens de soja com diferentes ciclos de maturação. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 1, p. 69-81, 1999.

SANTOS JUNIOR, N. N.; DUARTE, J. B.; OLIVEIRA, J. P. de; SCHEGOSCHESKI, R.T.; NUNES JÚNIOR, J. Teores de óleo e de proteína em genótipos de soja cultivados na Região Central do Brasil. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG – CONPEEX, 2/ Seminário de Iniciação Cientifica, 3. 2005, Goiânia. **Anais eletrônicos ...** [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2005.

SANTOS, Z.A.S.; FREITAS, R.T.F.; FIALHO, E.T.; RODRIGUES, P.B.; LIMA, J.A.F.; CARELLOS,; D.;BRANCO, P.A.C.; CANTARELLI, V.S. Valor Nutricional de Alimentos para Suínos Determinados na Universidade Federal de Lavras. **Ciência e Agrotecnologia,** Lavras, v.29, n.1, 232-237, jan./fev 2005.

SCHUSTER, I.; VIEIRA, E. S. N.; SANTANA, H.; SINHORATI, D.; SILVA, R. B. da; OLIVEIRA, M. A. R. de. Fluxo gênico em soja na Região Oeste do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 4, p.515-520, abr. 2007.

VIEIRA, C.R.; CABRAL, L.C.; PAULA, A.C.O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.7, p.1277-1283, jul. 1999.

VILLEGAS, E. ; ORTEGA, E.; BAUER, R. **Métodos Químicos Usados em el CYMMIT para Determinar la Calidad de Proteína de los Cereales**. Centro Internacional de Mejoramiento de Mayz y Trigo. México, D.F., México, 1985. 34 p.

AVALIAÇÃO DE LINHAGENS E CULTIVARES DE ARROZ DE TERRAS ALTAS DESENVOLVIDAS PELO PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO

Dhiogo Albert Rosa dos Santos[1], Orlando Peixoto de Morais[2], Jairton de Almeida Diniz[3], Itamar Ângelo dos Santos[4], Patrícia Guimarães Santos Melo[5]

INTRODUÇÃO

Devido a sua alta importância nutricional e cultural, hoje a cultura do arroz de terras altas é plantada praticamente em todas as regiões do Brasil, em uma ampla diversidade de cultivo, que vai desde as lavouras mais tecnificadas até agricultura de subsistência, explorada por pequenos agricultores. Por ser uma cultura pouco exigente em insumos e com boa tolerância à solos ácidos, o cultivo de arroz de terras altas assumiu um papel de destaque para agricultura familiar no Estado de Goiás. Visto que 16,3% do Valor Bruto da Produção Agropecuária da região Centro-Oeste tem como origem a agricultura familiar, juntamente com 31% de todo arroz produzido no Brasil, assim a cultura do arroz assumi um importante papel nutricional e social (Novo..., 2000).

As últimas três décadas foram marcadas por grandes avanços da pesquisa para a cultura do arroz, enfocando principalmente o melhoramento genético. Para o arroz de terras altas foi desenvolvidas cultivares mais produtivas, precoces, folhas eretas, bastante responsivas a melhoria do ambiente e boa qualidade de grãos. No entanto a maioria dos agricultores familiares tem dificuldades para adquirir sementes de alto valor genético, na maioria dos casos os agricultores multiplicam as sementes, mas a forma de condução das lavouras e

[1] Aluno de iniciação científica (PIBIC-UFG/CNPq). Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, CEP 74001-970. Email: dhiogoalbert@gmail.com;
[2] Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, CEP 75375-000. E-mail: orlando@cnpaf.embrapa.br
[3] Pesquisador da Secretaria da Agricultura e Pecuária do Estado de Goiás, Goiânia, GO, CEP. 74.610-200
[4] Técnico Agrícola da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, CEP 74001-970
[5] Professora da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, CEP 74001-970. E-mail: pgsantos@agro.ufg.br
Apoio Financeiro: CNPq

armazenamento resulta em um produto de baixa qualidade, conseqüentemente redução na produtividade. As limitações para expansão da cultura em outros ambientes começam a surgir quando estas cultivares modernas são utilizadas por pequenos produtores em baixas tecnologias, ou seja, o potencial produtivo destes materiais não é explorado ao máximo devido ao sistema de cultivo utilizado. Esta falta de disposição de capital para investimento em tecnologias faz com que os pequenos produtores explorem solos com baixa fertilidade e em regiões com problemas de deficiência hídrica. Devido a estes fatos existe uma grande demanda pelos agricultores familiares de novas cultivares de arroz que permitam um menor uso de insumos, através de resistência a doenças, maior capacidade de competição com plantas daninhas e maior eficiência na utilização dos nutrientes do solo. Esta realidade da Agricultura Familiar no Brasil contraria a visão otimista dos que afirmam que existem soluções tecnológicas para todos os problemas (Sidersky e Silveira, 2000).

Uma alternativa que poderia contornar este problema seria a realização da pesquisa dentro do sistema de produção dos agricultores, envolvendo o agricultor desde o início do processo de geração de tecnologia. Este é o princípio da pesquisa participativa, que tem como atores o pesquisador, o produtor e o extensionista. Uma grande dificuldade para por em prática esta estratégia seria a insuficiência ou mesmo ausência completa, nas instituições de pesquisa, de equipes de profissionais com formação e sensibilidade para o caráter multidisciplinaridade exigido para o trabalho (Filho e Andreotti, 2000).

Assim, no processo de melhoramento podem-se utilizar metodologias participativas para seleção de linhagens e cultivares junto com os agricultores, de modo que as cultivares que resultem deste processo chegue mais rápido ao conhecimento dos agricultores. Com isso, espera-se que se eleve a taxa de adoção das cultivares geradas e a produtividade e qualidade das lavouras, além de despertar nos agricultores o interesse em realizar pesquisa, capacitando-os na seleção de cultivares introduzidas ou mesmo para efetuar recombinações e seleções dentro de suas próprias lavouras. Neste contexto, estando os agricultores conscientes de seu papel dentro do programa, será importante

incentivar os agricultores a produzir suas próprias sementes de melhor valor genético com vistas ao aumento de produtividade.

OBJETIVO GERAL

Desenvolver cultivares de arroz de terras altas adaptadas aos sistemas de cultivo dos pequenos agricultores do Estado de Goiás.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar e selecionar linhagens nos ensaios de observação e de Valor de Cultivo e Uso (VCU);

b) Estudar a interação genótipo x ambiente das linhagens de arroz nos ensaios de Valor de cultivo e uso (VCU);

c) Treinamento e iniciação científica do aluno de graduação, proporcionando melhores condições para o seu exercício profissional ou mesmo para a realização de futuros cursos de pós-graduação.

MATERIAIS E METODOS

O programa de melhoramento de arroz de terras altas, visando obtenção de cultivares que atendam a demanda de pequenos agricultores de Goiás, iniciou-se em 2004, por meio da parceria entre Universidade Federal de Goiás, Embrapa Arroz e Feijão e Secretária Estadual de Agricultura (SEAGRO). Inicialmente foram identificadas linhagens e cultivares, da Embrapa Arroz e Feijão, resistentes à doença, boa capacidade de competir com plantas daninhas e boa adaptação à solos de baixa fertilidade.

No ano agrícola de 2008/2009, realizou-se os seguintes ensaios que fizeram parte do programa de melhoramento:

a) Ensaio de observação de linhagens (EOL): este ensaio foi composto por famílias obtidas de populações que já se encontraram em elevada homozigose.

Foram avaliadas 46 famílias juntamente com duas testemunhas em blocos aumentado de federer, com parcelas de 2 linhas de cinco metros. Este ensaio foi instalado nos dia 24/12/2009 no campo experimental da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da UFG.

b) Ensaios de valor de cultivo e uso (VCU) – Estes ensaios foram compostos por 16 linhagens e cultivares (Tabela 1) que foram avaliadas em três locais. Os locais escolhidos foram: Goiânia, Porangatu e Rubiataba. O delineamento utilizado nos VCU's seguiram as recomendações do Ministério da Agricultura, que no caso do arroz de terras altas, utilizou-se um delineamento em blocos ao acaso ou látice com 4 repetições e parcelas de 4 linhas de 5 metros de comprimento.

Tabela 1 – Relação dos genótipos avaliados no Ensaio de Valor de Cultivo e Uso VCU em três locais do Estado de Goiás, 2008/2009:

Identificação do tratamento	Linhagens e cultivares
1	CNAx7755-B-8-M1-B-GO11
2	CNAx7755-B-28-M1-B-GO4
3	CNAx7756-B-11-M1-B-GO8
4	CNAx7774-B-28-M1-B-GO1
5	CNAx7840-12-M2-M2-B-GO5
6	CNAx8723-1-1-B-10
7	CNAx8723-1-1-B-2
8	CNAx8308-B-5-B-5
9	CNAx8723-1-1-B-3
10	BRA 032051
11	BRA 042094
12	BRA 32039
13	BRA 42048
14	BRS PRIMAVERA
15	BRS SERTANEJA
16	BRS GO SERRA DOURADA

c) Unidades demonstrativas (UD): Estes ensaios foram compostos por 10 linhagens que se destacaram nos VCU's dos anos anteriores (Tabela 2). Os locais escolhidos foram propriedades de agricultores participantes do programa de melhoramento, sendo 4 UD's instalados no município de Rubiataba e um, no município de Nova América. Foram plantadas 10 linhas de 10 metros de

comprimento, onde os agricultores puderam observar o desenvolvimento dos materiais promissores.

Tabela 2 – Relação dos genótipos avaliados nas Unidades Demonstrativas nos municípios de Rubiataba e Nova América, no ano agrícola de 2008/2009.

Identificação	Linhagens
A	BRS Sertaneja
B	BRS GO Serra Dourada (BRA 1653)
C	BRS Primavera
D	BRA 32051
E	BRA 32039
F	BRA 42048
G	CNAx7755-B-8-M1-B-GO11
H	CNAx7755-B-28-M1-B-GO4
I	CNAx8723-1-1-B-10
J	CNAx8723-1-1-B-2

d) Ensaio Regional para avaliação de Famílias (ERF): Este ensaio foi composto por 16 famílias obtidas do programa de seleção recorrente da Embrapa Arroz e Feijão. Este experimento foi instalado no campo experimental da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da UFG, foram plantadas 5 linhas de 5 metros comprimento de cada família no dia 07/01/2009. Neste ensaio foram feitas seleções individuais de plantas, cada uma dessas plantas dará origem a uma nova linhagem que irá compor o Ensaio de Observação de Linhagens (EOL) da safra seguinte 2009/2010.

Em todos os ensaios foram utilizado um espaçamento de 0,45 metros entre linhas, e uma densidade de semeadura de 70 sementes por metro. Os demais tratos culturais como adubação e controle de plantas daninhas foram realizados de acordo com as limitações de cada produtor onde foram instalados os experimentos.

Tomaram-se os seguintes dados: florescimento, altura de planta, perfilhamento, acamamento e produtividade de grãos. Foram avaliadas as seguintes doenças: brusone (*Pyricularia grisea*), mancha parda (*Drechslera oryzae*), mancha de grãos (*Drechslera oryzae; Phoma sorghina, Alternaria*

padwickii; Pyricularia grisea; Microdochium oryzae)e escaldadura (*Macrodochium oryzae*). A avaliação será visual, atribuindo-se notas. (Standard.... 1988, citado por Prabhu, Filippi e Ribeiro, 1999).

Análises estatísticas e genéticas:

Inicialmente foram efetuadas as análises de variância individual, para os caracteres estudados. Posteriormente, realizou-se a análise de variância conjunta, envolvendo todos locais de cultivo, seguindo modelo estatístico proposto por Vencovsky e Barriga (1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os caracteres florescimento e incidência de doenças não foram analisados estatisticamenete, visto a dificuldade de acompanhar o desenvolvimento dos experimentos fora de Goiânia. No entanto não se observou incidência severa de doenças, em especial brusone (*Pyricularia grisea*), em todos os locais avaliados.

O resultado da análise conjunta de variância dos VCU´s é apresentado na Tabela 3. Observou-se diferença significativa ($p<0,01$) para os caracteres produtividade de grãos e altura de planta para todos fatores.

Tabela 3. Resumo da análise de variância para produtividade grãos de linhagens experimentais de arroz de terras altas, avaliadas em ensaio de valor de cultivo e uso em Goiânia, Rubiataba e Porangatu (2008/2009).

FV	GL	Quadrado Médio	
		Produtividade de graos	Alturta de plantas
Local (L)	2	817845,27**	2297,02
Genótipo (G)	15	1199459,13**	308,4**
G*L	30	1148309,39**	214,53**
Bloco(Local)	6	2434364,28**	112,09**
Erro	90	525122,58	120,00
Total	143		-
Média		3239,6 kg/ha	1,02 m
CV *(%)		22,3	10,67

** Significativo a 1% pelo teste de F

Nos ensaios de valor de cultivo e uso pode-se observar uma produtividade média de 3236,60 kg/ha, que é uma produtividade satisfatória para a produção de arroz de terras altas com baixo nível de tecnologia, chegando bem próxima da produtividade de grandes lavouras comercias que podem obter valores acima de 4000 kg/ha. O coeficiente de variação experimental de 22,37% tem sido muito freqüente em ensaios de VCU para a cultura do arroz. Houve diferenças significativas para locais e genótipos, além da presença de interação Genótipo X Local, indicando o comportamento diferenciado dos genótipos nos vários ambientes.

No desenvolvimento de cultivares para agricultura familiar, deve levar em conta alem de uma boa produtividade de grãos, uma boa estatura de plantas, visto que a colheita é manual, e quanto maior a planta maior é o rendimento de colheita e menor é o desgaste das pessoas envolvidas neste processo.

Na Tabela 5 estão demonstradas as médias de cada genótipo na análise conjunta para os caracteres produtividade de grão por hectare e altura de planta. Destacam se os genótipos: BRS GO SERRA DOURADA, BRA 32039, CNAx7755-B-8-M1-B-GO11, CNAx7840-12-M2-M2-B-GO5, BRA 042094, BRS SERTANEJA, BRA 42048 e BRA 032051. Esses genótipos se destacaram pela boa produtividade de grãos juntamente com uma boa estatura de planta.

A BRS SERRA DOURADA foi obtida com o objetivo de atender as necessidades dos pequenos agricultores, mostrando ao longo dos ensaios uma planta produtiva de boa altura que facilita o processo de colheita manual. Ela juntamente com a BRA 032051 se mostrou bastante competitiva nos ensaios de VCU's, mas foi nos ensaios das Unidades demonstrativas que a BRS SERRA DOURADA e BRA 032051 se diferenciaram das demais alcançando otimas produtividades.

Tabela 5. Médias de altura de plantas e produtividade de grãos dos genótipos avaliados nos ensaios de Valor de Cultivo e Uso nos municípios de Goiânia, Rubiataba e Porangatu (2008/2009).

Genótipos	Altura de planta (m)	Produtividade (Kg/ha)
CNAx7774-B-28-M1-B-GO1	1,01 a	2513,00 a
BRS PRIMAVERA	1,00 a	2643,88 a
CNAx7755-B-28-M1-B-GO4	1,08 b	2662,77 a
CNAx7755-B-8-M1-B-GO11	1,07 b	3071,11 b
BRS GO SERRA DOURADA	1,04 b	3088,66 b
CNAx8723-1-1-B-3	0,92 a	3185,11 b
BRA 042094	1,06 b	3294,33 b
BRS SERTANEJA	1,07 b	3304,11 b
CNAx7840-12-M2-M2-B-GO5	1,06 b	3352,00 b
BRA 32039	1,06 b	3370,44 b
BRA 032051	1,09 b	3402,77 b
CNAx8723-1-1-B-10	0,97 a	3455,66 b
CNAx8308-B-5-B-5	0,93 a	3519,88 b
CNAx8723-1-1-B-2	0,99 a	3563,11 b
BRA 42048	1,08 b	3649,66 b
CNAx7756-B-11-M1-B-GO8	0,93 a	3757,11 b

Teste de media Scott Knott 5%

Já nos ensaios das unidades demonstrativas, obteve-se uma média de produtividade de 3585 kg/ha, com um coeficiente de variação de 14,31% (Tabela7), confirmando a presença de genótipos que se destacaram nas etapas anteriores do programa de melhoramento.

Tabela 6. Resumo da analise de variância para produtividade de grãos em linhagens experimentais avaliadas em cinco unidades demonstrativas nos municípios de Rubiataba e Nova América (2008/2009).

FV	GL	Quadrado Médio	
		Produtividade de grãos	Alturta de plantas
Local (L)	4	5194065.32	429.02
Genótipo (G)	9	417780.67**	312.85
Erro	36	263382.88	28.27
Total	49		-
Media		3585,12 kg/ha	1,13 m
CV (%)		14,31	4,70

** Significativo a 1% pelo teste de F

Na tabela 8 pode-se destacar os genótipos BRS Sertaneja e BRA 32039 que apresentaram excelente produtividade de grãos, superando 4000 kg por hectare, seguidas de uma altura de planta satisfatória, acima 1,10 metros.

Tabela 8. Médias de produtividade de grãos em linhagens experimentais avaliadas em cinco unidades demonstrativas nos municípios de Rubiataba e Nova América (2008/2009).

Genótipos	Altura de planta (m)	Produtividade (Kg/ha)
CNAx8723-1-1-B-2	1,04 b	3223 a
CNAx7755-B-8-M1-B-GO11	1,16 c	3320 a
BRS GO Serra Dourada (BRA 1653)	1,08 b	3442 a
BRA 32051	1,25 e	3491 a
BRA 42048	1,13 c	3496 a
CNAx7755-B-28-M1-B-GO4	1,19 d	3550 a
BRS Primavera	1,11 c	3568 a
CNAx8723-1-1-B-10	0,98 a	3578 a
BRS Sertaneja	1,14 c	4050 b
BRA 32039	1,18 d	4129 b

A BRS SERTANEJA pode ser recomendada para o plantio familiar, visto seu bom desempenho nos ensaios de VCU e nas Unidades Demonstrativas, outro fator importante é que sua semente já pode ser imediatamente disponibilizada para os agricultores na safra 2009/2010. Já a BRA 32039 apresenta bom potencial

para lançamento futuro, no entanto é necessário que este genótipo passe ainda por ensaios de avaliação quanto à resistência a brusone (*Pyricularia grisea*) e qualidade de grãos, e posteriormente produção de sementes até estar plenamente disponível para os agricultores.

As informações geradas neste trabalho tem relevante importância para o programa de melhoramento de arroz de terras altas, podendo a partir destes dados indicar genótipos promissores que venham futuramente a serem lançados como cultivares que se adaptam plenamente ao nível tecnológico da agricultura familiar no Estado de Goiás estimulando estes pequenos agricultores a exploração da cultura de arroz de forma sustentável e competitiva.

CONCLUSÃO

Os genótipos BRS GO SERRA DOURADA, BRA 32039, CNAx7755-B-8-M1-B-GO11, CNAx7840-12-M2-M2-B-GO5, BRA 042094, BRS SERTANEJA, BRA 42048 e BRA 032051 que obtiveram melhores resultados nos ensaios de VCU, juntamente com os genótipos BRS Primavera, CNAx7755-B-8-M1-B-GO11 e BRA 42048 que apesar de não apresentarem as melhores produtividades, apresentam uma boa altura de planta, foram selecionadas para comporem novos ensaios e unidades demonstrativas em propriedades de pequenos agricultores do Estado de Goiás no próximo ano agrícola (2009/2010).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRUZ, C.D.; CASTOLDI, F.L. Decomposição da interação genótipo x ambiente em partes simples e complexa. **Revista Ceres**, Viçosa, v.38, n.219, p.422-430, set./out. 1991.

FILHO, C.G.; ANDREOTTI, C.M. **Metodologias de experimentação com agricultores**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 9-31.

NOVO retrato da agricultura familiar: o Brasil redescoberto. Brasília, DF: INCRA/FAO, 2000. 74 p.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; RIBEIRO, A. S. Doenças e seu controle. In: VIEIRA, N. R. de A.; SANTOS, A. B. dos.; SANT'ANA, E. P. **A Cultura do Arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. 1999. p262-307.

SIDERSKY P.; SILVEIRA, L.M. Experimentar com os agricultores – A experiência da AS-PTA na Paraíba. In: FILHO, C.G.; ANDREOTTI, C.M. **Metodologias de experimentação com agricultores**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 33-58.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496p.

Obtenção de extrato seco padronizado de uma planta medicinal (ESP 0109)

Denice Frota do Lago[a,*]; Renê Couto de Oliveira[a]; José Realino de Paula[a]; Edemilson Cardoso da Conceição[a]; Maria Teresa Freitas Bara[a].

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN), Goiânia-GO, CEP 74.001-970, Brasil
E-mail: denicedolago@hotmail.com

Palavras- chave: fitoterapia; extrato seco vegetal; spray-dryer

1. INTRODUÇÃO

A fitoterapia é definida como uma terapia caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substância ativa isolada, ainda que de origem vegetal (BRASIL, 2004).

No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio do Departamento de Assistência Farmacêutica, vem desenvolvendo diversas ações voltadas ao desenvolvimento de cadeias produtivas de plantas medicinais e fitoterápicos, com vistas à ampliação do acesso a produtos e serviços para usuários do Sistema Único de Saúde. A aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, prevendo o tratamento com Plantas Medicinais e Fitoterápicas no Sistema Único de Saúde (SUS), conforme disposto na portaria nº 971, de 3 de maio de 2006, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006a), bem como da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos através do Decreto nº 5.813 de 22 de julho de 2006, constituem incentivos sem precedentes à Fitoterapia (BRASIL, 2006b). Além disso, fato inédito no contexto das terapias complementares praticadas no Brasil, foi a publicação da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), que consta de 71 plantas, muitas dessas ainda não estão disponíveis no mercado na forma de matérias-primas padronizadas.

Dentro desse contexto, torna-se importante o desenvolvimento de estudos buscando a obtenção e padronização de matérias-primas vegetais de qualidade, com homogeneidade no teor de princípios ativos em cada lote de produção, o que permite uniformidade de dosagens. A obtenção extratos secos constitui uma opção de grande uso atual na indústria de fitoterápicos e esses extratos possuem a

vantagem de ter um período maior de conservação e uma maior concentração de ativos (SHARAPIN, 2000).

A planta objeto de estudo tem grande apelo comercial e é empregada na fitoterapia devido ao seu potencial ansiolítico e estimulante da memória, além da utilização na indústria de cosméticos (REIS et al., 1992).

2. OBJETIVOS

Este estudo visa propor parâmetros para a otimização de processos de extração dos princípios ativos de uma planta medicinal e secagem de extratos visando obtenção de um extrato seco padronizado (ESP 0109).

3. METODOLOGIA

3.1 Material Botânico:

A planta foi cultivada em Goiânia/GO e após coletada, foi enviada ao Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais – LPPN/FF/UFG.

Foi dessecada em estufa com circulação forçada de ar, trituradas em moinho de facas e acondicionadas adequadamente.

Posteriormente, foi realizado o estudo farmacognóstico, a determinação de cinzas totais, umidade, índice de intumescência (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988), doseamento dos flavonóides (ROLIM et al., 2005) e análise granulométrica (FARMACOPÉIA AMERICANA, 1995).

3.2 Obtenção do extrato da planta medicinal:

Foram empregados os processos de maceração e percolação (LIST, SCHIMIDT, 1989), nos quais o líquido extrator usado foi o etanol.

Foi realizada a caracterização físico-química do extrato obtido, quanto a identificação do marcador por cromatografia em camada delgada (CCD) (WAGNER, BLADT, 2001), ao doseamento de flavonóides totais (ROLIM et al., 2005), densidade, pH, teor de sólidos totais e teor alcoólico (FARMACOPÉIA BRASILEIRA,1988).

3.3 Secagem do extrato:

Os extratos foram submetidos ao método de secagem por atomização ou spray dryer (LIST, SCHIMIDT, 1989).

Os extratos secos padronizados obtidos foram caracterizados quanto ao rendimento de secagem, doseamento de flavonóides (ROLIM et al., 2005), umidade (FARMACOPÉIA BRASILEIRA,1988), identificação do marcador por CCD (WAGNER, BLADT, 2001), densidade aparente e compactada, fator de Hausner e índice de Carr (PRISTA, 1995), análise granulométrica e ângulo de repouso (PRISTA, 1995).

3.4 Análise estatística:

Para a análise dos resultados foi aplicada a análise de variância (ANOVA) seguida de teste de hipóteses, utilizando o programa Graph Pad in Stat.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Material Botânico

Para investigar a qualidade da planta medicinal estudada fez-se o seu estudo farmacognóstico, que envolveu a prospecção fitoquímica, determinação do índice de intumescência e quantificação dos marcador (doseamento dos flavonóides), ensaios de pureza, tais como umidade, cinzas totais, além da análise granulométrica do pó da planta dessecada. A tabela 1 apresenta a classe de metabólito secundário presente na planta pulverizada.

Tabela 1 – Prospecção fitoquímica do pó da planta medicinal em estudo

Classe	
Heterosídeos Cianogênicos	Ausente
Fenóis	Presente
Flavonóides	Presente
Taninos	Presente
Cumarinas	Presente
Triterpenos	Presente
Heterosídeos antraquinônicos	Ausente
Saponinas	Presente

Dentre os compostos presentes na planta, selecionou-se a classe dos flavonóides como marcador, visto trabalho anterior ter isolado essa classe de metabólitos (ADAMS, 1989). A RDC 48 (BRASIL, 2004) preconiza a necessidade de estabelecimento do marcador, que é o componente ou classe de compostos químicos presentes na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos.

Na Farmacopéia Brasileira não há informações sobre o estudo farmacognóstico desta planta, portanto os resultados obtidos de umidade, cinzas e índice de intumescência (tabela 2) serão úteis para um controle de qualidade interno em nosso laboratório.

Tabela 2 - Determinação da umidade, cinzas totais e índice de intumescência

Umidade *	Cinzas totais *	Índice de intumescência *
8,7%	17,3%	6,3

* Média obtida pela determinação em três repetições

Em relação à análise granulométrica do pó da planta em estudo, pode - se considerá-lo entre moderadamente grosso ou semi–fino, devido a porcentagem (Equação 1) de material que passou pelos tamis de malha 710µm e 250µm (Figura 1). Quando o material vegetal é destinado à produção industrial de extratos e

tinturas se usa o pó classificado como moderadamente grosso ou semi-fino (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Para verificar o tamanho médio do pó, fez-se uma análise do tamanho das partículas retidas em cada tamis (equação 2 e equação 3). As partículas apresentaram um tamanho médio 292,66 µm (tabela 3).

Equação 1:

P(%)= (m/5)*100

Equação 2:

TP= (dm*P)/100

Equação 3:

TMP= $\sum_1^4 TP$

Onde: ***m****: massa de pó que passou pelo tamis*

P*: porcentagem de pó que passou pelo tamis*

TP*: tamanho das partículas que passou pelo tamis*

dm: média da abertura da malha de 2 tamises(tomados 2 a 2)

Figura 1 – Análise granulométrica: porcentagem de pó que passou por cada malha

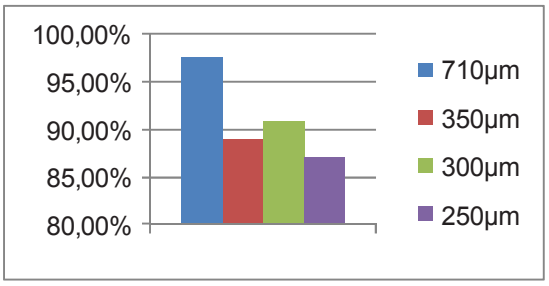


Tabela 3 – Tamanho médio das partículas

Média dos tamises(dm) (tomados 2 a 2)	Porcentagem de pó retido(P)	Tamanho das partículas em cada tamis(TP)
532,5µm	97,6%	519,72µm
327,5µm	89,1%	291,8µm
275µm	91%	250,25µm
125µm	87,1%	108,88µm
Tamanho médio das partículas		292,66µm

Para o doseamento de flavonóides totais, usou-se uma solução padrão de rutina 100µg/mL em solução etanólica com ácido acético 0,02M (99:1). A curva-padrão foi feita com 6 pontos com concentrações de 2,5 a 50µg/mL, apresentando r igual a 0,997. A equação da reta obtida foi y = 37, 0760x + 0, 04702. Está curva foi obtida pela média de três resultados, sendo adequada tanto para a amostra em pó, extrato percolado e macerado. Os teores obtidos estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4 – Absorbância, concentração e teor de flavonóides obtidos no material vegetal e extratos fluidos

Amostra	Absorbância em 361nm*	Concentração*	Teor*
Material vegetal	1,232	23µg /mL	1,0%
Extrato percolado	1,392	52µg /mL	1,3%
Extrato macerado	0,689	22µg /mL	0,4%

* Médias de 6 repetições, lidas em triplicata

4.2 Obtenção do extrato da planta medicinal:

Foram empregados dois métodos extrativos clássicos no setor de plantas medicinais: percolação e maceração. Os resultados do doseamento de flavonóides nessas soluções extrativas demonstram a eficiência da extração por percolação (tabela 5).

Tabela 5 - Comparação da eficiência de extração de flavonóides

Material Vegetal	Extrato macerado (Em)	Extrato percolado (EP)
1,0%	0,4%	1,3%
	p< 0, 0001	

A caracterização físico-química dos extratos obtidos está representada na tabela 6. A graduação alcoólica dos extratos não impede que sejam colocados no equipamento de secagem, pois a faixa de inflamabilidade é de 3 – 18% de álcool (LIST, SCHIMIDT, 1989). Além do teor de flavonóides do extrato macerado ser abaixo que o do extrato percolado (tabela 5), também deve-se considerar o teor de sólidos obtidos, o que não justifica realizar a secagem desse extrato, pois apresentará um rendimento baixo, gasto desnecessário de materiais e energia.

Tabela 6 - Caracterização física química dos extratos*

Extrato	Densidade (g/mL)	pH	Sólidos Totais (M/V)	Teor alcoólico (°GL)
EM	0,9	4,84	4,10%	57,8
EP	0,98	4,43	12,25%	63,7

* Os valores apresentados foram obtidos pela determinação em três repetições, com CV menor que 5,0%

4.3 Secagem do extrato

O extrato fluido percolado foi colocado sob nebulização no spray-dryer, sendo necessário, após experimentações diversas, o emprego de um adjuvante de secagem, para que pudesse obter o extrato seco (ESP 0109). O rendimento foi obtido de acordo com a equação 4 e está representado na tabela 8, assim como as outras características do ESP 0109.

Equação 4

$$\eta = m*100/[(M*ST)/100]$$

Onde: m é a massa obtida do extrato seco
M é a massa de extrato fluido
ST é a determinação de sólidos totais do extrato
η é rendimento de secagem

Tabela 8 – Caracterização do ESP 0109 obtido

Rendimento	47%
Umidade	7,4%
Sólidos totais	12,5%
Densidade aparente	0,27g/mL
Densidade compactada	0,36g/mL
Fator de Hausner	1,35
Índice de Carr	26,2%
Ângulo de repouso	10°
Tamanho das partículas	238,82 µm
Doseamento de flavonóides	2,3%

O uso de um adjuvante de secagem foi indispensável. O rendimento de secagem tende a aumentar, com o uso de adjuvantes de secagem, pois evitar a perda do extrato seco na câmara de secagem, ciclone e filtro de separação de ar devido à adesividade do pó. A relação entre a massa do extrato seco e o volume ocupado pelo pó antes e após a compactação possibilitou a determinação das densidades aparente e de compactação (PRISTA, 1995).

O extrato seco obtido não demonstrou ter boa escoabilidade, fluidez e compressibilidade. O Índice de Carr exprime em forma percentual a capacidade de compressibilidade do pó, onde valores entre 5 e 15% são considerados com excelente fluxo. Um índice similar foi proposto por Hausner (1967) apud Alves (1988), onde valores menores que 1,25 indicam bom fluxo. Considera-se que um pó

tem boas propriedades de escoamento quando possui ângulo de repouso igual ou inferior a 30º (WELLS, 1988 apud ALVES et al.,1988).

Considerando o tamanho médio do pó obtido, segundo a Farmacopéia Brasileira, ele poder ser considerado um pó fino. Com relação ao doseamento, o processo tecnológico envolvido, aumentou a concentração da classe correspondente ao marcador no produto.

5. CONCLUSÃO

Este estudo permitiu obter parâmetros para a otimização de processos de extração dos princípios ativos da planta medicinal selecionada e da obtenção do extrato seco padronizado em flavonóides (ESP 0109). Entretanto, estudos adicionais são necessários para melhorar as características físico-químicas do extrato seco obtido, visando seu uso no setor farmacêutico de fitoterápicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G.M.C. et al . Purificação e caracterização da β-lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. Química Nova, v. 31, n. 2, p. 413 – 416, 2008.

BRASIL, 2006a. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006- Dispõe sobre política nacional de práticas integrativas e complementares no sistema único de saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde.

BRASIL, 2006b. Decreto nº 5.813, de 22 de julho de 2006- Dispõe sobre política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde.

BRASIL, RDC nº 48, de 18 de março de 2004a. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br. Acesso em: 13 jun.2008.

FARMACOPÉIA AMERICANA, 23ª Edição, Estados Unidos, 1995.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 3ª Edição, São Paulo. 1988.

LIST, P.H; SCHIMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical Technology.** Boston: Boca Raton, 1989.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. **Tecnologia Farmacêutica e Farmácia Galênica.** V. I, 5ª Ed. Porto: Fund. Calouste Gulbenkian, 1995

REIS et al. **Como utilizar plantas medicinais**. Goiânia: Sistema Único de Saúde-Ministério da Saúde, 1992.

ROLIM, A.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O; SANTOS, I.M.N.S.; VELASCO, M.V.R. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalent, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) commercial extract. *Journal of AOAC International,* v. 88, n. 4, p. 1015 – 1019, 2005.

SHARAPIN, N. (org.) **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Colômbia: CYTED, 2000.

WAGNER, H. & BLADT, S. **Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas**. 2th. Berlin: Springer, 2001.

Identificação e distribuição de subtipos de ionócitos nas brânquias e pseudobrânquia glandular do *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) durante a ontogênese e aclimatação à salinidade

Thiago Lopes Rocha[1], Simone Maria Teixeira Sabóia-Morais[1]

[1] Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970, Brasil. E-mail: thiagorochabio20@gmail.com

Palavras-chave: guaru, células do cloro, osmorregulação, glicoproteína

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, a distribuição biogeográfica desigual dos peixes, ao longo de gradientes ambientais, tem despertado interesse e curiosidade do homem. Aristóteles afirmou que “Se se encarar por menor o mesmo processo de diversidade animal conforme os lugares que as espécies habitam, pode assinalar-se exemplos sugestivos. Vejamos o que se passa com os peixes de mar, que se repartem essencialmente pela sua preferência pelo alto ou pela faixa costeira (fugindo a essa distribuição, dá-se o caso de que há também capacitados para qualquer um dos dois habitats” (LOBO, 2008).

A capacidade dos peixes de sobreviverem e se reproduzirem em distintos hábitats, tem sido investigado desde aspectos biogeofráficos, evolutivos, ecológicos, até mecanismos fisiológicos e do comportamento celular (PISAM *et al.,* 1980; SABÓIA-MORAIS, 1996; OUATTARA *et al.*, 2009). Nesses estudos, destacam-se como sistemas-modelo espécies de peixes que resistem à ampla variação de salinidade, desde água doce (AD) à água salgada (AS), característica denominada de euralinidade.

Os peixes eurialinos, durante as variações dos gradientes osmóticos e iônicos do ambiente aquático, necessitam de mecanismos ion/osmorregulatórios para manutenção da homeostase celular, tecidual e dos flúidos corpóreos. Esses mecanismos permitem a manutenção do funcionamento normal dos processos bioquímicos e fisiológicos dos teleósteos (HWANG & LEE, 2007), e as mudanças da capacidade osmorregulatória ao longo da ontogênese possibilita o desenvolvimento adequado para a sobrevivência nos diferentes hábitats. Além disso, a distribuição desigual no ambiente aquático dos estágios do desenvolvimento de algumas

espécies de peixe (SCHREIBER & SPECTER, 1999) e a definição das caracteres evolutivos espécies-específicos são influenciandos pelos parâmetros físico-químicos da água, em especial o pH, a temperatura e a salinidade.

A ion/osmorregulação de adultos e juvenis de teleósteos tem sido grandemente investigada (PISAM *et al.,* 1980; OUATTARA *et al.*, 2009). Entretanto, estão disponíveis poucas informações sobre a cito-fisiologia osmorregulatória de larvas e ao longo da ontogênese dos peixes, principalmente estudos comparativos entre as espécies de fecundação externa e aquelas com fecundação interna.

As principais estruturas osmorregulatórias dos peixes são as brânquias, os rins, a pele e o intestino, sendo que a fisiologia e constituição celular desses órgãos são alterados ao longo do desenvolvimento para as espécies com fecundação externa (ESAKI *et al.*, 2009; OUATTARA *et al.*, 2009). Dentre esses órgãos, as brânquias são os sítios mais investigados quanto a ion/osmorregulação. Isso porque, a direção do transporte iônico das brânquias é alterada durante a aclimatação à diferentes salinidades (HWANG & LEE, 2007).

As brânquias dos peixes são órgãos multifuncionais, e desempenham, além da ion/osmorregulação, funções de trocas gasosas, respiração, regulação ácido-base, excreção de produtos nitrogenados e gustação (WILKIE, 1997; DIAZ *et al.*, 2005a; BORGES-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2006). O desemplenho de múltiplas funções e a complexidade desse órgão multifuncional é reflexo de seu epitélio de revestimento (SABÓIA-MORAIS *et al.*, 1996). Assim, a presença ou ausência dos distintos tipos celulares, juntamente com sua distribuição, abundância, densidade, morfologia e constituição molecular é variada entre as espécies de peixes e entre os estágios do desenvolvimento (ROCHA & SABÓIA-MORAIS, 2008).

De maneira geral, as principais células constituintes do epitélio branquial dos peixes são ionócitos (também denominadas de células do cloro ou células ricas em ricas mitocôndrias (CRMs)), células pavimentosas, células mucosas e células acessórias (EVANS *et al.*, 1999). As CRMs são os principais sítios de transporte iónicos nas brânquias, e a identificação e o estudo deste tipo celular tem sido baseado em técnicas de marcação citoquímica com lectinas, histoquímica, imunocitoquímica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. Contudo, as especificidades de cada metodologia, e o momento do desenvolvimento e da fisiologia celular são fatores a serem considerados para se identificar diferenças na distribuição dos ionócitos no epitélio branquial entre as

espécies, indicando a necessidade dos estudos morfológicos para melhor compreensão da osmorregulação.

Com o objetivo de se estudar a ontogênese da tolerância à salinidade em peixes com fecundação interna, no presente trabalho escolheu-se como sistema-modelo o guaru *Poecilia vivipara* (Block & Schneider, 1801), pertencente à ordem Cyprinodontiformes, à família Poeciliidae e à subfamília Poeciliinae. O *P. vivipara* distribui-se por toda a costa Atlântica da América do Sul e apresenta grande poder de dispersão e tolerância a variações ambientais. Assim, ele sobrevive em estuários, lagoas, canais e rios, sendo submetido a gradientes de salinidades variáveis (GOMES-JR & MONTEIRO, 2007).

O *P. vivipara* caracteriza-se como biomonitor das variações ambientais por apresentar alta sensibilidade frente a agentes tóxicos, tais como agrotóxicos (VIGÁRIO *et al*., 2006) e metais pesados (ARAÚJO *et al.*, 2001). Até o presente momento, as análises ecotoxicológicas com o guaru basearam-se em dados comportamentais e cito - histológicos de órgãos-alvo em indivíduos adultos (ROCHA & SABÓIA-MORAIS, 2008). Entretanto, alguns estudos indicam que as espécies de peixes em estágios iniciais do desenvolvimento são mais suscetíveis às variações do meio.

2. OBJETIVOS

No presente trabalho, pretendeu-se conhecer a ontogênese dos mecanismos osmorregulatórios de peixes eurialinos com fecundação interna, identificar e analisar a distribuição dos subtipos celulares dos ionócitos das brânquias e pseudobrânquias do *P. vivipara*, e caracterizar a composição de polissacarídeos dos ionócitos nos estágios de embrião, larva e alevino aclimatado à diferentes salinidades. Esse estudo contribuirá para caracterização das fases iniciais do desenvolvimento do guaru como biomonitor das alterações nos ambientes aquáticos e para a compreensão das respostas cito-fisiológicas do *P. vivipara* aclimatados à diferentes salinidade e/ou sobre condições de estresse.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Quarenta fêmeas adultas saudáveis de *P. vivipara* foram coletadas em tanques localizados na Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de

Goiás – Campus II, Goiânia - GO (16° 35' 37"S e 49° 16' 50" W) e transferidas para o Laboratório de Comportamento Celular (LCC), localizado no Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás (ICB/UFG). Em seguida, os espécimes passaram por um período de aclimatação de 48 horas em aquários de 40 litros. Esse recipiente era dotado de aeração promovida por bombas de ar. A temperatura da água foi mantida a ± 27ºC. O fotoperíodo era de ciclos com 12:12 horas claro/escuro. O quantitativo de amônia dissolvida na água era de 0µl/L a 0,01µ/L. A água utilizada continha 0‰ de salinidade, era filtrada e declorinada, com pH de 6,9 ± 0,1. Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial (alconCOLOURS®). Os restos de alimento e fezes eram removidos diariamente com auxílio de sifão, e o volume da água removido era reposto logo a seguir.

Após a aclimatação, retiraram-se aleatoriamente do tanque de adaptação vinte fêmeas no estágio final de prenhez, ou seja, com região ventral muito dilatada, e que por transparência era possível visualizar as larvas. As fêmeas foram separadas individualmente em tanques-maternidade de plástico incolor com 1,68 litros de água até o nascimento dos alevinos.

3.2. Procedimentos experimentais

Após o nascimento nos tanques-maternidades contendo AD, os alevinos foram coletados e expostos em aquários com dois litros de capacidade, contendo um litro de água em diferentes salinidades (0 ‰, 5 ‰, 10 ‰, 15 ‰ e 20 ‰), por um período total de 2 horas. Cada recipiente continha cinco animais por tratamento, totalizando 25 alevinos expostos. As mesmas condições físico-químicas, descritas para a manutenção dos espécimes adultos, foram utilizadas para a exposição dos alevinos à salinidade. Para reconstituição da salinidade, utilizou-se sal marinho comercial (Coralife - USA).

Os alevinos não foram alimentados durante a exposição, pois os mesmos não realizam alimentação exógena durante as primeiras horas pós-nascimento (ROCHA & SABÓIA-MORAIS, 2007).

Depois do nascimento e coleta dos alevinos, todas as fêmeas que pariram ou não seus filhotes foram mortas por hipotermia, seguida de decapitação, de acordo com procedimentos descritos por BRASIL (1979). Para visualização dos embriões e larvas em diferentes estágios do desenvolvimento, as fêmeas foram seccionadas ventralmente. Coletaram-se cinco indivíduos para cada fase inicial do

desenvolvimento (Fase 3 ou embrião com formato arredondado e Fase 4 ou estágio larval), totalizando 10 embriões e larvas. A avaliação e caracterização das fases do desenvolvimento foram realizadas ao microscópio estereoscópico (Metrimpex - Hungria), de acordo com ROCHA & SABÓIA-MORAIS, 2007.

Todos os procedimentos descritos foram realizados em triplicata, sendo que a primeira exposição destinou-se à análise histoquímica; a segunda aos estudos dos glicoconjugados pela citoquímica com lectinas; e a terceira à marcação das CRMs pelo método de ZIO (Iodeto de Zinco-Ósmio).

3.3. Processamento do material biológico

O primeiro e o segundo grupo de embriões, larvas e alevinos expostos a salinidades foram fixados por imersão em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) por 2 horas, e inclusos em parafina com plastificante (Paraplast, SEM, USA). O terceiro em foi fixado por imersão em ZIO (SCHREIBER & SPECTER, 1999) e inclusos em parafina com plastificante (Paraplast, SEM, USA).

Para as análises morfológicas gerais e a histoquímica clássica, obteve-se cortes histológicos de 4 µm de espessura submetidos à coloração H.E. e às reações histoquímicas para glicoconjugados – PAS, PAS + Acetilação, PAS + Acetilação + Saponificação (LILLIE & FULLMER, 1976); PAS + diastase (SPICER *et al*., 1967); PAS + Alcian Blue (AB) (MOWRY, 1956); AB pH 2,5 e AB pH 0,5 (LEV & SPICER, 1964); AB + Metilação, e AB + Metilação + Saponificação (SPICER & LILLIE,1959).

O estudo dos polissacarídeos por meio da citoquímica com lectinas foi realizado em espécimes do segundo grupo, os quais, após a fixação e microtomia, foram submetidos ao *screening* com 10 lectinas biotiniladas (**Quadro 1**) e revelado com estreptoavidina-peroxidase (Dako Co, USA). Os procedimentos para as reações citoquímicas foram feitos de acordo com PAFFARO Jr *et al.* (2003).

Para marcação das CRMs, secções histológicas de 4 µm de espessura foram submetidos à coloração com Alcian Blue pH 2,5. Os cortes histológicos foram obtidos através de secções transversais na região do segundo arco branquial. Para tanto, utilizaram-se padrões anatômicos para aquisição dos cortes. Todas as secções localizavam-se após o globo ocular e na região do opérculo. Os lados direitos e esquerdos dos espécimes eram equivalentes, para se ter a confirmação de que as brânquias utilizadas pertenciam ao segundo grupo de arcos branquiais, de acordo com os procedimentos descrito por ROCHA & SABÓIA-MORAIS (2008).

Quadro I. Dados sobre nomeclatura, origem e açúcar ligante das lectinas biotiniladas.

Abreviação comum das lectinas	Lectinas	Açúcares
SBA	Soybean Agglutinin	α-D-Galactose, α- e β-N-acetilGalactosamina
ECL	Erythrina Cristagalli Lectin	Galactose, Galactosil (β-1,4) N-acetilglicosamina
VVL-B	Vicia Villosa Lectin	α- e β-N-acetilGalactosamina
STLB	Solanum Tuberosum (Potato) Lectin	N-acetilglicosamina
LELB	Lycopersicon Esculentum (Tomato) Lectin	N-acetilglicosamina
PHA-E_4	Phaseolus Vulgaris Erythroagglutinin	N-acetilGalactosamina, estruturas complexas
UEA-I	Ulex Europaeus Agglutinin I	α-L-Fucose
WGA	Wheat Germ Agglutinin	N-acetilglicosamina e ácido siálico
MAM	*Maackia amurensis* lectin	Sia α2-3 Gal
COnA	Concanavalina A	α-D-manose e α-D-glicose

As análises foram feitas no microscópico fotônico (LEICA DMLB - USA) acoplado ao sistema de captura de imagens, utilizando-se a objetiva de 40X, e pelo programa Image Pro-Plus 6.0 (Microsoft® Window 32-bit sistems Window® XP Professional).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ontogênese branquial e surgimento das CRMs

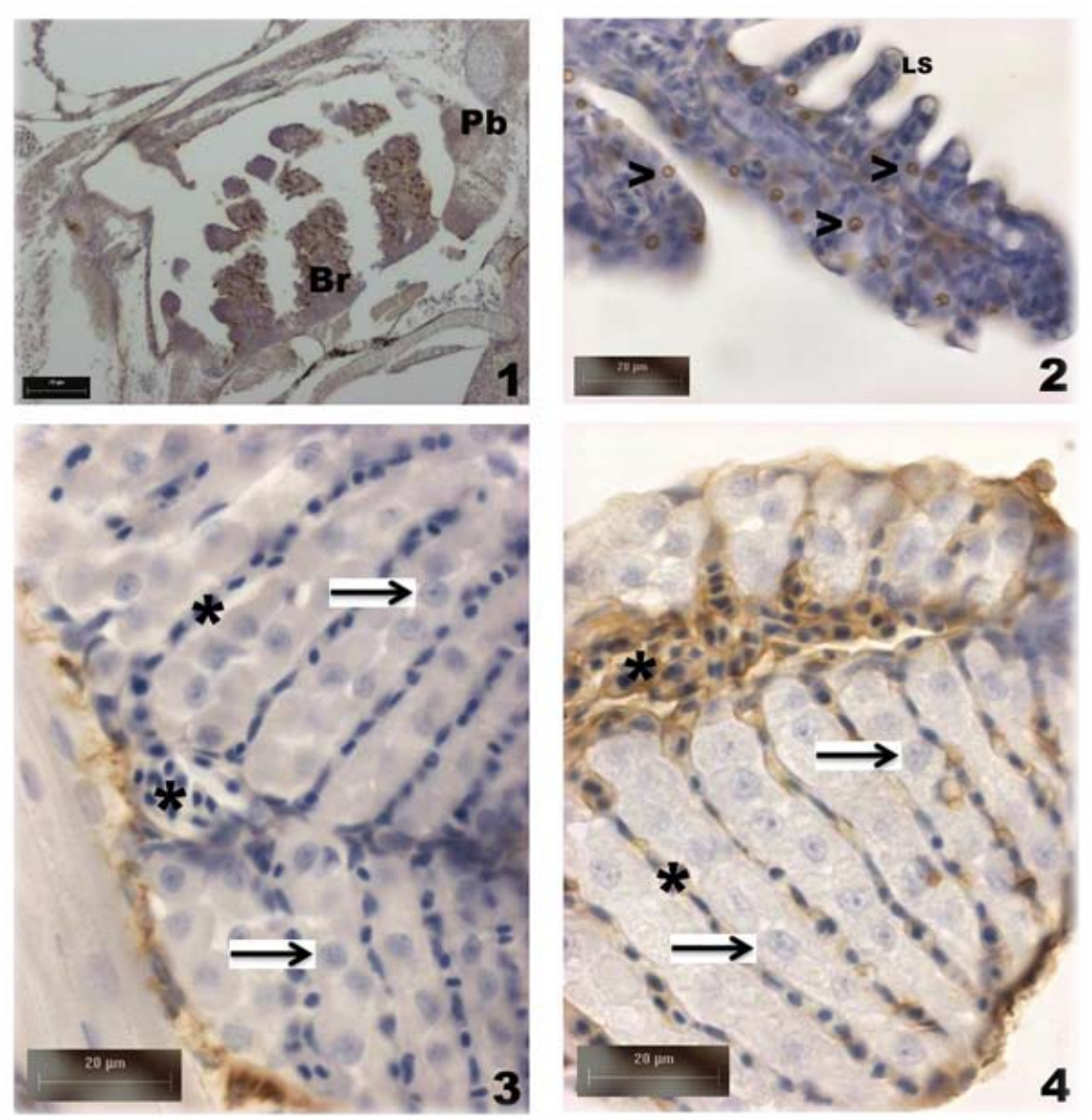
Durante a organogênese, a partir dos embriões na Fase 2, surgem os brotos dos arcos branquiais. Com o avanço do desenvolvimento do *P. vivipara*, verifica-se um aumento da área superficial do epitélio branquial com o surgimento dos filamentos e lamelas branquiais (ROCHA & SABÓIA-MORAIS, 2008) além da diferenciação e migração celular. Os arcos branquiais do guaru são estruturalmente semelhante às brânquias dos teleósteos, sendo que se verificam diferenças na distribuição e constituição celular (CALABRÓ *et al.,* 2005; DIAZ *et al.,* 2005b; VIGLIANO *et al., 2006*).

Desde os momentos iniciais da ontogênese branquial (Fase 2), observa-se as CRMs e as células pavimentososas nas regiões que originaram os filamentos branquiais. As CRMs possuem formato arredondado, matriz citoplasmática

abundante, translúcida e acidófila, demonstrando sistema de biomembranas bem desenvolvido (característica observada com a marcação pelo ZIO), núcleo elíptico com abundante eucromatina e nucléolo evidente. As características das CRMs do *P. vivipara*, desde as fases iniciais da ontogênese, é semelhante morfologicamente às CRMs descritas para outros teleósteos (PISAM *et al.,* 1980; VIGLIANO *et al., 2006;* OUATTARA *et al.*, 2009)

A distribuição das CRMs nas brânquias dos alevinos após o nascimento (Fase 7), aclimatados a diferentes salinidades (0 ‰, 5 ‰, 10 ‰, 15 ‰ e 20 ‰), é similar aquela vista nas larvas (Fase 4) que ainda estão no sistema reprodutor feminino. Ou seja, as CRMs de larvas e alevinos estão localizadas no epitélio interlamelar da base, porção média e apical do filamento branquial. Os rastelos e lamelas branquais são caracterizados pela ausência de CRMs em todas as fases do desenvolvimento (Figuras 1 e 2). A distribuição das CRMs no epitélio branquial dos peixes é variada, sendo que foi possível encontrar CRMs no epitélio interlamenlar da tilápia *Sarotherodon melanotheron* (Rüppell, 1852) (OUATTARA *et al.*, 2009), no peixe neotropical endêmico da Argentina *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) (VIGLIANO *et al., 2006)* e, ao contrário do guaru, essas células foram identificadas nas lamelas secundárias de *Cynoscion guatucupa* (Cuvier, 1930) (DIAZ *et al.,* 2005b).

A distribuição das CRMs branquiais é semelhante nos alevinos e nos adultos de *P. vivipara*, e indica que a ion/osmorregulação são desempenhadas pelas CRMs desde os estágios inicias do desenvolvimento. Assim, a fecundação interna permite que os alevinos estejam aptos para sobreviverem às distintas salinidades desde os momentos iniciais de livre natação e aumentarem seu tamanho corporal tanto em AD quanto em AS, confirmando a característica eurialina da espécie (SABÓIA-MORAIS, 1992; AMARAL *et al., 2001;* GOMES-JR & MONTEIRO, 2007).



Figuras 1-4. (1) Visão panorâmica das brânquias (Br) e da pseudobrânquia (Pb) da larva (Fase 4) de *P. vivipara* em secção longitudinal. Técnica: Lectina SBA. **(2)** Secção longitudinal das brânquias de alevinos aclimatados à 15 % de salinidade. Verifica-se as CRMs com o óstio reativo à lectina WGA no epitélio interlamelar (>) e as lamelas secundárias (LS) com ausência de CRMs. Técnica: Lectina WGA. **(3)** Secção longitudinal da pseudobrânquia de alevino exposto a 10 %. Destaca-se os vasos sanguíneos (*) e as CRMs sem óstio (setas). Técnica: lectina ECL-B. **(4)** Pseudobrânquia de alevinos de AD (0 % de salinidade) em secção longitudinal. Observa-se os vasos sanguíneos com as hemáceas reativas à lectina SBA (*), e as CRMs sem óstio (setas). Técnica: lectina SBA. Escala das barras nas figuras 1-4 = 20 µm.

Além dos quatro arcos branquiais ou holobrânquias, o *P. vivipara* possui pseudobrânquias localizadas após o globo ocular, na base dorsal do opérculo (Figuras 3 e 4). Essas estruturas não estão a vista na cavidade opercular, sendo circundadas por tecido conjuntivo frouxo. De acordo com COPELAND & DALTON

(1959), essa condição é denominada pseudobrânquia glandular, sendo característica de poucas espécies, tal como *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus, 1766). Ainda permanece obscuro as funções e a fisiologia da pseudobrânquia, sendo que alguns autores sugerem função endócrina (COPELAND, 1951), participação nos mecanismos de transporte respiratório da retina (LEINER, 1940) e relação com a bexiga natatória via anidrase carbônica (COPELAND, 1951).

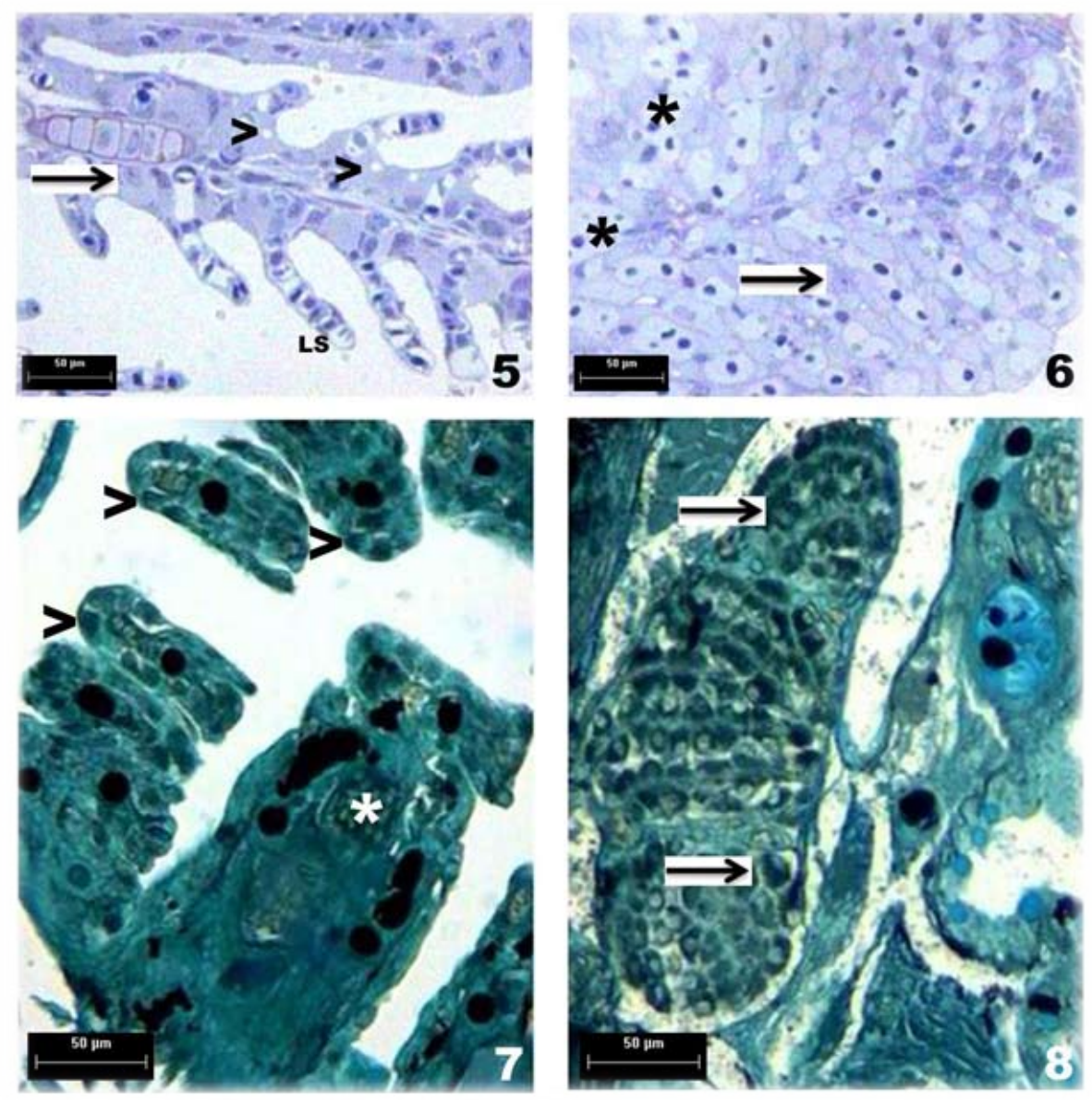
O parênquima da pseudobrânquia glandular do guaru, presente nos embriões, larvas e alevinos, é composta principalmente por um único tipo celular que se localiza próximo a vasos sanguíneos. Essa estrutura é altamente vascularizada e circundada por tecido conjuntivo frouxo (Figura 3 e 4). Sugere-se que a pseudobrânquia do *P. vivipara* não tenha aparente função respiratória, o que está de acordo com o observado e sugerido para a espécie *Fundulus heteroclitus* (COPELAND, 1958). Isso porque a área superficial do epitélio da pseudobrânquia é reduzido em relação às holobrânquias que possuem os filamentos e lamelas branquiais, e a composição celular é marcado por subtipos CRMs distinto das CRMs das holobrânquias.

4.2. Caracterização dos tipos de CRMs das brânquias e da pseudobrânquia glandular

O epitélio interlamelar das holobrânquias dos embriões, larvas e alevinos possui dois subtipos de CRMs. Observou-se o subtipo de CRMs com a superfície apical lisa e com ausência de óstio (subtipo 1), e o subtipo celular caracterizado por uma cavidade na superfície apical, especialização de membrana apical denominada de óstio (subtipo 2); (Figura 5). Subpopulações de ionócitos também foram descritos para outros peixes (HIROI *et al.,* 2005; HWANG & LEE, 2007), sendo que a variação de salinidade promove mudanças na morfologia, distribuição, quantidade e composição molecular das CRMs (OUATTARA *et al.*, 2009).

A pseudobrânquia glandular do guaru possui apenas o subtipo 1 das CRMs, sendo que a ausência de óstio foi confirmado nas secções coradas com AT pH 8,4 (Figura 6) e nas reações com as lectinas (Figuras 3 e 4). A técnica do ZIO permitiu confirmar que a pseudobrânquia gladular é composta por CRMs. Isso porque, o ZIO marca regiões celulares ricas em biomembranas, em especial as mitocôndrias. As análises ultraestruturais da pseudobrânquia de *F. heteroclitus* indica que as CRMs possuem grande quantidade de mitocôndrias, sistema vesiculotubular especializado,

e extenso retículo endoplasmático liso associado com mitocôndrias e contínuo com a membrana plasmática basolateral (COPELAND, 1951).



Figuras 5-8. (5) Brânquias de alevinos aclimatados à 10% de salinidade em secção longitudinal. Observa-se as lamelas secundárias (LS) e, no epitélio interlamelar, CRMs sem o óstio (seta) e CRMs com óstio (>). Técnica. AT pH 8,4. **(6)** Pseudobrânquia de alevino exposto à 10% de salinidade em secção longitudinal. Destaca-se as CRMs sem óstio (seta) e os vasos sanguíneos (*).Técnica. AT pH 8,4. **(7)** Branquias de embrião (Fase 3) em secção transversal (esquerda da imagem) e longitudinal (direita da imagem). Verifica-se as CRMs pouco reativas ao ZIO (>) e vaso sanguíneo branquial (*). Técnica: ZIO + AB pH 2,5. **(8)** Pseudobrânquia de embrião (Fase 3) em secção longitudinal. Destaca-se as CRMs sem óstio com forte marcação ao ZIO (setas). Técnica: ZIO + AB pH 2,5. Escala das barras nas figuras 5-8 = 50 µm.

As CRMs da pseudobrânquia glandular do *P. vivipara* apresentaram marcação com o ZIO mais intensa do que as CRMs das holobrânquias (Figura 7 e

8). Aparentemente, as CRMs da pseudobrânquias são mais ativas nas fases iniciais do desenvolvimento. Entretanto, sugere-se que o estado cito-fisiológico desses tipos celulares sejam investigados com mais detalhes através da microscopia eletrônica de transmissão tradicional, citoquímica ultraestrutural e imunocitoquímica.

4.3. Polissacarídeos das CRMs

A constituição dos polissacarídeos presentes nas CRMs foi identificada pela citoquímica com lectinas. As lectinas STLB e LELB foi reativa com o óstio das CRMs das holobrânquias e não reativa com o citosol dessas células em todos os alevinos aclimatados à salinidade (**Quadro 1**). Como demonstrado por ROCHA & SABÓIA-MORAIS (2008), os grânulos citoplasmáticos das células mucossecretoras do epitélio branquial e o muco liberado por essas células são reativos às lectinas STLB e LELB. Dessa maneira, sugere-se que alguns glicoconjugados presentes no óstio das CRMs não sejam sintetizados pelas CRMs. Assim, as células mucosas sintetizam e secretam glicoproteínas (muco) para a superfície do epitélio branquial, e parte desses glicoconjugados podem se aderir e/ou ser acumulados sobre o óstio das CRMs. As CRMs do guaru em AD *Lebistes reticulatus* (Peters, 1859) e do peixe de AS *Mugil capito* (Cuvier, 1829) também possuem alta concentração de polissacarídeos na região apical, no sistema vesiculotubular e no complexo Golgiense, confirmando que as CRMs podem sintetizam parte dos glicoconjugados presentes em seu óstio (PISAM *et al.*, 1980).

Nos alevinos expostos às salinidades de 0 ‰ a 15 ‰, verificou-se que o óstio das CRMs foi positivo à lectina ECL. Entretanto, o citosol das CRMs, com óstio reativo à ECL, foi positivo ou negativo a essas lectinas. Nesse sentido, infere-se que as CRMs sintetizam esses glicoconjugados contendo Galactose, Galactosil (β-1,4) ou N-acetilglicosamina e os transporta para a região do óstio, e a marcação distinta no citosol indica estado cito-fisiológico diferente. Ou seja, a reação positiva indica que essa molécula ainda estava presente no citosol e que a célula estava sintetizando e/ou realizando modificação pós-traducionais dessas glicoproteínas. Essa marcação distinta do óstio e do citosol das CRMs também foi verificada pela reatividade à lectina PHA-E_4 para larvas e alevinos expostos à 0 ‰, 5 ‰ e 15 ‰ de salinidade. As lectinas MAM e ConA não foram reativas para o citosol e o óstio das CRMs dos embriões, larvas e alevinos expostos à salinidade.

Quadro 2. Análise citoquímica com lectinas das CRMs branquiais; citosol das CRMs (Cit) e Óstio das CRMs (Ost). Reação positiva fraca (+) e reação positiva forte (++) à lectina; reação negativa (-); não identificação da célula nos cortes tratados com a lectina usada (N); CRM com óstio (C) e CRM sem óstio (S).

	Embrião (Fase 3)		Larva (Fase 4)		Alevino (0 ‰)		Alevino (5 ‰)		Alevino (10 ‰)		Alevino (15 ‰)		Alevino (20 ‰)	
	Cit	Ost	Cit	Ost	Cit	Ost	Cit	Ost	Cit	Ost	Cit	Ost	Cit	Ost
SBA	N	N	-	++		+	N	N	-	-	-(C)	+	-(C)	+
ECL	N	N	-	++	+(C) -(C) -(S)	++	-(C)	+	+(C) ++(C) +(S)	+	-(C)	+ *		
VVL-B	+(C) -(S)	+	N	N	N	N	-(C)	+	-	-	-(C)	+	-(C)	+
STLB	N	N	N	N	-(C)	+	-(C)	+	-(C)	+	-(C)	+	-(C)	+
LELB	N	N	N	N	-(C)	+	-(C)	+	-(C)	+	-(C)	+	-(C)	+
PHA-E_4	N	N	+(C) -(S)	+	++(C) -(S)	++	-(C)	+			-(C)	+		
UEA-1	N	N	N	N	N	N	-	-	N	N	-	-	-	-
WGA	N	N	-	-	-(C)	++	N	N	-	-	-(C)	+	+(C) -(C)	
MAM	-	-	-	-	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-
COnA	N	N	N	N										

O presente trabalho não diagnosticou diferenças significativas na constituição de polissacarídeos presente nas CRMs de embriões, larvas e alevinos aclimatados à diferentes salinidades. Possivelmente, as CRMs branquiais do *P. vivipara* necessitam de um período de aclimatação à salinidade maior do que 2 horas para renovação das moléculas de glicoconjugados presente no citosol e no óstio.

5. CONCLUSÕES

O *P. vivipara* dois subtipos de ionócitos distribuídos ao longo do epitélio intelamelar, desde a base até o ápice dos filamentos das holobrânquias. A principal diferença entre as CRMs foi a organização da membrana apical, a qual no subtipo 1 das CRMs encontra-se lisa e no subtipo 2 é especializada em óstio. Ambos os subtipos de ionócitos foram identificados desde o início da ontogênese branquial, nos embriões, Fase 2 do desenvolvimento.

Os polissacarídeos presentes no óstio do subtipo 2 das CRMs podem ser sintetizados por esses ionócitos ou serem produzidos pelas células mucossecretoras

branquiais. As análises por meio da citoquímica com lectina não diagnosticaram diferenças significativas da constituição dos polissacarídeos presentes no óstio dos ionocitos branquiais de embriões, larvas e alevinos exposto à variações de salinidade, por um período total de duas horas.

O guaru possui pseudobrânquia glandular constituída por ionócitos com características celulares distintas das CRMs das holobrânquias. Provavelmente, esse órgão desempenha funções não respiratórias ao longo da ontogênese do *P. vivipara*.

Os alevinos do guaru, desde os momentos iniciais de livre natação, tanto em água doce quanto em água salgada, possuem subtipos de ionócitos nas brânquias e na pseudobrânquia glandular que lhes possibilitam a manutenção da homeostase corporal por meio da íon/osmorregulação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, M. C.; BONECKER, A. C. T.; ORTIZ, C. H. D. Activity Determination of Na+ K+ - ATPase and Mg++-ATPase Enzimes in the Gill of *Poecilia vivipara* (Osteichthyes, Cyprinodontiformes) in Different Salinities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 44, n. 1, p.1- 6, mar. 2001.

ARAÚJO, E. J. A.; MORAIS, J. R. O.; SOUZA, P. R.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T. Efeitos de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiforme, Poeciliidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 391- 399. 2001.

BORGES-DE-OLIVEIRA, R.; ROSA, E. V.; NASCIMENTO, V.; MENEZES-FARIA, J. C. N.; VIGÁRIO, A. F.; VIEIRA, P. M.; CARDOSO, M. P.; BRESEGHELO, L.; MENEZES, J. S.; MATA, J. R.; MORAIS, J. O. R.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T. Detection of Paraneuronal Cells in Guppy (*Poecilia vivipara*) Gill Filament Epithelium Determined by Histochemistry and Transmission Electron Microscopy. **Revista de Biologia Neotropical**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 169 - 176. 2006.

BRASIL. Normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais e determinação de outras providências. Lei nº 6.638, 8 de maio de 1979. Lex, v. 43, p. 416, 1979.

COPELAND, D. E. Function of the glandular pseudobranch in teleosts, ***American Journal of Physiology,*** *v.*167, p. 775. 1951.

COPELAND, D. E. & DALTON, A. J. An Association between Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum in Cells of the Pseudobranch Gland of a Teleost. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 5, n. 3, p. 393 - 399. 1959.

DIAZ, A. O.; GARCIA, A. N.; DEVINCENTI, C. V.; GOLDEMBERG, A. L. Ultrastructure and Histochemical Study of Glycoconjugates in the Gills of the White Croaker (*Micropogonias furnieri*). **Anatomy Histology Embryology**, v. 34, p.117-122. 2005a.

DIAZ, A. O.; GARCIA, A. M.; GOLDEMBERG, A. L. Glycoconjugates in the branchial mucous cells of *Cynoscion guatucupa* (Cuvier, 1830) (Pisces: Sciaenidae). Sci. Mar., v. 69, n. 4, p. 545 - 553. 2005b.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; POTTS, T. W. Ionic transport in the fish gill epithelium. **Journal Experimental Zoology**, v. 288, p. 641 - 652. 1999.

ESAKI, M.; HOSHIJIMA, K.; NAKAMURA, N.; MUNAKATA, K.; TANAKA, M.; OOKATA, K.; ASAKAWA, K.; KAWAKAMI, K.; WANG, W.; WEINBERG, E. S.; HIROSE, S. Mechanism of development of ionocytes rich in vacuolar-type H^+-ATPase in the skin of zebrafish larvae. **Developmental Biology,** n. 329, p. 116 - 129. 2009.

GOMES-JR, J. L. & MONTEIRO, L. R. Size and fecundity variation in populations of *Poecilia vivipara* Block & Schneider (Teleostei; Poeciliidae) inhabiting an environmental gradient. **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 1799 - 1809. 2007.

HIROI, J.; MCCORMICK, S. D.; OHTANI-KANEKO, R.; KANEKO, T. Functional classification of mitochondrion-rich cells in euryhaline Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos, by means of triple immunofluorescence staining for Na+/K+-ATPase, Na+/K+/2Cl- cotransporter and CFTR anion channel. **Journal Experimental Biology**, v. 208, p. 2023 - 2036. 2005.

HWANG, P. P. & LEE, T. H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 148, p. 479 - 497, jun. 2007.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in eletron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, v. 27, p. 137 - 138. 1965.

LEINER, M., Das Atmungsferment Kohlensaureanhydrase in Tierkorper, Naturwissen-schaften, v. 28, 165. 1940.

LEV, R. & SPICER, S. S. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.12, p. 309. 1964.

LILLIE, R. D. & FULLMER, H. M. **Chemical end groups**. In: Histophatologic Technique and Practical Histochemistry (Lillie, R. D. and Fulmer, H. M., eds). New York: McGraw-Hill, p. 217 - 326. 1976.

LOBO, P. **História dos animais**. Livros VII-X. Edição: Imprensa Nacional-Casa da Moeda. Revisão de texto: Paula Lobo. Fev de 2008.

MOWRY, R. W. Alcian Blue techniques for the histochemical study acidic carbohydrates. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 4, p. 407 - 408. 1956.

OUTTARA, N. G.; BODINIER, C.; NÈGRE-SADARGUES, G.; D'COTTA, H.; MESSAD, S.; CHARMANTIER, G.; PANFILI, J.; BAROILLER, J. F. Changes in gill ionocyte morphology and function following transfer from fresh to hypersaline waters in the tilapia Sarotherodon melanotheron. **Aquaculture**, v. 290, p. 155–164. 2009.

PAFFARO,Jr, V. A.; BIZINOTTO, M. C.; JOAZEIRO, P. P.; YAMADA, A. T. Subset Classification of Mouse Uterine Natural Killer Cells by DBA Lectin Reactivity. **Placenta**, v. 24, p. 479 - 488. 2003.

ROCHA, T. L. & SABÓIA-MORAIS, S. M. T. Células mucossecretoras: origem, diferenciação e secreção durante as fases do desenvolvimento do peixe neotropical *Poecilia vivipara* (Blochii & Schneider, 1801) submetido a variações de salinidade. In: IV CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO, 2007, Goiânia. **Anais do IV COPEEX**, Goiânia, 2007.

ROCHA, T. L. & SABÓIA-MORAIS, S. M. T. Modulação do epitélio secretor branquial de embriões, larvas e alevinos (*Poecilia vivipara*) expostos a variações de salinidade. In: V CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO, 2008, Goiânia. **Anais do V COPEEX**, Goiânia, 2008.

SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; MOTA, D. L.; BITTENCOURT, A. M. Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryaline fish *Poecilia vivipara*. **Journal of Fish Biology**. v.49, n. 3, p. 545 - 548, Sep. 1996.

SCHREIBER, A. M.; SPECKER, J. L. Metamorphosis in the summer flounder *Paralichthys dentatus*: changes in gill mitochondria.rich cells. Journal **Experimental Biology**, v. 202, p. 2475 - 2482. 1999.

SPICER, S. S. & LILLIE, R. D. Saponificacion as a means of selectively reversing the methylation blockade of tissue basophilia. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 7, p. 123 - 125. 1959.

SPICER, S. S.; HORN, R. G.; LEPPI, T. J. **Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides**. In: The Connective Tissue (Wagner, B. M. and Smith, D. E., eds). Baltimore, MD: Williams & Wilkins, pp. 251 - 303. 1967.

VIGÁRIO, A. F.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; YAMADA, A. T. Toxic Action of the 2,4-D herbicide on gills epithelium and liver of the fish *Poecilia vivipara*. In: International Fish Biology Congress, VII, 2006, St. John – Canadá. **Anais do VII International Fish Biology Congress**, p. 84 - 88. 2006.

VIGLIANO, F. A.; ALEMAN, N.; QUIROGA, M. I.; NIETO, J. M. Ultrastructural Characterization of Gills in Juveniles of the Argentinian Silverside, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) (Teleostei: Atheriniformes). **Anatomy Histology Embryology**. v. 35, p. 76 - 83. 2006.

Wilkie, M. P. Mechanisms of Amnonia Excretion Across Fish Gills. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 118 A, n. 1, p. 39 - 50. 1997.

FONTE DE FINANCIAMENTO: PIBIC – CNPq / UFG.

Exposição a material biológico como fator determinante à adesão ao equipamento de proteção individual pela equipe de enfermagem[1]

Luana Cássia Miranda Ribeiro[I]
Adenícia Custódia Silva e Souza[II]

Introdução

Os profissionais de saúde da área de enfermagem ao executarem suas atividades estão susceptíveis aos vários riscos existentes no ambiente de trabalho, especialmente o risco biológico, por manusearem diretamente sangue e fluidos corpóreos de pacientes, os quais são possíveis fontes de transmissão de patógenos (CAETANO et al., 2006).

Sendo assim, a exposição a material biológico é uma das principais inquietações na área da segurança ocupacional, pois evidencia o risco e a vulnerabilidade dos profissionais da área da saúde (PAS) em adquirir infecções transmitidas por via sanguínea, pois esses PAS permanecem em um trabalho ininterrupto junto aos pacientes.

O trabalho da enfermagem tem como características desenvolver o cuidado das pessoas doentes, vivenciar perdas, e com os princípios de solidariedade e responsabilidade profissional que são bases de um cuidar humanizado. Devido a esse fator o cuidar do cuidador tem sido pouco valorizado pelos profissionais de saúde (BAGGIO, 2007).

A prática do cuidar é inerente a esta categoria profissional, porém se concentra apenas no cuidar do outro. E essa prática traz conseqüências ao profissional pela exposição aos muitos riscos no ambiente hospitalar, dentre eles o de exposição ocupacional a material biológico.

Para Marziale e Rodrigues (2002) e Tipple et al. (2004) exposição ocupacional por material biológico é a possibilidade de contato com sangue e fluidos orgânicos no ambiente de trabalho. As formas de exposição incluem inoculação percutânea por intermédio de agulhas ou objetos cortantes, e o contato direto com pele e ou mucosas. Essa exposição dependendo da gravidade pode causar redução permanente ou temporária da capacidade para o exercício da profissão.

Os acidentes por via hematogênica podem ser causados por diversos patógenos que podem ser veiculados pelo sangue e fluidos orgânicos, sendo os de maior relevância epidemiológica, os vírus da imunodeficiência humana (HIV) e os das hepatites B (HBV) e C (HCV) (SIEGEL et al., 2007).

Em virtude do risco de exposição a material biológico foram editadas as Precauções Padrão (PP) que são um conjunto de ações planejadas, que objetivam a proteção dos pacientes e profissionais e inclui o Equipamento de Proteção Individual (EPI) como uma importante medida de proteção.

EPI refere-se ao uso de barreiras utilizadas para proteger pele, mucosas e roupas do profissional do contato com agentes infecciosos (MELO, 2005) e a não adesão a essa

importante medida expõe os profissionais aos riscos, bem como aos acidentes com exposição a material biológico.

Observa-se ainda, atualmente, um alto índice de acidentes de trabalho com exposição a material biológico entre profissionais de saúde, que poderiam ser evitados com o uso correto dos EPI. Assim, o uso dos EPI constitui uma prevenção primária da exposição a material biológico, sendo considerada uma maneira segura e necessária para reduzir a exposição ocupacional a sangue e outros fluidos orgânicos (TIPPLE et al., 2003).

Contudo, o uso desses equipamentos de proteção não elimina completamente o risco de adquirir uma doença ocupacional, porém, ao serem adotados juntamente com as outras medidas das precauções padrão minimizam esse risco (BALSAMO; FELLI, 2006).

Percebe-se que o uso dos EPI estão relacionados com a percepção que os PAS possuem em relação à susceptibilidade dos riscos a que estão expostos no ambiente de trabalho. Para Souza (2001) a percepção desses riscos é que levará os PAS a aderirem às medidas sabidamente eficazes para a sua proteção.

Keller et al. (2005), identificaram em estudo que o equipamento de proteção era utilizado pelas enfermeiras de maneira diferenciada, sendo seu uso baseado no nível de risco durante o trabalho e de acordo com a interação com o paciente.

Mesmo diante de inúmeros estudos que evidenciam a seriedade dos acidentes envolvendo materiais biológicos, ainda observa-se na prática a subestimação dos riscos e o menosprezo do empregador e empregado, variáveis que interferem na segurança do trabalho e reforçam o comportamento de desproteção. A falta de consciência dos riscos ocupacionais pode explicar esse tipo de comportamento (DAMASCENO et al., 2006).

A importância da prevenção primária e a segurança do uso das normas recomendadas para evitar o acidente ao trabalhador é relatada em diversos estudos (SOUZA, 2001; MELO, 2006), porém muito pouco se conhece sobre o que leva os profissionais a adotarem comportamentos seguros ou não em seu ambiente de trabalho.

Assim, este trabalho foi impulsionado pela observação da realidade prática dos trabalhadores de enfermagem que ainda executam suas atividades sem uso de EPI, como se as situações não apresentassem risco algum para sua saúde. Esses profissionais não têm sido capazes de transformar a sua realidade cotidiana referente à adoção dessa importante medida de prevenção e controle de infecção nos Serviços de Assistência à Saúde (SOUZA, 2001).

Considerando o que foi exposto, objetiva-se analisar a exposição a material biológico como fator de adesão ao uso do equipamento de proteção individual pelos trabalhadores de enfermagem.

Trajetória Metodológica

Estudo exploratório, de abordagem qualitativa, com caráter descritivo analítico realizado em um hospital-escola de grande porte da região centro-oeste. Optou-se por essa abordagem, pois ela admite a imersão nos dados por meio de uma perspectiva interpretativa, o que

permite a elucidação clara das mudanças de comportamento relacionadas a acidentes ocupacionais.

Fizeram parte do estudo profissionais da área de enfermagem, dentre eles, enfermeiros e técnicos em enfermagem que trabalhavam nas diversas unidades do hospital em estudo. Optou-se por estudar somente esse grupo, pelo fato de constituírem uma das principais profissões sujeitas à exposição por material biológico e não era de interesse do estudo avaliar as categorias separadamente, apenas as mudanças no comportamento dos sujeitos envolvidos.

Para a participação na pesquisa foram considerados os seguintes critérios de inclusão: disponibilidade para participar da pesquisa; interesse pela temática; voluntariedade e concordar em participar do estudo assinando o termo de consentimento livre e esclarecido.

Para a seleção dos sujeitos, a pesquisa foi divulgada no hospital por meio de visitas da pesquisadora às diversas unidades do hospital em estudo, e em diferentes turnos de serviço. Os profissionais que se dispuseram foram inseridos em uma listagem com os respectivos horários disponíveis para posterior definição. Nessa listagem cinquenta e sete (57) profissionais mostraram-se interessados na pesquisa.

Os interessados foram contactados por telefone, a fim de estabelecer um melhor horário para a realização das sessões grupais. Estabelecidos os horários consensuais somente trinta e cinco (35) profissionais confirmaram sua participação.

Nos dias aprazados para as sessões apenas quinze (15) profissionais compareceram e foram sujeitos da pesquisa.

A coleta de dados ocorreu no período de novembro a dezembro de 2008 por meio da técnica do grupo focal. A utilização do grupo como técnica de pesquisa tem se tornado escolha comum entre pesquisadores da área da saúde, pois conta com vantagens que as entrevistas individuais não abordam, além de facilitar o acesso ao cotidiano das pessoas no seu próprio ambiente, devido a interação na relação: pesquisador - pesquisado (MUNARI et al., 2008).

Elegeu-se a técnica do grupo focal, por ela também permitir uma reflexão crítica do tema abordado e a compreensão dos processos de construção da realidade dos PAS sem julgamentos de valores, desvelando a sua realidade, interagindo e ensinando-se mutuamente.

Foram realizados três grupos focais, compostos de cinco sujeitos da área de enfermagem em cada grupo. As sessões grupais tiveram duração de aproximadamente duas horas e eram realizadas em ambientes que melhor se adequavam às possibilidades dos participantes, com vistas a garantir sua privacidade e comodidade, mediante questões previamente planejadas.

A previsão era de três sessões grupais com cada grupo focal, sendo essas, sujeita a mudanças, pois para Dall'Agnol e Ciampone (1999) o número de sessões deve permitir a ampliação e o detalhamento do tema, sendo que a sistemática repetição das idéias ou informações é um indício de que a coleta foi eficiente.

O número de participantes (cinco) em cada grupo, contribuiu para a discussão exaustiva, o que permitiu o alcance dos objetivos propostos, devido ao aprofundamento da temática, levando os pesquisadores a encerrarem com uma única sessão em cada grupo. Há

situações em que um único momento grupal é suficiente para se levantar e discutir questões que explorem o tema de forma tal que o pesquisador sinta-se contemplado em seus objetivos (MUNARI et al., 2008).

A coordenação do grupo ficou a cargo da pesquisadora e de duas auxiliares de pesquisa que tiveram o papel de observadores do movimento do grupo, promovendo anotações pertinentes à pesquisa.

As sessões foram gravadas, transcritas e analisadas por meio do método de interpretação de sentidos proposto por Minayo (2006). Após leitura exaustiva das falas, extraímos duas categorias temáticas, denominadas de "Adesão ao EPI" e "Acidente no ambiente de trabalho".

Nesse sentido, os relatos apresentados nos resultados e discussão foram selecionados, tendo-se por critério, aqueles que melhor caracterizavam as categorias e os fragmentos das falas dos grupos foram identificadas por grupos (I, II e III).

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, onde obteve homologação, sob o número 15/08, obedecendo às normas éticas legais preconizadas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Resultados e Discussão

Neste estudo contamos com a participação de quinze profissionais da área da enfermagem, sendo dez técnicos (três homens e sete mulheres) e cinco enfermeiras, distribuídos nas unidades de clínica cirúrgica, unidade de terapia intensiva (UTI), maternidade, pronto socorro (PS), centro de material e esterilização (CME) e serviço de controle de infecção hospitalar (SCIH). Em relação ao turno de trabalho, seis participantes eram do turno da tarde, seis da manhã e dois realizavam plantões de dozes horas.

Em geral, os sujeitos desse estudo trabalham na área da enfermagem há aproximadamente dez anos e demonstraram apresentar experiência nas questões profissionais.

Optou-se pela formação heterogênea dos grupos; considerando que o acidente profissional ocorre no cotidiano e nas relações de trabalho independentemente da área de atuação. Para Westphal, Bógus e Faria (1996) no cotidiano profissional as relações se dão entre diferentes níveis hierárquicos, e que as situações grupais são reproduções do que ocorre fora dos grupos.

Percebemos que o fato de reunir enfermeiros e técnicos/auxiliar de enfermagem não interferiu na expressão livre de idéias e contribuiu para explicitar atitudes que ocorrem de forma oculta na relação profissional e também para esclarecer razões que levam a determinados comportamentos. A seguir, apresentamos um panorama geral da dinâmica dos encontros.

O primeiro grupo focal ocorreu no início da manhã e de doze sujeitos confirmados para a sessão compareceram ao encontro cinco participantes (três enfermeiras e dois técnicos de enfermagem), além da equipe de pesquisadores. Os sujeitos participaram expondo suas idéias, destacando suas percepções em relação ao acidentes ocupacionais, especialmente, nos aspectos referentes à influência do ambiente do trabalho, assim como, nos aspectos gerenciais e organizacionais que interferem na prevenção e controle dos acidentes com material biológico.

O segundo grupo focal foi realizado no período da tarde, no auditório, dos quatorze confirmados compareceram cinco participantes, todos técnicos em enfermagem, do sexo feminino. Havia profissionais que não trabalhavam no período da tarde, mas vieram ao hospital exclusivamente para participar do encontro, revelando assim, interesse e compromisso tanto com o grupo, quanto com a pesquisadora.

O terceiro grupo focal foi realizado no período da tarde e dos nove confirmados, compareceram cinco sujeitos, sendo três técnicos de enfermagem (um homem e duas mulheres) e duas enfermeiras. Nesse grupo também tiveram profissionais que estavam de folga e se deslocaram de grandes distâncias para estarem presentes no grupo.

Assim, os relatos dos três grupos focais foram agrupados e identificados em: Grupo I, Grupo II e Grupo III. As entrevistas foram desdobradas em duas categorias temáticas: "Adesão ao equipamento de proteção individual" e "Acidente no ambiente de trabalho", que discutiremos a seguir.

Adesão ao Equipamento de Proteção Individual

Nesta categoria temática os sujeitos relataram que apesar do EPI representar proteção, o seu uso não elimina o risco de se acidentar e de adquirir uma doença ocupacional. Para alguns grupos o não uso do EPI leva ao acidente de trabalho, no entanto para outros a exposição a material biológico não é um fator determinante para a adoção de um comportamento seguro.

Quando analisamos os discursos dos grupos percebemos que após acidente com material biológico a adesão ao EPI pode ser permanente, temporária ou não adesão.

> *"Eu estava com EPI, sempre usei, não deixo de usar, mas agora que eu uso mesmo! Porque quando você passa por uma situação dessa* (acidente com material biológico)*, que você fala "Meu Deus", quantas coisas eu posso adquirir." (Grupo I)*

> *"Aí fiquei em acompanhamento dois anos fazendo os testes direto, nada deu, nunca deu. Mas aí eu fiquei com medo, aí comprei um tênis, eu detesto tênis, mas só vinha de tênis. Foi só durante o acompanhamento. Fiz os exames e não deu nada e aí eu comecei a usar sandália aberta de novo, tá vendo só!" (Grupo II)*

> *"Eu já fui acidentada, graças a Deus não deu nada, mas eu continuo a não calçar a luva. Só calço na hora que eu vejo ela (a gerente)" (Grupo II)*

Na fala do grupo I podemos observar mais atenção quanto ao uso do EPI após acidente com material biológico.

Já na segunda fala (grupo II) há referências de alterações nas ações de sua prática assistencial por breve espaço de tempo e o último relato que podemos observar acima, o grupo afirma que o acidente não causou repercussão alguma em sua vida profissional, o que gerou uma preocupação nos pesquisadores, pois discute-se a questão do conhecimento acerca dos riscos envolvidos nos acidentes.

Para alguns, o medo de adquirir uma doença ocupacional leva a uma adesão permanente aos EPI, como percebido na primeira fala. A adesão temporária é observada somente durante o acompanhamento do profissional acidentado, e fica bem explícito que o fato de não gostar de usar sapato fechado constituiu-se numa barreira para a não adesão permanente a essa medida protetora. Contudo para outros sujeitos a exposição a material biológico não foi um forte motivador para a adoção de um comportamento preventivo.

A exposição ocupacional e o acompanhamento do profissional acidentado geram um abalo emocional e repercutem na vida desses profissionais conseqüências nos âmbitos pessoais, psicológicos, sociais e familiares. Diante disso, a preocupação em adquirir uma doença ocupacional influencia positivamente a mudança de comportamento em direção a proteção. A adoção de práticas seguras no ambiente de trabalho está diretamente relacionada ao olhar desses trabalhadores para a possibilidade de ocorrência dos acidentes e esse olhar depende dos seus valores, crenças e da percepção dos riscos de exposição.

Estudo mostrou que o uso do EPI é dificultado por fatores como falta de hábito, indisponibilidade e inadequacidade desses equipamentos, desconforto, esquecimento e descuido (NISHIDE; BENATTI, 2004).

Para aqueles que assumiram comportamento de mudança permanente os acidentes trouxeram conseqüências positivas, uma vez que foi indicador de conduta de segurança e segundo Damasceno et al. (2006) contribui para a diminuição da ocorrência de acidentes e serve como um alerta em suas vidas, provocando uma mudança de postura profissional.

Segundo Lima, Pinheiro e Vieira (2007) os profissionais tem conhecimento acerca do tema e sabem que a mudança de comportamento é imprescindível para que não ocorra um novo acidente.

> *"Eu não, eu dou meia volta, vou atrás da luva, depois a gente resolve isso" (Grupo II)*

Essa fala representa a consciência e a percepção acerca dos riscos pelos sujeitos da pesquisa, evidenciando a importância da adesão aos equipamentos de proteção ao realizarem as atividades no ambiente de trabalho.

Os profissionais que realizam procedimentos repetitivos e monótonos em ritmo acelerado estão mais expostos ao risco, pois gera desgaste e diminui a percepção acerca do risco. O que leva à necessidade de reorganização das atividades (BALSAMO; FELLI, 2006).

Caixeta e Barbosa-Branco (2005) encontraram em seu estudo diferença estatística significativa para as variáveis: conhecimento sobre biossegurança, definição sobre biossegurança, risco de transmissão, uso de quimioprofilaxia e aceitação da quimioprofilaxia. Eles concluíram que uma há uma maior adesão aos EPI por aqueles que apresentam uma noção do risco.

> *"Eu também trabalho na unidade de emergência e às vezes lá não temos luva. Acontece demais de chegar paciente esfaqueado, sangrando, de tudo quanto é jeito, e a gente tem de socorrer sem luvas. Lá falta tudo, então chega paciente sangrando, a gente não vai deixar o paciente lá morrer de perder sangue, a gente passa uma atadura lá sem luvas. Esses dias pra trás chegou um paciente lá, ele estava subindo a escada caiu e quebrou a perna .. e ele sangrava que não parava mais, nós tivemos que fazer desse jeito." (Grupo II)*

Esse relato discute a importância do cuidado com o outro em detrimento do próprio, é uma barreira muito discutida, pois impedem os profissionais a aderirem adequadamente ao uso de EPI, concomitantemente com o cuidado do outro, tem também a pressa pela escassez de recursos humanos, uma possível não percepção do risco, além da falta de recursos materiais.

Para Souza (2001), algumas barreiras que impedem a adesão dos profissionais ao uso de EPI são ausência de EPI ou o seu tamanho inadequado, falta de recursos financeiros, estrutura organizacional e a pressa.

A imprevisibilidade e a necessidade de cuidar do outro é uma característica importante desses profissionais que se vêem na obrigação de realizar qualquer procedimento sem as devidas proteções em prol da saúde do outro.

Marziale e Rodrigues (2002) associam como fator de risco para exposição além do design dos materiais que não oferecem segurança no manuseio dos mesmos, o comportamento dos próprios profissionais. Dados que corroboram com nosso estudo como evidenciado na fala a seguir.

> *"É complicado, na minha clínica esses dias mesmo teve um pequeno acidente. A pessoa sempre ia de sapato aberto e um dia ela abriu o expurgo e de repente caiu uma placenta no pé, sujou o pé dela tudo, aí nas duas próximas semanas ela começou a ir com sapato fechado ... duas semanas ela ficou indo de sapato fechado, agora tá indo de sandália de novo todos os dias ... é complicado, é questão de comportamento mesmo, e é complicado você mudar, é complicado mesmo ... a gente fala e a gente pega no pé e fala e não adianta, não adianta." (Grupo III)*

> *"... uma teve acidente com perfurocortante e por causa da luva grossa o risco dela diminuiu e nem chegou a furar o dedo dela." (Grupo I)*

Observa-se que a percepção individual sobre os riscos em algumas pessoas é baixa, acarretando na não adesão ao uso e essa falta de conscientização leva aos acidentes com materiais biológicos.

Estudo verificou que em 73% dos acidentes houve a presença de sangue e 20,83% não estava fazendo uso do EPI e a justificativa exposta pelos trabalhadores foi que teoricamente

não continha em si o risco de exposição ao material biológico, isso demonstra a não percepção ou desconhecimento do risco no qual estão expostos esses trabalhadores (BALSAMO; FELLI, 2006).

Malaguti et al (2008) relatam que os principais motivos que determinam a ocorrência de acidentes na unidade são: resistência do profissional ao uso dos EPI, descarte inadequado de materiais contaminados, crença do profissional em que o acidente não ocorrerá com ele. Em relação à instituição o número inadequado de profissionais e materiais sem dispositivo de segurança.

Segundo Murofuse, Marziale e Gemelli (2005) a não adesão às medidas de precaução indica a importância de estabelecimento de novas estratégias com o intuito de aumentar a segurança na unidade hospitalar.

Entretanto, Caixeta e Barbosa-Branco (2005) afirmam não haver influência entre o fato de os profissionais de saúde afirmarem ter conhecimento do conceito de biossegurança no coeficiente de acidentabilidade de trabalho e a prática do uso de EPI. E a capacitação recebida pelos profissionais de saúde, com conteúdo sobre biossegurança, nos últimos dois anos não diminuiu o coeficiente de acidentabilidade de trabalho envolvendo material biológico. O que nos faz repensar sobre as diferentes estratégias para que haja resultado na adesão e reavaliar as atividades de educação permanente nos ambientes de saúde, propondo abordagens que possibilitem a construção de um conhecimento que seja capaz de transformar a prática desses profissionais.

E essa relação entre conhecimento e adesão para Caixeta e Barbosa-Branco (2005), demonstrou que eles têm conhecimento das medidas, porém por não aderirem demonstra uma percepção fraca do risco, pois se o profissional conhece a soropositividade ele faz uso das barreiras. Por outro lado a adesão aos EPI por si, não eliminam todos os riscos pois apesar deles acidentes ainda podem ocorrer.

> *"Eu tenho meu óculos individual e já aconteceu também na outra unidade que eu trabalho de ocorrer acidente com a pessoa toda paramentada, tudo certinho, e a gotícula ir lá passar e cair no olho" (Grupo II)*

Essa fala discute o uso adequado de EPI e a ocorrência de acidentes, demonstrando que EPI por si só não representa total segurança para o trabalhador, apesar de diminuir os riscos.

Balsamo e Felli (2006) relatam que a aplicação das precauções por si só não é o suficiente para garantir total segurança ao trabalhador, então há estratégias que também devem ser revistas como as mudanças de comportamento e repensar as causas dos acidentes que serão discutidas a seguir.

Acidente no ambiente de trabalho

Nesta categoria observou-se que as principais causas do acidente relatadas pelos grupos foram sobrecarga de trabalho, falta de atenção e descarte inadequado de perfurocortantes.

As consequências relatadas após os acidentes foram o medo e a preocupação em adquirir um doença ocupacional e como o acidente reflete na vida de outras pessoas (efeito dominó).

> *"Só porque você jogou uma agulha contaminada no lixo comum, então você não tem noção e não tem consciência daquilo" (Grupo I)*

> *"A NR-32 ela fala muito isso que o responsável pelo descarte do material utilizado, perfurocortante é quem utiliza, mas na maioria o envolvido não é o próprio que utiliza e o que acontece ... faz os procedimentos e tal e embrulha lá muitas vezes as suas bandejinhas, quer dizer uma outra pessoa que vai manusear. Eu já tive um acidente dessa forma no setor onde eu trabalho, então a colega foi abrir o material né?" (Grupo III)*

Na fala do grupo III há um enfoque no descarte adequado de materiais perfurocortantes, que é um fator importante para a diminuição de ocorrência de acidentes envolvendo materiais biológicos.

Em estudo os acidentes com perfurocortantes representou 70% do total de acidentes, sendo a principal causa o descarte inadequado desses materiais em lixos comuns e até mesmo no chão (BALSAMO; FELLI, 2006).

Corroborando com os achados dessa pesquisa, Lima, Pinheiro e Vieira (2007) encontraram em seu estudo como fatores determinantes de acidentes a sobrecarga de trabalho, o não uso de EPI, o reencape de agulhas e o descarte incorreto dos materiais perfurocortantes.

Marziale e Rodrigues (2002) discutem a questão da negligência médica contribuir para a ocorrência de acidentes.

Outro agravante relacionado a acidente ocupacional é a sobrecarga de trabalho que será discutida a seguir.

> *"Primeiro o acidente ocorreu não era no serviço que estava a meu encargo. É porque era para fazer os HGT. Só que o funcionário precisava ir almoçar se não ia perder o horário do almoço, então eu disse: Vai que eu faço o HGT para você ... pouco funcionário, a situação estava difícil .... Não precisa fazer tudo de manhã vamos priorizar o que é mais urgente. Se não for urgente e se der para fazer tudo bem, se não der, vamos dividir com o período da tarde e a noite. Porque nessa correria querendo fazer tudo de uma vez, você acaba manejando o material de forma inadequada, com pressa e se acidenta, foi o que aconteceu comigo. É isso ai." (Grupo I)*

Nessa fala do grupo I podemos observar como a sobrecarga de trabalho influencia nos acidentes ocupacionais.

Rapparini et al. (2007) relatam que muitas vezes o acidente independe do uso de EPI e pode acontecer por motivos variados, como por exemplo: descuido, pressa ou cansaço. Souza (2001) e Marziale e Rodrigues (2002) trazem relatos relacionados a pressa e sobrecarga de trabalho, fatores que contribuem para a ocorrência de acidentes.

Em pesquisa realizada os trabalhadores relataram que os profissionais ficaram mais expostos a material biológico devido ao ritmo acelerado de trabalho e aos aspectos relacionados ao gerenciamento de todo o serviço (BALSAMO; FELLI, 2006), corroborando com

nossos achados que também discutem a sobrecarga de trabalho atribuída à pressa na realização das atividades.

O contexto das atividades assistenciais conduz o profissional de enfermagem a trabalhar em um ritmo acelerado, a fim de que todas as ações previstas possam ser executadas durante as suas horas de trabalho. Por essa razão, muitos profissionais executam o cuidado sem uma reflexão sobre o seu fazer, o que pode comprometer a qualidade e impedir um planejamento para o desempenho das suas inúmeras atribuições, podendo desta forma, gerar desgaste do trabalhador, expondo-o a acidentes de trabalho (OLIVEIRA; KLUTHCOVSKY; KLUTHCOVSKY, 2008).

"Fazendo um HGT ... olha pro lado e cai e perfura" (Grupo III)

Foi discutido também a questão da desatenção e a relação com os acidentes, como podemos perceber na fala acima.

A desatenção, e o descuido dos profissionais foram abordados por Lima, Pinheiro e Vieira (2007) e Rapparini et al. (2007), que ressaltam a importância de maior atenção e cuidado para reduzir o risco de ocorrência de novos acidentes.

Em estudo realizado em São Paulo, observou-se que os profissionais atribuíam a imprevisibilidade, falta de atenção e cuidados como as principais causas dos acidentes de trabalho, assumindo assim a culpa pelos acidentes (BALSAMO; FELLI, 2006).

Murofuse, Marziale e Gemelli (2005) ressaltam que a responsabilidade pelo acidente não pode ser exclusivamente do profissional, tendo em vista a precariedade das condições de trabalho, a estrutura organizacional e gerencial, o ritmo acelerado, a dupla jornada como forma de complemento da renda familiar que também representam importantes fatores para o desencadeamento dos acidentes.

Contribuindo com ao achados dessa pesquisa Damasceno et al. (2005) e Malaguti et al. (2008) encontraram também como causas relacionadas aos acidentes com material biológico, o descuido, as condições do paciente, a não observação das medidas de prevenção, o excesso de auto-confiança, a inadequação dos materiais, equipamentos e estrutura, pressa, e sobrecarga de trabalho.

Em relação às conseqüências dos acidentes, os sujeitos relataram medo, preocupação e como o acidente reflete na vida de outras pessoas.

> *"Medo dos riscos, porque eu já vi muita colega contaminada. Uma colega contaminou com um paciente HIV na clínica Z, ela era voluntária e ela estava sem luvas, puncionou com o escalp, tirou o escalp, deixou a agulha escapar e se contaminou" (Grupo II)*

Essa fala demonstra o medo dos riscos de adquirir doenças ocupacionais. Esse medo pode ser um fator que contribua positivamente para o uso do EPI, pois para ele representa uma proteção.

Lima, Pinheiro e Vieira (2007), observaram que após os acidentes sentimentos como medo, angústia, desespero, ansiedade e tensão, são vivenciados pelos PAS, corroborando com os dados dessa pesquisa.

Damasceno et al. (2006) evidenciaram outros sentimentos como, preocupação, pânico, medo da contaminação, tranqüilidade e segurança, preocupação com a família, raiva, descrédito nos homens e apego à religiosidade, preconceito e discriminação, raiva, culpa, dor, preocupação com o paciente e nojo.

Uma das principais conseqüências do acidente para o profissional é o risco de adoecer, pois isso pode gerar uma incapacidade física temporária, ou permanente com risco de morte (MALAGUTI et al., 2008).

Após o primeiro relato de infecção por doenças infecto-contagiosas em ambiente profissional os PAS apresentaram uma grande preocupação com a ocorrência de acidentes com material biológico, levando a sentimentos de medo da contaminação, pois essas doenças podem ser fatais, além de representarem preconceito e estigma.

A experiência de um acidente com material biológico provoca diferentes tipos de reações nas pessoas, cada indivíduo demonstra-se segundo os seus valores, conceitos, conhecimento, enfim vem à tona o que chamamos de subjetividade (DAMASCENO et al., 2006).

Segundo Marziale e Rodrigues (2002) a exposição ocupacional não tem consequências só vinculadas às infecções, mas também ao trauma psicológico devido uma possível soroconversão que tem que provocar mudanças de comportamento como por exemplo efeito colateral das drogas profiláticas, mudanças nas práticas sexuais entre outros.

> *"Seria o efeito dominó ou efeito babel... Aquele acidente não vai refletir só na vida da pessoa porque de uma certa forma reflete no psicológico, no social, no econômico e na vida famíliar..." (Grupo I)*

Segundo Murofuse, Marziale e Gemelli (2005) o acidente pode extrapolar a dimensão individual, gerando repercussão nas diversas formas de relacionamento humano. Como podemos perceber na fala acima.

Malaguti et al. (2008) descrevem que problemas emocionais, ligados a possível infecção e insegurança no resultado de exames, podem levar a instabilidade familiar e com os seus parceiros.

Em relação ao fluxograma de atendimento ao profissional acidentado, as falas mostram que após o acidente algumas pessoas se preocupam com o protocolo para acidentes. Há relato de bom atendimento ao acidentado e também de dificuldade para ser atendido no serviço em que trabalha.

Outro ponto que vale ser ressaltado é o fato dos profissionais não relatarem os acidentes pelo medo de perder o emprego, por representar ineficiência da parte do trabalhador.

> *"ficou de lição do acidente, foi que a partir daí eu consegui entender melhor o protocolo de atendimento para acidentes com perfurocortante, daí procurei os*

> *papéis, li sobre os protocolos, para ficar claro na minha mente como funcionava" (Grupo I)*

Os dados mostram que ao se acidentarem alguns profissionais não conheciam o fluxograma de atendimento pós exposição. Esse fluxo de atendimento deveria estar exposto, além de ser divulgado em todo o serviço, o profissional deveria ser informado das condutas a serem tomadas, pois segundo a portaria nº 777 do Ministério da Saúde o acidente com material biológico é de notificação compulsória (BRASIL, 2004).

> *"me acidentei, fui atendida, aqui é atendida na hora que a gente se acidenta e fui encaminhada para o ambulatório de doenças parasitárias e estou em processo de refazer os exames, fazendo acompanhamento" (Grupo I)*

Outros profissionais conheciam o fluxo e foram bem atendidos, dando seguimento ao protocolo e ao acompanhamento. Por se tratar de sujeitos de uma mesma instituição, os dados sugerem que em alguns setores, talvez por diferenças gerenciais, as questões relacionadas à segurança ocupacional são mais bem trabalhadas.

Após um acidente com material biológico as pessoas preocupadas e necessitam de acompanhamento das ações e direcionamento das atitudes, pois são muitos os sentimentos e o caráter emergencial envolvidos nesse momento.

Além do que, as estatísticas obtidas por meio da notificação desses acidentes são importantes fontes de informação para o desempenho das atividades laborais com mais segurança, uma vez que diante do conhecimento do contexto e da ocorrência dos acidentes, é possível estabalecer estratégias visando reduzir o número de acidentes (MUROFUSE; MARZIALE; GEMELLI, 2005).

> *"porque até naquele momento, a instituição, a secretaria municipal de saúde do município não tinha conhecimento do que fazer em caso de acidente. Precisei tomar medicação por quase 12 horas, tomei a medicação depois continuei o acompanhamento e graças a Deus não deu nada." (Grupo I)*

> *"procurei a CCIH, tinha um médico lá e ele já fez o pedido, porque aqui também tem isso, eles falam principalmente quando nós fazemos o curso de sistematização, que é muito fácil, você se acidenta, você vai lá no Pronto Socorro e não é assim ... então nós mesmas que demos encaminhamento em tudo se não ia esperar um tempão. "(Grupo II)*

As falas mostram o descontentamento com o atendimento oferecido aos profissionais acidentados, além do descompasso desse atendimento, às vezes os papéis estão sendo deturpados gerando problemas sérios para o profissional acidentado.

Os acidentados vivenciam dificuldades no ambiente de trabalho e essas envolvem o descaso, desrespeito, atendimento desumanizado, podendo gerar seqüelas para todos os outros profissionais, bem como na qualidade do serviço prestado nos serviços de assistência á saúde (MUROFUSE; MARZIALE; GEMELLI, 2005)

No que se diz respeito à notificação de acidentes recomenda-se o uso de protocolos de registro, avaliação, aconselhamento, tratamento e acompanhamento. Os acidentes deverão

ser registrados com informações sobre condições do acidente, dados do paciente-fonte e dados do profissional de saúde. O acompanhamento clínico-laboratorial deverá ser realizado para todos os profissionais de saúde acidentados que tenham sido expostos a pacientes fonte desconhecidos ou com infecção pelo HIV e/ou hepatites B e C, independente do uso de quimioprofilaxias ou imunizações (BRASIL, 2004).

Caixeta e Barbosa-Branco (2005) relatam que o fato da comunicação do acidente de trabalho ser procedimento facultativo é um problema grave e sugere ser de notificação compulsória, além do estabelecimento de rotinas relacionadas às precauções imediatas, bem como as orientações quanto ao acidente e uso de quimioprofilaxia estarem disponíveis nas unidades.

Em congruência a esse pensamento a Portaria nº 777 do Ministério da Saúde estabelece que todo acidente com material biológico deve ser de notificação compulsória, por meio da ficha de notificação segundo o fluxo do sistema de informação de agravos de notificação (BRASIL, 2004).

A participação de enfermeiros em cargos de coordenação é essencial nas questões referentes à notificação dos acidentes de trabalho, pois além de registrar oficialmente o acidente, orienta os profissionais nas medidas a serem tomadas e ajuda a instituição na implementação de medidas para esse tipo de acidente (MALAGUTI et al., 2008).

Segundo Balsamo e Felli (2006) toda instituição de saúde deve ter um protocolo que rege todas as ações acerca do acidente com material biológico, as recomendações profiláticas pós-exposição e o acompanhamento desse profissional acidentado.

Em comparação com as falas pudemos perceber a falta de rotina, ou pelo menos da divulgação desse protocolo entre os profissionais.

Apesar da existência de recursos para minimizar o risco de acidentes com exposição a material biológico, o que se percebe é que existe uma baixa adesão, pelos profissionais, a esses recursos e quando ocorrem acidentes, embora as medidas pós-exposição sejam claras e oficialmente recomendadas, o que se vê na prática é o descaso com a notificação, impedindo o acompanhamento do acidentado, potencializando seu risco.

Considerações Finais

Analisando a exposição a material biológico como fator de adesão ao uso do equipamento de proteção individual pelos trabalhadores de enfermagem observou-se que a experiência desta exposição influencia em maior ou menor escala na mudança de comportamento para a adoção ao EPI.

Contudo essa mudança de comportamento nem sempre foi duradoura e, em algumas situações nem ocorreu. Os dados revelam que essas atitudes de mudanças são extremamente individuais, e estão relacionadas com os valores, crenças, conhecimento, percepção do risco, enfim com a percepção do contexto relacionado ao ambiente e aos aspectos organizacionais e gerenciais.

Observou-se também que a convivência com os riscos e a repetição monótona dos procedimentos favorecem a diminuição da percepção dos riscos pelos profissionais, o que dificulta a tomada de decisão para a adoção de medidas preventivas.

Evidencia-se também a necessidade de ter um protocolo estabelecido, com condutas claras que sejam conhecidas e discutidas pelos profissionais, além do melhor atendimento aos acidentados, diminuindo os aspectos burocráticos que emperram esse atendimento, promovendo assim, maior segurança ao trabalhador.

Este trabalho mostrou a necessidade de buscar estratégias de intervenção capazes de modificar o comportamento dos PAS para uma maior adesão e minimizar as estatísticas dos acidentes de trabalho bem como as doenças ocupacionais.

Considera-se imperioso promover discussões sobre o tema, levando o trabalhador a repensar a sua prática e atuar de forma mais segura e autônoma. Para isso, é fundamental investir em educação permanente que discuta a questão do risco de exposição a material biológico e as medidas preventivas como um conteúdo que permeie todas as ações de cuidado desenvolvidas pela equipe de enfermagem. Ressalta-se a importância de envolver, nestas atividades educativas, os gestores dos serviços de assistência à saúde e também aqueles ligados a todos os setores de apoio.

Referências

1) BAGGIO, M. A. Relações humanas no ambiente de trabalho: o (des)cuidado de si do profissional de enfermagem. **Rev. gaúcha enferm.**, Porto Alegre, v. 28, n. 3, p. 409-415, 2007.
2) BALSAMO, A. C.; FELLI, V. E. A. Estudo sobre os acidentes de trabalho com exposição aos líquidos corporais humanos em trabalhadores da saúde de um hospital universitário. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 3, p. 346-353, 2006.
3) BRASIL. Portaria nº 777, de 28 de abril de 2004. Dispõe sobre os procedimentos técnicos para a notificação compulsória de agravos à saúde do trabalhador em rede de serviços sentinela específica, no Sistema Único de Saúde – SUS. Ministério da Saúde, Brasília, DF, abr. 2004.
4) CAETANO, J. A. et al. Acidentes de trabalho com material biológico no cotidiano da enfermagem em unidade de alta complexidade. **Enfermería global**, Murcia, v. 9, 2006.
5) CAIXETA, R. B.; BARBOSA-BRANCO, A. Acidente de trabalho, com material biológico, em profissionais de saúde de hospitais públicos do Distrito Federal, Brasil, 2002/2003. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 737-746, 2005.
6) DALL'AGNOL, C. M.; CIAMPONE, M. H. T. Grupos focais como estratégia metodológica em pesquisa na enfermagem. **Rev. gaúch. Enferm**, Porto Alegre, v. 20, n. 1, p. 5-25, 1999.
7) DAMASCENO, A. P. et al. Acidentes ocupacionais com material biológico: a percepção do profissional acidentado. **Rev. bras. enferm**, Brasília, v. 59, n. 1, p. 72-77, 2006.
8) KELLER, S. et al. Hepatitis C prevention with nurses. **Nursing and Health Sciences**, Colorado, v. 7, n. 2, p. 99-106, 2005.
9) LIMA, F. A; PINHEIRO, P. N. C; VIEIRA, N. F. C. Acidentes com material perfurocortante: conhecendo os sentimentos e as emoções dos profissionais de enfermagem. **Esc. Anna Nery**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p.205-211, 2007.
10) MALAGUTI, S. E. et al. Enfermeiros com cargo de chefia e medidas preventivas à exposição ocupacional: facilidades e barreiras. **Rev. Esc. Enferm. USP**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 496-503, 2008.

11) MARZIALE, M. H. P; RODRIGUES, C. M. A produção científica sobre os acidentes de trabalho com material perfurocortante entre trabalhadores de Enfermagem. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 4, p. 571-577, 2002.
12) MELO, D. S. et al. Compreensão sobre precauções padrão pelos enfermeiros de um hospital público de Goiânia- GO. **Rev. Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 5, p. 720-27, 2006.
13) MINAYO, M. C. S. O desafio do conhecimento: pesquisa qualitativa em saúde. São Paulo: Hucitec, 2006.
14) MUNARI, D. B. et al. Considerações teóricas e técnicas da utilização do grupo na investigação científica. **Rev. enferm. UERJ**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 113-118, 2008.
15) MUROFUSE, N. T; MARZIALE, M. H. P; GEMELLI, L. M. G. Acidente com material biológico em hospital universitário do oeste do Paraná. **Rev. gaúch. Enferm**, Porto Alegre, v. 26, n. 2, p. 168-179, 2005.
16) NISHIDE, V. M.; BENATTI, M. C. C. Riscos ocupacionais entre trabalhadores de enfermagem de uma unidade de terapia intensiva. **Rev Esc Enferm USP**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 406-414, 2004.
17) OLIVEIRA, B. A. C.; CAVALLI KLUTHCOVSKY, A. C. G.; KLUTHCOVSKY, F. A. Estudo sobre a ocorrência de acidentes de trabalho com material biológico em profissionais de enfermagem de um hospital. **Cogitare Enferm**, Curitiba, v. 13, n. 2, p. 194-205, 2008.
18) RAPPARINI, C. et al. Occupational exposures to bloodborne pathogens among healthcare workers in Rio de Janeiro, Brazil. **J Hosp Infect**, Londres, v. 65, n. 2, p. 131-7, 2007.
19) SIEGEL, J. D. et al. Health Care Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. **Am J Infect Control**, Nova York, v. 35, n. 10 Suppl 2, p. S65-164, 2007.
20) SOUZA, A. C. S. **Risco biológico e biossegurança no cotidiano de enfermeiros e auxiliares de enfermagem**. 2001. 183f. Tese (Doutorado em Enfermagem) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.
21) TIPPLE, A. F. V. et al. Acidente com material biológico entre trabalhadores da área de expurgo em centros de material e esterilização. **Acta scientiarum - Health science**, Maringá, v. 26, v. 2, p. 271-278, 2004.
22) TIPPLE, A. F. V. et al. Equipamentos de Proteção Individual : uso e manuseio por alunos em uma instituição de ensino odontológico. **Rev. ABO Nacional**, São Paulo, v. 11, n. 3, p. 153-61, 2003.
23) WESTPHAL, M. F.; BÓGUS, C. M.; FARIA, M. M. Grupos Focais: experiências precursoras em programas educativos em saúde no Brasil. **Bol. Oficina Panam**, Washington, v. 120, n. 6, p. 472-81, 1996.

[1] Trabalho vinculado ao Programa Institucional de Iniciação Científica CNPq/UFG
[I] Acadêmica do 9º período de graduação da Faculdade de Enfermagem da Universidade Federal de Goiás (FEN/UFG), membro do Núcleo de Estudos e Pesquisa em Infecção Hospitalar (NEPIH). Goiânia/GO. Email: luaufg@yahoo.com.br.
[II] Enfermeira. Doutora. Professora Associada da FEN/UFG, membro do NEPIH. Goiânia/GO. Email: adenicia@fen.ufg.br.

Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico da planta medicinal Açoita-cavalo (Luehea divaricata Mart. et Zucc.), em células somáticas de Drosophila melanogaster pelo teste SMART/asa.

Leandro Prado Felício[1], Ana Paula Kluthcouski[1], Elayne Miguel da Silva[1], Vívian Ribeiro[1], Iara Lúcia Barbosa Fernandes Vieira[1], Aline Kiara da Silva Ferreira[1], Denisy Marques Mendanha[1], Débora Cristina Silva dos Passos[1], Salvador de Carvalho[1], Wanderlene Blanco Nunes[1].

[1]Laboratório de Mutagênese com *Drosophila*, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, UFG, Goiânia-GO.
Email: lpfelicio@hotmail.com

Palavras chaves: Fitoterapia, *Luehea divaricata*, mutagênese, *Drosophila melanogaster.*

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas pelas populações urbanas e rurais na cura de diversas enfermidades, estas representam uma alternativa barata e eficaz de tratamento (IORIS, 1999).

A fitoterapia repousa sobre uma tradição secular, sendo amplamente difundida através dos raizeiros, curandeiros, benzedeiras, fazendo parte da cultura dos povos indígenas e rurais. Do total das 365 mil espécies de espermatófitas, estima-se que apenas 8% delas tenham sido sistematicamente estudadas em termos de compostos. Ainda sim, aproximadamente sete mil substâncias com importância farmacêutica foram isolados de plantas conhecidas da sabedoria popular por suas propriedades medicinais sendo utilizados como constituintes de novos medicamentos (CAMPELO, 2006).

O Brasil possui um quarto deste montante de espécies (CALIXTO, 2000) e grande parte destas plantas encontra-se no cerrado, tendo muitas delas propriedades medicinais. Alguns estudos apontam que a análise da bioatividade das plantas medicinais do cerrado pode ser a base para a sua utilização como fármacos pelo homem (SILVA *et al.*, 2003).

A *Luehea divaricata* (*L. divaricata*), é uma planta comum nas matas de galerias do cerrado goiano. Possui este nome pois sua madeira tem grande flexibilidade e é utilizada pelos camponeses na facção de chicotes. É uma árvore

caducifólia que pode atingir os 25 metros de altura, suas inflorescências são do tipo cacho, de cor rosa, com as flores no formato campânula. O fruto é uma cápsula cônica, seca e lenhosa, totalmente coberta por fina camada de pêlos, apresentam cor marrom e estão presentes durante todo o ano. A deiscência ocorre somente na sua extremidade, que se abre em cinco fendas. A folha possui 2 a 6 cm de largura e 4 a 15 cm de comprimento, com pecíolo curto. As bordas são irregularmente serreadas. Apresenta três nervuras nítidas longitudinais, divergentes da base e formando ramificações (ENGEL *et al.*, 1984).

A *L. divaricata* tem relativa utilização medicinal pelas populações oriundas do Cerrado. A parte utilizada como fitoterápico é a casca e entrecasca. Balbach (1993) indica banhos ou clísteres no tratamento de disenteria e hemorragia e a decocção da casca no tratamento de artrite, leucorréia e reumatismo. O decocto da entrecasca é excelente para resolver casos de tumores, e feridas gangrenosas. Carvalho (2006) comprovou a eficácia no tratamento de úlceras gástricas e como cicatrizante em ratos pelo extrato hidroalcoólico das cascas. Müller *et al.* (2006) comprovaram a eficácia do extrato metanólico e frações líquidas das folhas contra bactérias.

O extrato das cascas possui como principais componentes flavonóides, taninos, antocianinas e triterpenos (SIQUEIRA, 2006) e ainda epicatequina entre os princípios ativos desse extrato (TANAKA *et al.*, 2005).

Tendo em vista, que a utilização de plantas ainda desconhecidas do ponto de vista toxicológico pode levar a ocorrência de eventos mutacionais somáticos ou germinativos e desencadear doenças ou desordens hereditárias múltiplas em seres humanos, muitos testes tem sido desenvolvidos para avaliar a ação genotóxica e antigenotóxica.

O teste SMART/asa foi desenvolvido por Graf *et al.* (1984). É considerado um teste rápido, barato e que produz resultados confiáveis, inequívocos e altamente reproduzíveis, sendo útil na detecção de alterações genéticas ocorridas no disco imaginal das asas. Tem como base o fato de que, durante o início do desenvolvimento embrionário da *Drosophila melanogaster (D. melanogaster)*, grupos de células dos discos imaginais se separam e proliferam durante o crescimento larval até se diferenciarem, durante a metamorfose, em estruturas do corpo da mosca adulta (olhos, asas, etc.) (GRAF *et al.*, 1984).

No teste SMART/asa são utilizados dois marcadores, com expressões fenotípicas bem definidas. O marcador *multiple wing hairs* (*mwh*), que em condições

de homozigose, produz múltiplos tricomas por célula, ao invés de apenas um único tricoma, como normalmente acontece. O marcador *flare 3* (*flr*^{3}), é uma mutação recessiva que afeta a forma do pelo da asa. Ele produz pelos mal formados que têm a forma de uma chama de fogo. O alelo mutante *flr*^{3} é letal em homozigose recessiva nos zigotos (os zigotos homozigotos para o alelo *flr*^{3} não são capazes de se desenvolver em moscas adultas). Ao contrário, células homozigotas do disco imaginal são viáveis e levam à formação de células mutantes nas asas. Devido à letalidade no zigoto, o alelo *flr* é mantido na linhagem estoque com a presença de um "balanceador cromossômico" com múltiplas inversões cromossômicas TM3 (do inglês: TM3, BdS- *Third multiple 3, Beaded*-Serrate) (GUZMÁN-RINCÓN & GRAF, 1995).

2. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo: verificar o potencial genotóxico e/ou antigenotóxico do extrato aquoso de Açoita-cavalo (EAAc) , *Luehea divaricata,* através do teste SMART/asa, envolvendo o cruzamento padrão (ST) e o cruzamento aprimorado (HB).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Agentes químicos

- Cloridrato de doxorrubicina (DXR) {(85-cis) - 10 - [(3 - Amino - 2, 3, 6 - trideoxi - α - L - lixohepaxapiranosil) oxil] - 7, 8, 9, 10 - tetrahidro - 6, 8 11 - trihidroxi 8 (hidroxiacetil) - 1 - metoxi - 5, 12 - naftacenodiona}, P. M. 543,5; F. M. $C_{27}H_{29}$-N-O_{11}HCL; CAS 2314-92-8, conhecida comercialmente como Doxolen® (forma liofilizada fabricada por Eurofarma Laboratórios Ltda, São Paulo - SP).

- Extrato aquoso do pó da casca e entre casca da planta *Açoita-cavalo*, obtido em mercado especializado Erva Fé na Rua 83, Setor Sul, Goiânia-GO. Todas as soluções foram preparadas com água destilada imediatamente antes do uso.

3.2 Meios de cultura e condições de cultivo

Os estoques de *D. melanogaster* foram mantidos em frascos de 1/4 de litro contendo meio de cultura específico (820 ml de água, 11 g de ágar, 156 g de banana, 25g de fermento fresco - *Sacharomyces cerevisae* e 1 g de nipagin).

Os ovos foram coletados em frascos contendo meio "frapê" (uma base sólida de ágar - 4% de ágar em água e uma camada de fermento com açúcar).

As larvas foram transferidas para frascos contendo 0,9 g de meio purê de batata (Yoki Alimentos S. A.) sendo posteriormente coletados os adultos emergentes e fixados em etanol 70%.

Durante todo o experimento as linhagens foram mantidas a uma temperatura de 25 ± 1º C e umidade relativa de aproximadamente 60 %.

3.3 Linhagens *de D. melanogaster*

"***Multiple wing hairs***" **(*mwh*)**, com constituição cromossômica *mwh/mwh*

"***Flare-3***" **(*flr*^{3})**, com constituição genética *flr*^{3}*/In(3LR)TM3, ri p*^{p} *sep l(3)89Aa bx*^{34e} *e Bd*^{s}.

"**ORR;*flr*^{3}" (ORR)**, com constituição cromossômica *ORR; flare-3 (ORR; flr3*), com constituição genética *ORR/ORR; flr3 /In* (3LR)TM3, ri pp sep l(3)89Aa bx34e e Bds (GRAF *et al*.,1989)

3.4 Cruzamentos

Para os testes serão utilizados dois cruzamentos:

Padrão (ST): Obtidas pelo cruzamento de fêmeas *Flare-3* cruzadas com machos *mwh*.

Alta ativação metabólica: Caracterizado por um alto nível de citocromo P450, obtido pelo cruzamento de fêmeas ORR;f*lr*^{3} com machos *mwh*.

3.5 Tratamentos e curva de sobrevivência

A coleta dos ovos foi realizada por 8 h em frascos contendo uma base sólida de ágar (4% de ágar em água), e uma camada de fermento com açúcar. Após 72 ± 4 h, as larvas provenientes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta ativação metabólica (HB) foram transferidas para frascos contendo 0,9 g de meio purê de batata. Em cada frasco foram adicionados 3,0 mL do extrato obtido com o pó do cerne da planta *L. divaricata* diluídos em água destilada, nas concentrações de 0,10; 0,20 0,30; 0,50 mg/mL para avaliação dos efeitos genotóxicos, comparados com o controle negativo (água destilada). Para o cálculo da curva de sobrevivência transferiu-se exatamente 100 larvas de terceiro estágio por tubo, adicionando-se o EAAc nas diferentes concentrações e ainda um controle com água destilada. Decorridas 48horas as moscas emergentes foram contadas para se estabelecer o nível de citotoxidade do extrato.

Para avaliação da atividade antigenotóxica de *L. divaricata* foi adicionado em cada frasco 1,5 mL de solução de DXR (0,125mg/mL) associadas com 1,5 mL de

EAAc (0,10; 0,30; 0,50 mg/mL). Foram incluídos o controle positivo [DXR (0,125mg/mL)] e o controle negativo (água destilada) em ambos os cruzamentos.

3.6 Preparação de lâminas

As moscas, estocadas em etanol 70%, foram lavadas em água corrente e embebidas em solução de FAURE (30 g de goma arábica, 20 mLde glicerol, 50 g de hidrato de cloral, 50 mL de água destilada). Em seguida, as asas foram separadas do corpo dos imagos com o auxílio de duas pinças de relojoeiro, distendidas e fixadas sobre a superfície de lâminas secas com a solução de FAURE. As lâminas contendo 10 pares de asas (5 pares de fêmeas e 5 pares de machos) foram mantidas em uma placa aquecedora a 40°C por um período mínimo de 24 horas. Posteriormente, foram cobertas com lamínulas (24 x 32 mm), contendo uma gota da solução de FAURE, permanecendo por mais no mínimo 24 horas a 40°C com 400 g de peso sobre as lamínulas visando a perfeita aderência das asas às lâminas (GRAF *et al.,* 1984).

3.7 Análise microscópica das asas

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico com ampliação de 400X. Para cada tratamento foram avaliadas aproximadamente de 20 indivíduos de cada sexo (4 lâminas) considerando-se os diferentes fenótipos dos pêlos nas superfícies dorsal e ventral das asas.

Todas as manchas isoladas por 3 ou mais fileiras de pêlos normais foram consideradas independentes (Graf *et al.,* 1984). As manchas foram classificadas como simples *mwh* ou *flr*^{3}, quando somente um dos marcadores se expressou, ou manchas gêmeas, se ambos os fenótipos mutantes - pelos múltiplos (*mwh*) e pelos com a base alargada (*flr*^{3}) - estavam presentes. A posição e o tamanho das manchas foram determinados, respectivamente, com o setor da asa e o número de células com os fenótipos mutantes. As manchas foram divididas em classes de diferentes tamanhos: 1; 2; 3 - 4; 5 - 8; 9 - 16; 17 - 32; 33 - 64; 64 -128; 129 - 256; 257 - 512; 513 - 1024; > 1024. As classes 1 e 2 são classificadas como manchas pequenas e as demais como manchas grandes (GARCIA-BELIDO *et al.,* 1974). Foram analisados os compartimentos distais, proximais e nervuras das asas.

3.8 Análise estatística

Para verificação da possível genotoxidade, aplicou-se o teste X^2 para proporções (FREI E WÜRGLER, 1988). Para tanto, realiza-se uma comparação entre as proporções de manchas encontradas por classe entre as doses tratadas e o respectivo controle negativo, estabelecendo-se duas hipóteses:

(I) H_o: a freqüência de mutação espontânea e induzida nas moscas tratadas não é maior que a freqüência de mutação no respectivo controle.

(II) H_1: a freqüência de mutação induzida nas moscas tratadas não e menor que m vezes a maior freqüência de mutação espontânea observada no controle.

O nível de significância do teste é de 5%. Assim, podem ser consideradas as seguintes decisões:

(a) Aceita-se ambas as hipóteses; como elas não podem ser verdadeiras simultaneamente, nenhuma decisão pode ser tomada tendo, assim, o resultado inconclusivos.

(b) Aceita-se a primeira hipótese e rejeita-se a segunda obtendo-se o resultado negativo.

(c) Rejeita-se a primeira hipótese e se aceita a segunda e o resultado será positivo.

(d) Rejeitam-se ambas as hipóteses e o resultado é um fraco-positivo.

O valor de m é fixado em no mínimo 2, devido á alta freqüência de mutação espontânea verificados em manchas simples pequenas e o total de manchas simples.

Na análise estatística para antigenotoxicidade das séries tratadas com *L. divaricata* associada à doxorrubicina, as freqüências de manchas por mosca foram comparadas aos pares [ex. controle positivo (DXR) versus *L. divaricata* + DXR] utilizando o Teste-U não paramétrico de Mann-Whitney & Wilcoxon. A aplicação do teste objetiva excluir-se resultados que sejam falso-positivo, aplicando-se posteriormente o teste X^2 para proporções, sendo os resultados das análises das doses testadas comparadas com o controle positivo (FREI &WÜRGLER 1995).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para análise citotóxica da *L. divaricata* foram escolhidas 5 doses (0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50 mg/mL) realizou-se duas repetições por dose e feito uma média entre o número de sobreviventes. O resultado da curva de sobrevivência é apresentado na **Figura 1**. A análise dos dados demonstram que o EAAc não apresenta efeito citotóxico significativo sobre as moscas para ambos os cruzamentos (ST e HB)

quando comparados ao controle negativo. Não houve grandes diferenças entre o número de emergentes do grupo controle quando comparados à qualquer uma das concentrações testadas. A dose que apresentou a maior taxa de letalidade foi a de concentração 0,50 mg/mL tanto para o cruzamento ST quanto para o HB.

Para determinação dos possíveis efeitos genotóxicos e/ou antigenotóxicos foram analisadas 960 asas provenientes de adultos emergentes de três experimentos independentes, que incluíram o controle negativo (água destilada estéril), controle positivo (DXR - 0, 125 mg/mL) e 3 diferentes concentrações (0,10; 0,30; 0,50 mg/mL) do EAAc isoladas e 3 concentrações (0,10; 0,30; 0,50 mg/mL) do EAAc associadas com DXR (0,125 mg/mL). Foram desenvolvidos concomitantemente os cruzamentos ST e HB para que as larvas fossem tratadas sob mesma condição ambiental.

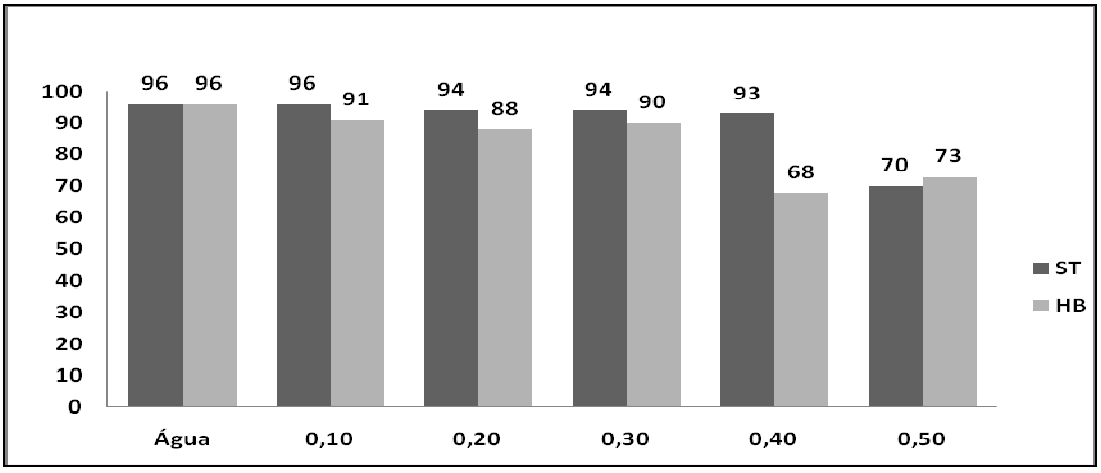


Figura 1. Curva de sobrevivência dos cruzamentos ST e HB. Descendentes tratados com diferentes concentrações (0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50) de EAAc.

Os resultados obtidos na análise dos descendentes MH do cruzamento ST e HB, tratados com diferentes concentrações do EAAc, são apresentados na **Tabela 1**. A análise dos dados demonstra não haver um aumento estatisticamente significante ($\alpha = \beta = 0,05$) no número total de manchas, no número de manchas simples pequenas e no número de manchas simples grandes comparando-se as dosagens testadas ao controle negativo, tanto no cruzamento ST quanto HB. Em relação ao número de manchas gêmeas os resultados foram inconclusivos, sugerindo ser necessário o aumento da amostragem para certificar a significância ou não estatística dos dados comparados ao controle.

As **figuras 2 e 3** mostram a distribuição do tamanho das manchas em relação ao número de células observadas nas asas analisadas provenientes dos descenden-

tes MH dos cruzamentos ST e HB, respectivamente. As manchas simples com apenas uma célula mutante tiveram a maior frequência em todas as doses testadas e no controle negativo. Os resultados permitem concluir que o EAAc não apresenta efeito genotóxico direto, com base na análise do cruzamento ST e nem indiretos, ou seja, seus metabólitos não causaram danos significativos ao DNA de células somáticas de *D. melanogaster*, através da análise do cruzamento HB.

Assim como constatado por Passos (2008) ao testar o extrato de *Palicourea coriacea* Cham. o número de mutações encontrados no controle negativo foi, para ambos cruzamentos, superior ao encontrado nas doses testadas (0,10; 0,30; 0,50 mg/mL) sugerindo um possível efeito protetor por parte do EAAc contra o número de mutações espontâneas.

Tabela 1. Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) e de alta ativação metabólica (HB) tratados com diferentes concentrações do extrato de *L. divaricata*.

Genótipos **e Conc.** **(mg/mL)**	**N. de Indiv.** **(*N*)**	**Manchas por indivíduo (n° de manchas) diag. estatístico[a]**								
		MSP (1-2 céls)[b] ***m* = 2**		**MSG (>2 céls)[b]** ***m* = 5**		**MG** ***m* = 5**		**TM** ***m* = 2**	
ST									
Cont. Neg.	40	0,58 (23)		0,18 (07)		0,05 (02)		0,80 (32)	
0,10	40	0,23 (09)	-	0,03 (01)	-	0,03 (01)	i	0,28 (11)	-
0,30	40	0,28 (11)	-	0,08 (03)	-	0,03 (01)	i	0,38 (15)	-
0,50	40	0,28 (11)	-	0,05 (02)	-	0,05 (02)	i	0,38 (15)	-
DXR	40	2,80 (112)	+	3,65 (146)	+	3,10 (124)	+	9,55 (382)	+
HB									
Cont. Neg.	40	1,15 (46)		0,23 (09)		0,03 (01)		1,40 (56)	
0,10	40	0,10 (04)	-	0,13 (05)	-	0,00 (00)	i	0,23 (09)	-
0,30	40	0,23 (09)	-	0,03 (01)	-	0,00 (00)	i	0,25 (10)	-
0,50	40	0,13 (05)	-	0,05 (02)	-	0,03 (01)	i	0,20 (08)	-
DXR	40	3,40 (136)	+	4,80 (192)	+	3,75 (150)	+	11,95 (478)	+

[a]Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância α = 0,05.
[b]Incluindo manchas simples *flr*^{3} raras. MSP = Manchas simples pequenas. MSG = Manchas simples grandes. MG = Manchas gêmeas. TM = Total de manchas.

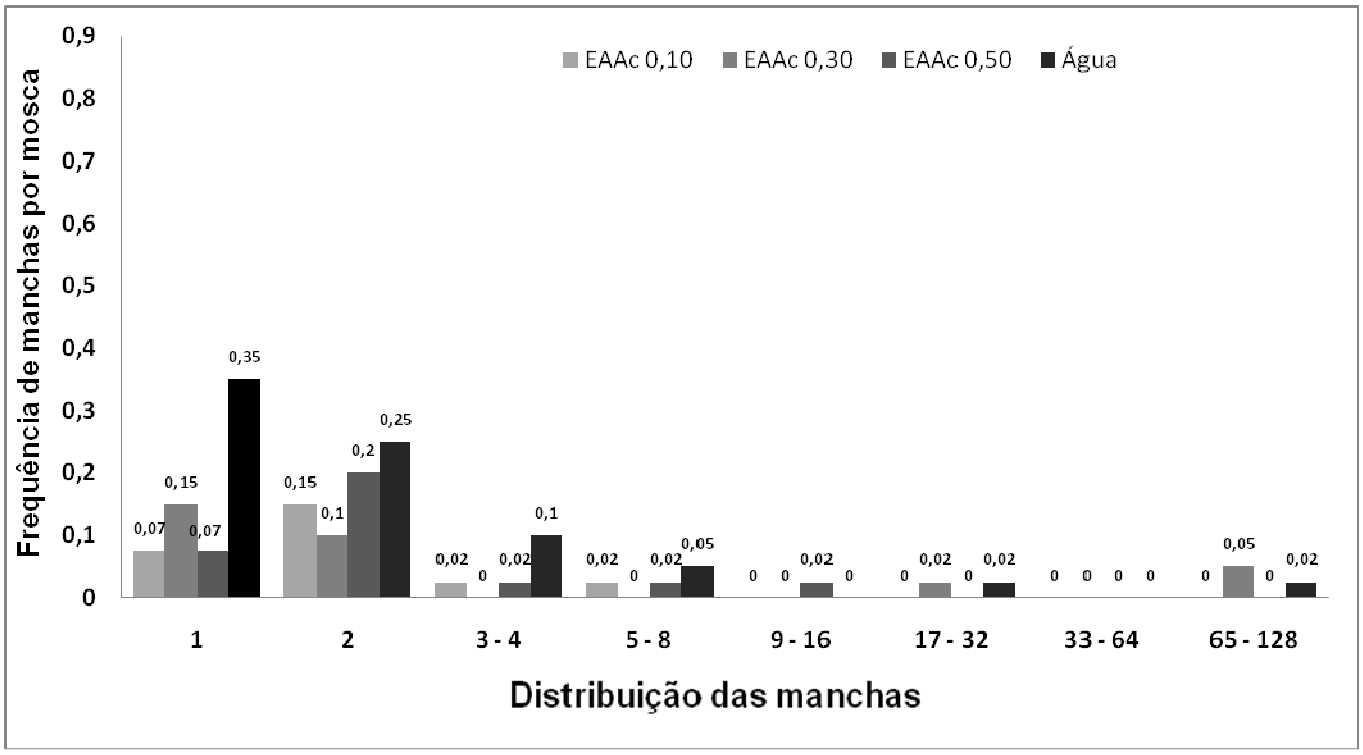


Figura 2: Distribuição do tamanho de manchas mutantes (número de células) observadas em asas de *D. melanogaster*, dos descendentes MH, provenientes do cruzamento **ST** tratados com água destilada (controle negativo) e com diferentes concentrações (0,10; 0,30; 0,50 mg/mL) de EAAc

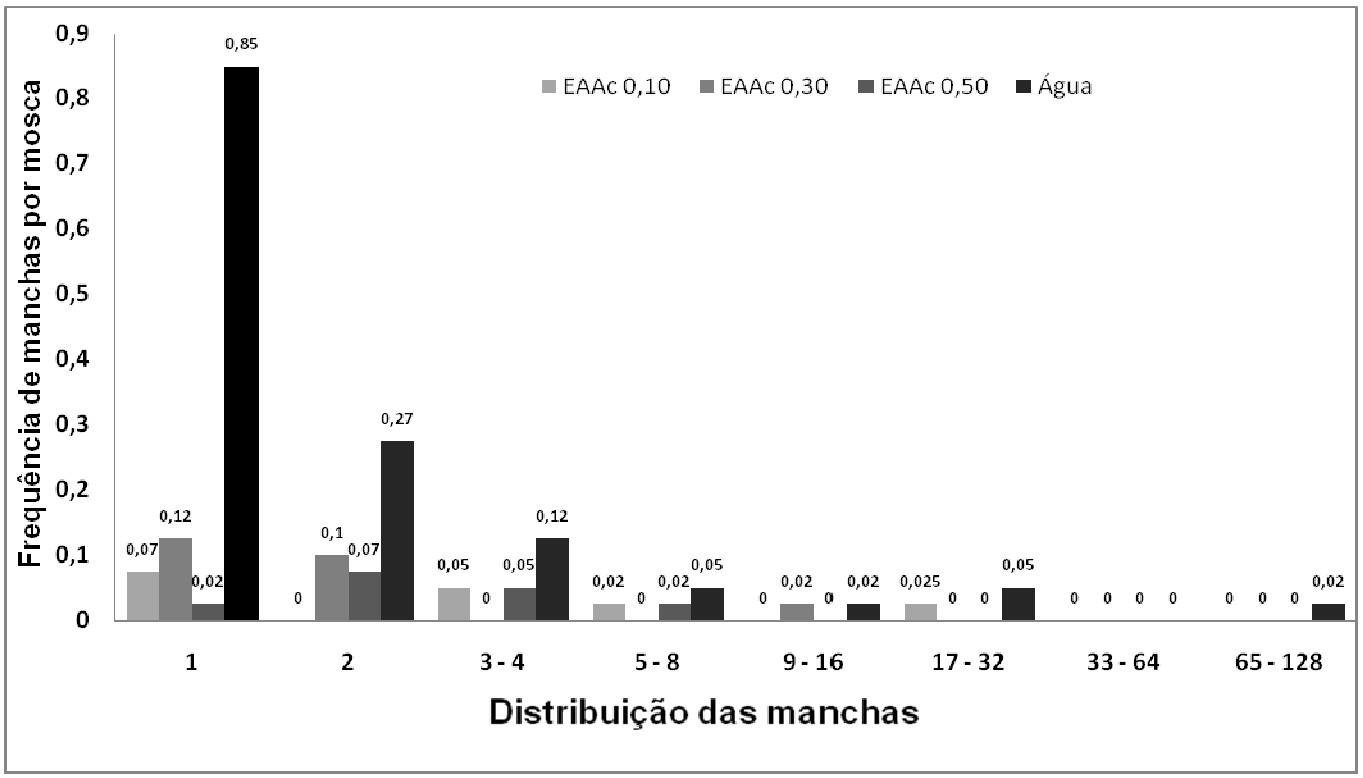


Figura 3: Distribuição do tamanho de manchas mutantes (número de células) observadas em asas de *D. melanogaster*, dos descendentes MH, provenientes do cruzamento **HB** tratados com água destilada (controle negativo) e com diferentes concentrações (0,10; 0,30; 0,50 mg/mL) de EAAc

Os dados obtidos na análise dos indivíduos MH dos cruzamentos ST e HB trados com diferentes concentrações de EAAc associados à DXR (0,125mg/mL) são apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) e de alta ativação metabólica (HB) tratados com diferentes concentrações do extrato de *L. divaricata* associadas ao cloridrato de doxorrubicina (DXR) 0, 125 mg/mL.

Genótipos **e Conc. (mg/mL)**	**N. de Indiv. (*N*)**	**Manchas por indivíduo (n°. de manchas) diag. estatístico[a]**			
		MSP (1-2 céls)[b] *m* = 2	**MSG (>2 céls)[b] *m* = 5**	**MG *m* = 5**	**TM *m* = 2**
ST					
DXR	40	2,80 (112)	3,65 (146)	3,10 (124)	9,55 (382)
0,10 + DXR	40	1,10 (44) ↓	0,35 (14) ↓	0,25 (10) ↓	1,70 (68) ↓
0,30 + DXR	40	0,38 (15) ↓	0,35 (14) ↓	0,23 (09) ↓	0,95 (38) ↓
0,50 + DXR	40	0,30 (12) ↓	0,45 (16) ↓	0,40 (16) ↓	1,15 (46) ↓
HB					
DXR	40	3,40 (136)	4,80 (192)	3,75 (150)	11,95 (478)
0,10 + DXR	40	1,10 (44) ↓	1,40 (56) ↓	0,53 (21) ↓	3,03 (121) ↓
0,30+ DXR	40	0,55 (22) ↓	0,55 (22) ↓	0,20 (08) ↓	1,30 (52) ↓
0,50+ DXR	40	0,90 (36) ↓	0,20 (08) ↓	0,28 (11) ↓	0,20 (55) ↓

[a] Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1995): ↓ redução nas freqüências de manchas, m-fator de multiplicação. Teste-U não paramétrico de Mann-Witney & Wilcoxon. Níveis de significância: α = 0,05. [b]Incluindo manchas simples *flr*^{3} raras. MSP = manchas simples pequenas. MSG = Manchas simples grandes. MG = Manchas gêmeas. TM = Total de manchas.

Foram verificadas diminuições significativas (α = 0,05) em ambos os cruzamentos nas freqüências de manchas simples pequenas, manchas simples grandes, manchas gêmeas e totais de manchas, quando comparadas com o controle positivo.

A diminuição do número de manchas pequenas no cruzamento ST demonstrou ser dose-dependente. No cruzamento HB, a redução de manchas simples grandes mostrou ser dose dependente.

As **figuras 4 e 5** mostram a distribuição do tamanho das manchas em relação ao número de células observadas nas asas analisadas provenientes dos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, respectivamente.

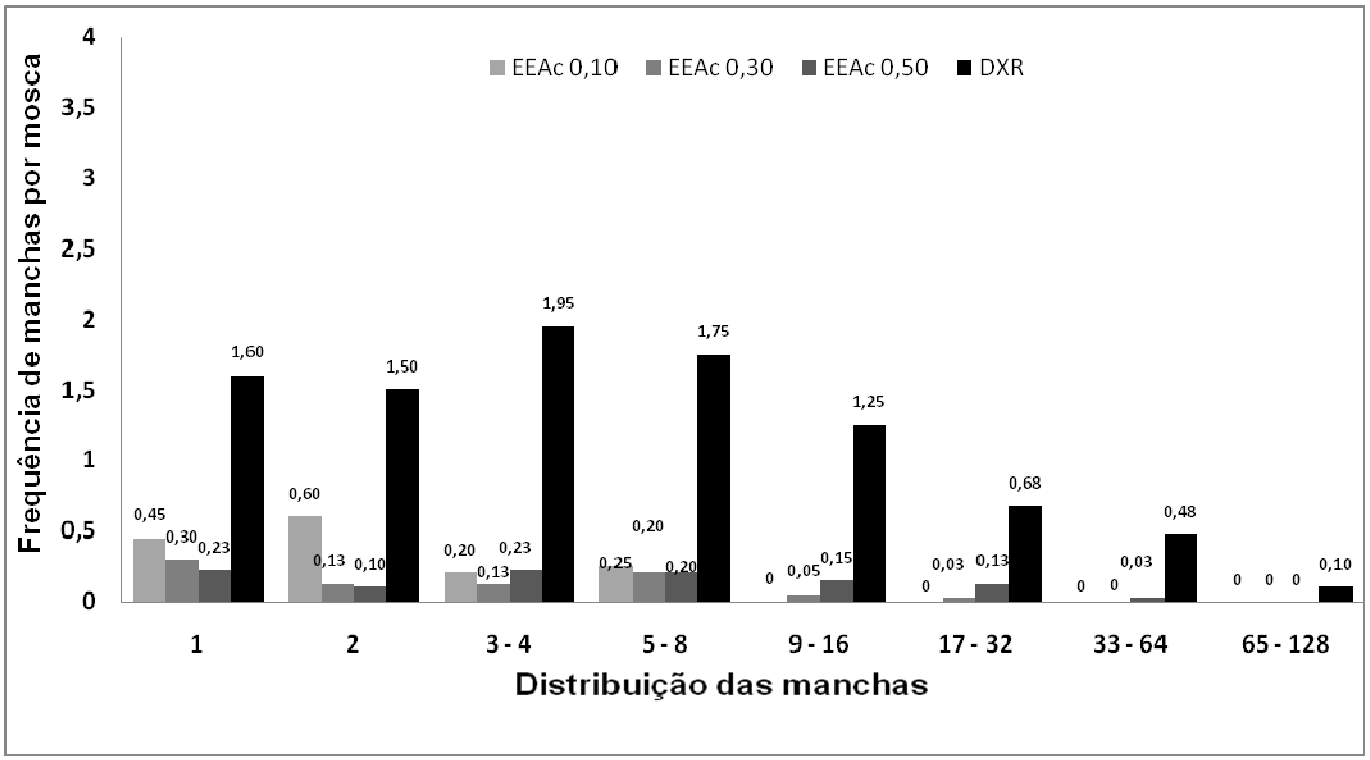


Figura 4: Distribuição do tamanho de manchas mutantes (número de células) observadas em asas de *D. melanogaster*, dos descendentes MH, provenientes do cruzamento **ST** tratados com DXR (0,125 mg/mL) isoladamente e em associação com diferentes concentrações (0,10; 0,30; 0,50 mg/mL) de EAAc.

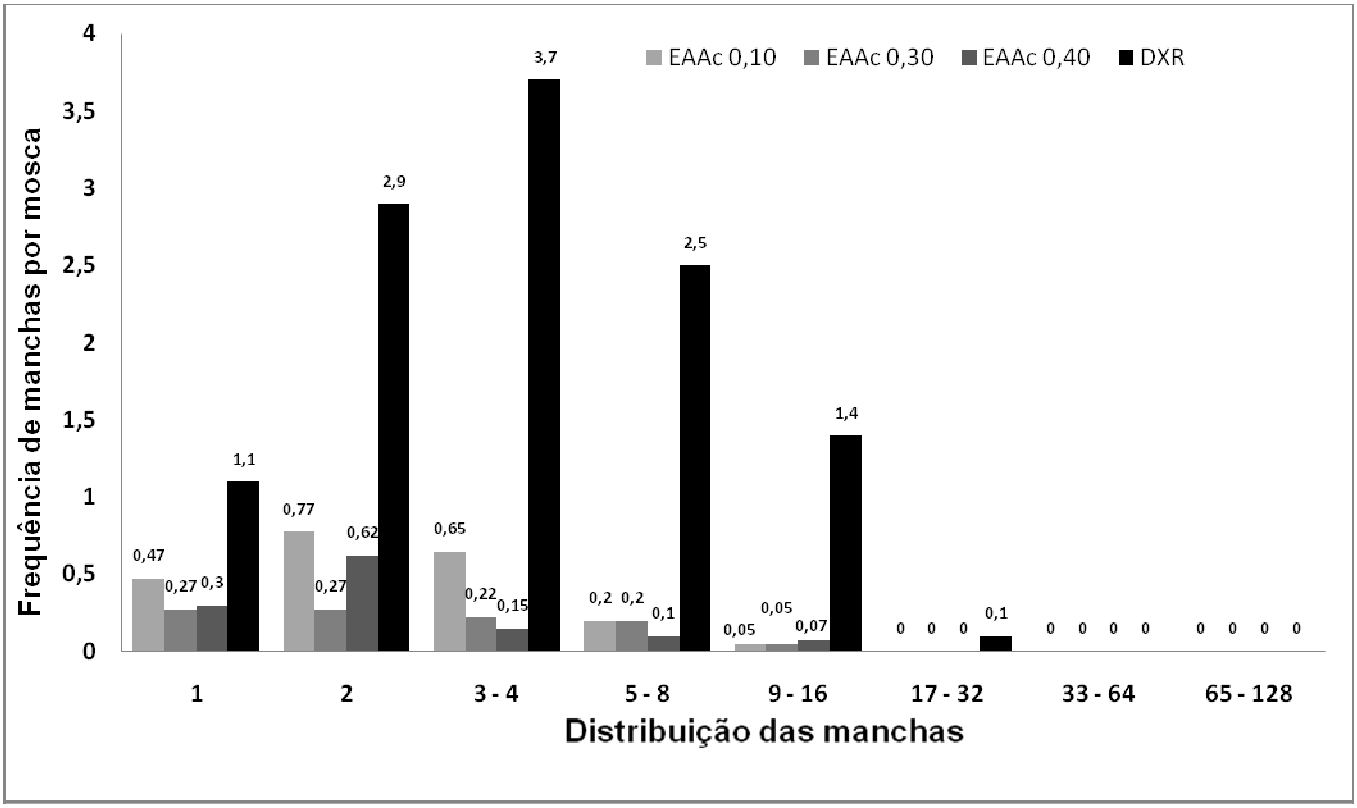


Figura 5: Distribuição do tamanho de manchas mutantes (número de células) observadas em asas de *D. melanogaster*, dos descendentes MH, provenientes do cruzamento **HB** tratados com DXR (0,125 mg/mL) isoladamente e em associação com diferentes concentrações (0,10; 0,30; 0,50 mg/mL) de EAAc.

A frequência de todas as categorias de manchas mutantes observadas nos indivíduos trans-hetrozigotos marcados (MH) tratados com DXR isoladamente e com DXR associado com as diferentes concentrações de EAAc obtiveram significância estatística ($p<0,05$) quando comparados as freqüências observadas no controle negativo para ambos os cruzamentos.

O EAAc apresentou uma redução no número de manchas mutantes para todas as classes, sugerindo o seu efeito modulador sobre os danos causados pela doxorrubicina ao DNA das células somáticas dos discos imaginais da *D. melanogaster.* O controle positivo apresentou para os descendentes MH, um aumento estatisticamente significativo na freqüência de manchas mutantes, em todas as categorias, quando comparado ao controle negativo. Estes resultados reafirmam a validade do teste.

Embora a *Drosophila* tenha aproximadamente 10.000 genes em seu genoma, comparados com aproximadamente 100.000 genes de células de mamíferos, a maioria dos genes humanos são duplicações e elaborações de seus equivalentes em insetos (MIKLOS & RUBIN, 1996). Devido à extraordinária conservação dos passos metabólicos moleculares que existem entre moscas e humanos e da significante homologia que existe entre os oncogenes e genes supressores de tumor de moscas, comparado com os de humanos (ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 1995).

A DXR apresenta efeitos citotóxicos quando ocorre a transformação da DXR para radical livre semiquinona, o que causa morte celular devido a danos no DNA. (ROBERT & GIANNI, 1993). Assim sendo, terapias anticâncer são citotóxicas para as células cancerígenas, mas também para as células saudáveis.

O emprego concomitante de substâncias que possam modular os efeitos genotóxicos de agentes químicos e físicos, sem interferir na ação genotóxica nas células neoplásicas, é de grande importância para a prevenção de alterações gênicas em células saudáveis que possam resultar no aparecimento de novas doenças (TAKEUCHI & TAKAHASHI, 2001).

Os resultados obtidos pela análise anti-genotóxica do EAAc apresentou-se de forma semelhante a outros fitoterápicos que apresentavam em suas constituições compostos semelhantes ao presentes no Açoita-cavalo, como é o caso do trabalho de Nunes (2004) que verificou a ação protetora do extrato aquoso de *Ginkgo biloba* e Passos (2008) que observou a ação protetora do extrato aquoso de *Palicourea coriacea* ambos utilizando o teste SMART/asa.

Estes resultados nos permitem considerar que o EAAc é um agente desmutagênico, que quando associado à DXR deve desempenhar sua ação protetora por meio da captação de radicais livres induzidos pela DXR; e/ou por bloquear a interação da DXR e dos radicais livres com o DNA.

A presença de compostos como taninos, flavonóides e triterpenos podem ser os responsáveis pela modulação dos efeitos da DXR ao DNA (NUNES, 2004). Entretanto, outros estudos com diferentes modelos experimentais devem ser realizados para demonstrar os mecanismos de modulação, bem como determinar as condições em que *L. divaricata* pode ser empregada sem riscos à saúde humana.

5. CONCLUSÃO

Com base nos dados da curva de sobrevivência dos indivíduos MH dos cruzamentos ST e HB das doses testadas do EAAc, verifica-se que o extrato não possui efeito citotóxico significativo sobre as células de *D. melanogaster*.

O extrato não apresentou efeito genotóxico nas concentrações testadas em comparação ao controle positivo para ambos os testes e ainda, demonstrou efeito modulador nas três concentrações quando associados à doxorrubicina.

6. REFERÊNCIAS

ARTAVANIS-TSAKONAS S.; MATSUNO K.; FORTINI, M.E. Notch signaling. **Science**. v. 268, n.5208, p. 225-232, 1995.

BALBACH, Alfons. **As plantas curam**. Itaquaquecetuba – SP: Missionária p. 36, 1993.

CALIXTO, J. B. Biopirataria - A diversidade biológica na mira da indústria farmacêutica. **Ciência Hoje**, v.28, n. 167, p. 36-43, 2000.

CAMPELO, P. M. S. Plantas medicinais e seus extratos: A necessidade de estudos continuados. **Estudos de Biologia**, v. 28 n. 62 jan./mar, 2006. Disponível em: <www2.pucpr.br/reol/index.php/BS?dd1=457&dd99=pdf>, acesso em jun. 2009.

CARVALHO, J. E. Atividade Antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese. **Revista Multiciência, Divisão de Farmacologia e Toxicologia CPQBA/Unicamp,** 2006.

ENGEL, V.L.; MORAES, A.L. & POGGIANI, F. Guia de localização e reconhecimento das principais espécies arbóreas do Parque da ESALQ. **Relatório de Pesquisa**.FEALQ, 1984.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Statistical methods to decide wheter mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**. v. 203: p. 297-308, 1988.

FREI H, WÜRGLER FE. Optimal experimental design and simple size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. **Mutat Res - Envir mutagen**. v. 334, n. 2, p.247-258, 1995.

GARCIA-BELIDO A, DAPENA J. Induction, detection and characterization of cell diferentiation mutantes in *Drosophila melanogaster.* **Mol gen Genet**. v. 128, n. 2, p.117-130, 1974.

GRAF, U.; FREI, H.; Kagi, A.; Katz, A.J.; Wurgler, F.E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**. v.222, p. 359-373, 1989.

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E., KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B. & KALE, P. G. Somatic Mutation and Recombination Test in *D. melanogaster.* **Environmental Mutagenesis.** *v.*6, p. 153-188, 1984

GUSMÁN-RINCÓN, J. & GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. **Biomonitors and Biomarkers as indicators of environmental change**. New York, Plenum Press, p. 169-181, 1995.

IORIS, E.M. **Plantas Medicinais do Cerrado: Perspectivas Comunitárias para a Saúde, o Meio Ambiente e o Desenvolvimento Sustentável**. 1ª ed. Mineiros – GO: Fimes. p. 7, 1999.

MIKLOS, G.L.G.; RUBIN, G.M. The role of the genome project in determining gene function: insights from model organism. **Cell**. v. 86, n.4, p.521-529, 1996.

MÜLLER, J.B.; CERON, C.S.; KUNZ, V.T.; POZZATTI, P.; MAFRON, M.P. Avaliação da suscetibilidade antifúngica e antibacteriana do extrato bruto e frações das folhas de L*uehea divaricata* Martius**.** Anais.. **58ª Reunião Anual da SBPC** , Florianópolis, SC, Julho/2006.

NUNES, W. B. **Efeito modulador do extrato aquoso padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761) contra mutações e recombinações somáticas induzidas pela doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2004. 79 f. Tese (Doutorado em Genética e bioquímica).Universidade Federal e Uberlândia, Uberlândia, 2004.

PASSOS, D. C. S. **Efeito modulador do extrato aquoso da *Palicourea coriacea* Cham. contra mutações e recombinações somáticas induzidas pela doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.** Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

ROBERT, J.; GIANNI, L. Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. **Cancer Surveys**. v. 17, p. 219-252, 1993.

SILVA, L.D.; NASCIMENTO, V.; SANTOS, S.C.; MORAIS, J.O.R.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T. Análise morfométricas de cloro e *Poecilia vivípara* expostas frações do caule de *Caryocar brasiliensis.* **Portal de Periódicos da UEM**, 2003. Disponível em : <http://www.periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/viewFile/2107/1545>, acesso em 30 jun. 2009.

SIQUEIRA, M. G. Atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini. 100 f. **Dissertação (Mestrado em Clínica Médica)** - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

TAKEUCHI P.L; TAKAHASHI C.S. A vitamina B6 e as aberrações cromossômicas induzidas pela doxorrubicina. V Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental. **Programas e resumos**. Gramado - Rio Grande do Sul. 2001.

TANAKA, J.C.A.; SILVA, C.C.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M. A. Constituintes Químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova** n.28 v.5. p. 834-837, 2005.

O trabalho de músicos profissionais: a construção da identidade social e ocupacional

Matheus Guimarães Mello – graduando de Ciências Sociais e bolsista PIBIC,
Jordão Horta Nunes – orientador, doutor em Sociologia,
Faculdade de Ciências Sociais - Universidade Federal de Goiás
e-mail: *matheus.gmello@gmail.com; jordao_nunes@uol.com.br*

Palavras-Chave: Músicos Profissionais, Identidade Profissional, Setor de Serviços

Introdução e Objetivos

Este artigo procura apresentar uma pesquisa realizada sobre os serviços musicais em Goiânia, tendo por foco os músicos profissionais em prestação de serviços tais como apresentações em eventos, aulas, gravações em estúdio, composição de trilhas sonoras. O objetivo é pesquisar como e por que os músicos, em relevância os do campo erudito, lidam com a frequente necessidade de exercer várias atividades simultaneamente,nem sempre as que gostariam de realizar - e que às vezes nem são consideradas profissões. Além disso, procura-se compreender quais condições sociais e disposições constroem objetiva e subjetivamente suas identidades profissionais nessas situações e como se dão as negociações identitárias para seu reconhecimento, levando em conta que estão inseridos numa complexa rede de cooperação profissional (*cf*. BECKER, 1984).

Esta investigação faz parte do projeto de pesquisa "Análise sociológica de serviços distributivos e pessoais: cultura do trabalho e práticas de consumo", coordenado pelo professor Jordão Horta Nunes e integrado ao Núcleo de Estudos Sobre o Trabalho (NEST). O projeto busca dar mais visibilidade sociológica ao setor de serviços (antigo setor terciário), que tem expandido sua importância nos últimos anos no contexto de transformações recentes do mundo do trabalho, mas que ainda não possui a visibilidade proporcional nos estudos sociológicos (*cf.* NUNES; DUTRA; LANDEIRO, 2008).

A situação de trabalho de músicos, entendidos como prestadores de vários tipos de serviços, está permeada por essa problemática de diversificação de atividades

exercidas, concomitante à falta de visibilidade e de prestigio social correspondente a essa profissão.

Além disso, deve-se considerar que são poucas as pesquisas, pelo menos no contexto brasileiro, que centralizam os músicos “por trás da música”, e em menor número ainda estão aquelas que os abordam em sua dimensão social e profissional (LUDOVICO, 2007, p. 1). A condição de "ser músico", assim, evidencia-se como de grande interesse para as ciências sociais no momento atual.

Metodologia

A pesquisa empírica foi dividida em duas etapas: a etapa principal quantitativa e uma etapa complementar qualitativa. Inicialmente, foi realizado um levantamento bibliográfico do estado da arte de pesquisas sobre músicos profissionais, que veio a confirmar a escassez destas, ainda mais levando em conta o recorte da construção da identidade profissional. O levantamento serviu de preparação teórica e metodológica para a elaboração da primeira etapa da pesquisa, a quantitativa, realizada com a aplicação de 155 questionários de auto-preenchimento em que os informantes foram selecionados por um processo de amostragem intencional em escolas, eventos de música, lojas de instrumentos musicais e entre alunos da Escola de Música e Artes Cênicas (EMAC) da Universidade Federal de Goiás. Essa abordagem foi escolhida devido à dificuldade de definir com exatidão quem é considerado "músico profissional", visto que cadastros oficiais, como o da Ordem dos Músicos do Brasil e a relação de concluintes de ensino superior em música não incluem a totalidade das pessoas que trabalham com música (PICHONERI, 2006). O questionário teve perguntas referentes a informações socio-econômicas, formação musical, atividades musicais exercidas, condições de trabalho e identidades ocupacionais/profissionais, que foram analisadas através de uma análise fatorial e várias combinações de estatísticas descritivas.

A análise estatística dos dados quantitativos coletados encontrou alguns padrões estruturais, permitindo alguns *insights*, ou seja, algumas "pistas" estruturais, que permitiram à etapa complementar uma explicação mais aprofundada, que confirmasse as hipóteses teóricas levantadas para explicar as relações encontradas. A etapa qualitativa suplementar foi composta pela análise de duas entrevistas semi-estruturadas, cujos entrevistados foram escolhidos a partir de uma lista de contatos obtida com os respondentes do questionário. Esse número reduzido justifica-se pela

prioridade em realizar entrevistas em maior profundidade com casos escolhidos como os mais "ideais" segundo a distribuição encontrada nas análises estatísticas e não em comparar de casos ou grupos de casos. Não se trata, ainda, da generalização do caso único, mas da interpretação de alguns trechos como capazes de elucidar algumas explicações para as hipóteses elaboradas anteriormente.

Considerando as entrevistas como ideais, pôde-se captar não apenas as informações sobre seu caso específico, mas informações sobre o que consideravam os músicos em geral, o que une o método de codificação temática com a da reconstrução das teorias subjetivas dos entrevistados (FLICK, 2004). Assim, foram consideradas as experiências dos entrevistados nesse campo como válidas para a explicação sociológica, e não apenas como um objeto de interpretação de representações sociais, por exemplo.

Esses dois casos foram constituídos por uma mulher (identificada como “Clara”), professora de música, musicoterapeuta, toca em uma orquestra; e um homem (identificado aqui como “Vinicius”), estudante de música na UFG, professor de música, que trabalha com gravação em sua casa e toca em eventos como *freelancer*. Esses casos apresentavam um grande número de atividades exercidas simultaneamente, além de terem informado tipos diferentes entre si de formação musical. As entrevistas possuiram 30 perguntas abertas divididas nos seguintes temas: impressões gerais sobre a profissão musical; narrativa episódica de um dia típico de trabalho; trajetória pessoal/profissional; questões de gênero; condições de trabalho; contatos profissionais; identidades profissionais/ocupacionais.

Dessa forma, buscou-se coletar dados quantitativos e qualitativos sobre músicos profissionais acerca do perfil sócio-econômico, perfil de carreira, expectativas em relação à mobilidade no mundo do trabalho, atitudes e valores em relação à atividade ocupacional ou profissional, representações sociais sobre a própria ocupação e aspectos da identidade profissional. A partir da análise dos dados, teve início uma investigação de como ocorre a construção social de suas identidades profissionais e ocupacionais, levando em conta a falta de reconhecimento profissional típica do mundo artístico, e utilizando como principal referencial teórico a abordagem de Claude Dubar (2005), que defende que os processos de socialização (exemplificando em ênfase, a socialização profissional), se dão numa articulação entre a construção social da "identidade para si" e da "identidade para o outro", isto é, os processos "subjetivos" de auto-identificação no decorrer da trajetória pessoal

estão relacionados (nem sempre de forma harmônica) com os processos "objetivos" de atribuição identitária num contexto "sistêmico".

Resultados

Apresentarei agora os resultados obtidos sem corresponder à risca à ordem das etapas da pesquisa, mas sim, a um fluxo de apresentação coerente. Primeiramente, informo que foi possível confirmar, através dos questionários, a hipótese norteadora de que grande parte dos músicos atua em várias atividades musicais profissionais simultaneamente, na maior parte das vezes como uma necessidade para complementar o salário. Os entrevistados avaliaram ainda essa "necessidade", com 51,8 % deles considerando-a "ruim", 27,3% considerando "regular" e apenas 20,9% avaliando como "bom". Boa parte acrescentou que considera que a profissão de músico é pouco valorizada no Brasil (e em Goiânia), e assim têm de ocupar boa parte de seu tempo de estudo para exercer essas várias atividades, ou trabalhando em vários empregos.

A seguir, apresentarei alguns resultados da análise fatorial obtidos através da etapa quantitativa que permitem elucidar alguns nexos explicativos centrais. A análise fatorial é uma técnica multivariada de análise estatística, cujo propósito principal é a redução de dados e sumarização. Ela analisa as relações entre variáveis e tenta explicá-las em termos de suas dimensões subjacentes comuns (fatores), onde são apresentadas as relações mais relevantes do ponto de vista estatístico no contexto de interdependência entre todas as variáveis escolhidas. Dessa forma, por ser uma análise meramente estatística, a análise fatorial pode ser considerada uma forma de validar nexos explicativos, já que o ato de computar esses dados não inclui nenhuma compreensão dos significados das variáveis por parte do computador. Estabelecer as relações semânticas, isto é, compreender o significado, ou o que explica aquelas relações, fica a cargo do pesquisador. A partir desses resultados da análise fatorial, que dão uma noção geral da estrutura que está “invisível”, pode-se apronfundar a análise e confirmar as hipóteses explicativas, utilizando uma combinação de estatísticas descritivas com a análise das entrevistas e da literatura produzida, direta ou indiretamente, a respeito da temática.

A análise fatorial atendeu aos dois testes de significância estatística: o de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO), que revelou um índice de 0,593 (acima do valor mínimo

comumente aceito de 0,500) e o teste de Bartlett, que indicou a rejeição de hipótese nula, o que confirma a adequação dos dados para a análise fatorial.

Foi utilizada a solução dos componentes principais, com o método de rotação VARIMAX, e adotando um *eigenvalue* de 1 como limite para a extração de um fator. Dessa forma, foram encontrados doze fatores nesse modelo, capaz de ser representativo para 73,993% dos casos. No entanto, foram levados em conta aqui apenas os seis primeiros fatores, todos da matriz rotacionada, por apresentarem uma maior qualidade explicativa.

O primeiro fator reuniu (considerando relevantes as cargas fatoriais acima de 0,5) as variáveis "idade" (com carga fatorial 0,854), "estado civil" (0,772), "número de filhos" (0,803), "com quem mora" (0,562), "tempo de atuação como profissional" (0,807). Este fator pode ser interpretado como indicando a "trajetória tradicional do ritmo de vida", isto é, o fato de haver uma relação entre essas variáveis significa que conforme a pessoa vai envelhecendo, é bem mais provável que seja casada ou divorciada, tenha filhos, more com um parceiro ou sozinha e tenha mais tempo de profissão, em relação aos mais jovens. Assim este é um bom indicador que a análise está funcionando adequadamente, pois reuniu justamente as informações que mais faziam sentido juntas nesse contexto de dados sociais "básicos".

Já o segundo fator, mais interessante para revelar nexos sociológicos não imaginados *a priori*, relacionou "sexo" (0,610), "nível de escolaridade" (0,498 – abrindo uma exceção com o arredondamento), "tempo de formação musical" (0,638), "principal atuação profissional" (0,719), "atividade profissional exercida – aulas de teoria musical" (0,570). A partir disso, foi dada ênfase para a categoria "gênero" para as análises, apesar de não ter sido privilegiada na elaboração do projeto que deu origem à pesquisa. Somente com múltiplas análises descritivas combinadas foi possível elucidar adquadamente uma hipótese para explicar essas relações indicadas.

Já de início percebe-se, com um exame do banco de dados, que há mais homens (71%) do que mulheres (29%) no total de músicos profissionais; isso se reflete de uma forma proporcional em quase todas as atividades exercidas, mas a maioria das mulheres está concentrada nas atividades de ensino: ao passo que 40% dos homens trabalha em orquestra, banda ou outras performances coletivas, apenas 17,8% das mulheres estão envolvidas com essa atividade. Algo semelhante ocorre com apresentações em bares e restaurantes (com 20% dos homens exercendo essa atividade contra 2,2% das mulheres) e apresentações de performance solo (30%

dos homens e 17% das mulheres estão envolvidos). Enquanto isso, 60% dos homens dão aulas de instrumento contra 71,1% das mulheres; outras atividades de ensino apresentam uma proporção até inversa: 43,9% dos homens dão aulas de educação musical, com 55,6% das mulheres fazendo o mesmo, quanto a aulas de canto, apenas 8,4% dos homens o fazem contra 24,4% das mulheres. Ou seja, ainda que a maioria absoluta dos professores sejam homens (cerca de 70%), a maioria das mulheres está se ligada às atividades de ensino e se sentem identificadas como professoras. É preciso lembrar que os músicos exercem vários tipos de atividades musicais simultaneamente, para que esses dados não pareçam incongruentes.

Vale acrescentar então, que essa diferenciação pode ser notada também na identificação com as atividades exercidas. Em geral, a identificação com as atividades realizadas segue mais ou menos a mesma proporção das atividades exercidas de fato, tendo uma diferença significativa apenas no caso das aulas de instrumento (atividade que a maioria dos entrevistados realizam, como visto anteriormente), na qual 26,9% dos homens se identificam contra 42,9% das mulheres; e das aulas de educação musical, com 14% dos homens se sentindo realizados nela contra 31% das mulheres. Ainda, há uma diferença fundamental na questão de qual consideraram a principal atuação profissional: 64,1% dos homens consideraram-se primeiramente como "músicos executantes" (*performer*) e 31,1% como professores de música; enquanto isso, 18,2% das mulheres consideraram-se como "músicas executantes" e 77,3% como professoras de música, conforme mostra o **Gráfico 1**.

Para compreender isso, Dubar (2005) enfatiza que é necessário investigar as trajetórias pessoais ("subjetivas"), além das definições de situação ("objetivas") dos "atores" pesquisados. É preciso levar em conta portanto, que o fato de haver menos mulheres atuando na profissão indica que o ambiente do trabalho musical é predominantemente masculino, o que é constatado em outras pesquisas (*cf.* PICHONERI, 2006; BORGHETTI e MATEIRO, 2007) com uma proporção semelhante (70% de homens e 30% de mulheres). Assim, a própria entrada das mulheres no meio musical profissional já se dá com a consciência disso, ou seja, elas devem fazer uma avaliação da possibilidade de "se manter" nessa área. E as atividades de ensino, que concentram a maior parte das mulheres em geral, são as mais estáveis, onde é possível manter um emprego com uma certa segurança, ao

contrário de apresentações em bares por exemplo, onde o trabalho é esporádico e quase sempre realizado como *freelancer*. Basta aprofundar em mais alguns informações para compreender isso.

Há bem menos mulheres "iniciantes" no mercado de trabalho, como podemos ver no gráfico de boxplot do **Gráfico 2**, (onde cada parte da “caixa” representa um quartil, isto é, 25% dos casos da amostra), que indica que 75% dos homens possui cerca de 10 anos de formação musical formal, enquanto 25% das mulheres possui esse tempo de formação. Isso é comprovado ainda mais através do **Gráfico 3**: praticamente não haver mulheres com escolaridade abaixo de ensino superior incompleto, enquanto que metade dos homens estão na faixa do ensino fundamental até ensino superior incompleto. Por essa razão, segundo o **Gráfico 4**, as mulheres também possuem uma renda individual maior em relação a uma média: metade das mulheres possuem um rendimento mensal total em média de até dois mil reais, enquanto metade dos homens possuem um rendimento de até pouco mais de mil reais.

Assim, podemos interpretar que essa diferenciação de gênero está centralizada no fato das mulheres de forma geral não terem satisfatoriamente a opção de se "arriscar" na profissão, levando-as desde cedo a uma opção pessoal em priorizar o que oferecer mais “segurança”, o que não indica entretanto, que sua carga de trabalho seja menor ou que se envolvam com menos atividades musicais diferentes simultâneamente. O que nos leva a acrescentar mais um fator explicativo, a possível e comum sobrecarga das atividades domésticas com as atividades profissionais, uma preocupação que as mulheres em geral ainda têm de levar em conta, daí a preferência por empregos cujos horários possam ser mais ou menos controlados.

Para completar, vale lembrar da importância dos significados sociais tradicionalmente atribuídos ao masculino e feminino e, consequentemente, dos papeis que complexamente devem ser desempenhados na vida social e sua influência na socialização (VIANNA, 2002). Na entrevista, “Clara” revelou que uma das razões:por ter bem menos alunas é que “o homem tem mais acesso, logo ele ganha liberdade muito rápido, uma mocinha de doze anos não vem para a aula de música sozinha, ao passo que um garoto de doze já vem, então tem todo esse diferencial aí”, o que pode se tornar um impeditivo para o acesso pleno ao “mundo da música”, desde essa fase inicial até a fase mais profissional, como por exemplo, o número reduzido de mulheres trabalhando em bares e restaurantes (2,2% contra

20% dos homens). Tudo isso, portanto, pode ser indicado como uma das causas por haver menos mulheres atuando como músicas profissionais.

Quanto aos homens, percebe-se que poucos se identificam como professor apesar de a maioria de fato exercer essa como pelo menos uma de suas atividades. Não querendo reduzir a uma explicação apenas, podemos dizer que boa parte não se realizam profissionalmente como professores, dando aulas apenas como um modo de complementar a renda mensal. Conforme foi relatado nas entrevistas, os músicos de fato sentem a necessidade de possuir algumas "válvulas de escape", sejam elas de qual tipo forem. No entanto, não se pode ignorar aqueles que realmente se identificam e gostam de dar aulas, pois isso também possui uma relação íntima com suas trajetórias típicas, já que o fato de terem escolhido se tornar professores já indica uma opção anterior e provavelmente planejada por essa atividade.

Retornando a atenção à análise fatorial, podemos resumir esse fator, que agrega as variaveis sexo, nivel de escolaridade, tempo de formacao musical, principal formacao profissional e exercao profissional de aulas de teoria musical, como "diferenciação de gênero na escolha ocupacional" e também como "tipo ideal de professor de música", já que no decorrer desta explicação concentramos as principais problemáticas deste tipo de atividade. Em seguida, notamos que três fatores apresentados a seguir diferenciaram os tipos de socialização musical

O terceiro fator nos indica uma relação entre as variáveis "atribuição da responsabilidade pela formação musical – amigos" (0,812), "atribuição da influência para decidir estudar música – amigos" (0,849), "atribuição da influência para decidir estudar música – meios de comunicação" (0,620). Se compararmos esses valores com os do fator correspondente da matriz original, surge uma variável extra importante: "atribuição da responsabilidade pela formação musical – amigos" (0,713), "atribuição da influência para decidir estudar música – amigos" (0,636), "atribuição da influência para decidir estudar música – meios de comunicação" (0,571), "atividade profissional exercida – apresentações em bares ou restaurantes" (0,638).

Esse fator indica a importância dos contatos pessoais e profissionais para a socialização dos músicos, principalmente para as atividades de apresentação em *freelancer*. Isto é, este fator informa que há uma relação estatística entre considerar que os amigos tiveram muita influência na escolha por começar a estudar música e responsabilizar (entre outras pessoas e instituições também) os amigos pela própria

iniciação na formação musical. E ao lembrar que o processo de socialização (DUBAR, 2005) é contínuo durante a vida, podemos entender a relação com apresentação em bares e restaurantes (uma das atividades mais ligada ao trabalho em *freelancer*, já que ocasionalmente presta-se um serviço por uma noite, sem um vínculo maior). É principalmente através dos amigos que se fica sabendo das oportunidades de trabalho. Na entrevista com "Clara", essa questão foi resumida bem neste trecho: "e à noite também, você é músico, alguém te liga, um colega te liga, 'vamos tocar ali, apresentar em tal lugar? Tá faltando alguém', você está precisando de dinheiro, e aí acaba indo".

Já a influência dos meios de comunicação está ligada com a profunda inserção dessas pessoas no mundo da música, isto é, o relacionamento com a música está longe de se traduzir como apenas profissional, mas a própria vida pessoal dos músicos está permeada por diversos tipos de contato com a música, incluindo os meios de comunicação, como rádio, televisão e internet principalmente. Na entrevista com "Vinicius" pôde-se confirmar que a maior parte do tempo livre é dedicada à música, seja estudando, escutando, e diversas outras formas.

Este fator pode ser resumido como "tipo ideal de *performer*", "socialização por amizade" ou ainda "imersão no mundo da música", o que foi influenciado pela perspectiva dos mundos da arte, descritos por Becker (1984) como padrões de atividade coletiva que incluem extensas e complexas redes de cooperação entre todos os que participam na construção da obra de arte.

Enquanto isso, o quarto fator indicou relações entre "atribuição da responsabilidade pela formação musical – igreja" (0,881), "atribuição da influência para decidir estudar música – religião" (0,863), "atividade profissional exercida – apresentações na Igreja (performances instrumental ou vocal, coletiva ou individual)" (0,805). Essa interrelação, aparentemente óbvia, demonstra outra importante e comum forma de socialização musical, a religiosa, em especial no meios evangélicos e pentescostais, em que se entra em contato com a música, com o aprendizado de um instrumento, e continua no decorrer da vida em apresentações naquele meio.

Pulando para o sexto fator, por indicar a último grande tipo ideal de socialização musical, houve a relação apenas entre "atribuição da responsabilidade pela formação musical – família" (0,882) e "atribuição da influência para decidir estudar música – família" (0,873), o que aparece em ambas as entrevistas como um fator importante para a iniciação no meio musical, já que muitas vezes os músicos já nascem

literalmente imersos no mundo da música, o que lhes dá mais oportunidades de seguir nessa profissão que exige tanto conhecimento especializado.

E por fim, o quinto fator indicou uma relação entre "atividade profissional exercida – apresentações em bares ou restaurantes" (0,605), "atividade profissional exercida – aulas de educação musical" (0,517), "atividade profissional exercida – estúdio de gravação" (0,713), "atividade profissional exercida – produção de trilhas sonoras e jingles" (0,614), "atividade profissional exercida – produção de espetáculos e shows" (0,714). Ao reunir essas atividades profissionais diferentes, esse fator indicou a própria diversidade de atividades que os músicos em geral exercem, mas que pode ser mais especificada como o "tipo ideal de compositor/gravador", já que extrema variabilidade não é tão comum para aqueles que se concentram dando aulas ou apresentando em orquestras por exemplo. É interessante notar como esse terceiro tipo ideal de músico profissional não deixa de estar ligado a atividade de ensino, lembrando que dar aulas de instrumento por exemplo, por não exigir uma formação específica pode ser exercida como uma forma extra de complementar a renda, o que explica o fato da maioria (65,5%) exercer essa atividade.

Ressalto que a divisão estabelecida entre professor, *performer* e "compositor" não passam de tipos ideais, isto é, na realidade empírica não ocorrem especificamente na realidade empírica, servindo apenas para organizar a pesquisa e identificar padrões em meio ao "caos" das manifestações empíricas do fenômeno: um professor frequentemente faz apresentações esporádicas, um *performer*, tal como um orquestrista, frequentemente precisa ocupar boa parte do tempo dando aulas e a atividade de compor e gravar está igualmente ligada às apresentações e ao ensino.

Da mesma forma, os tipos ideais de motivação / preparação para se tornar músico, a religiosa, a familiar e de amizade estão intimamente ligadas na maioria dos casos, sendo impossível separar realmente os tipos de socialização um do outro. Essa distinção pode servir, no entanto para avaliar como e o quanto cada caso específico se aproxima ou se afasta de um destes tipos.

Considerações Finais

Através desses resultados, podemos inferir que a identidade mesma de o que é um músico profissional está imbricada com a realização de vários tipos de atividades musicais distintas simultaneamente. Nas entrevistas, por exemplo, as próprias representações sobre o que é e como deve ser um músico profissional passam pela

ideia do enriquecimento proporcionado por tocar em vários lugares diferentes como *freelancer*, dar aulas, trabalhar compondo, gravando, fazendo parte de orquestras e bandas, organizando eventos e *shows*, entre várias outras possibilidades. Se essa grande flexibilidade, por um lado é vista positivamente como um enriquecimento das experiências e aperfeiçoamento para a imersão no mundo da música, por outro lado há a questão da sobrecarga de várias atividades de trabalho a que muitos estão sujeitos, como uma necessidade prática.

Mesmo as atividades consideradas anteriormente mais estáveis, em comparação ao trabalho de *freelancer*, são frequentemente consideradas pelos músicos como mais ou menos "instáveis", já que é extremamente comum não ser possível se manter financeiramente ao exercerem apenas uma atividade, além de terem de enfrentar as condições mais adversas nos seus ambientes de trabalho.

Mas para não ficar preso à ideia de que a flexibilidade é o mero "resultado" da necessidade de se manter financeiramente, há de considerar que mesmo no caso específico dos professores universitários, um dos campos considerados mais estáveis e com melhor salário, Ludovico (2007) fala desse mesmo perfil multiforme e flexível dos músicos, que não se contenta em se limitar com uma atividade apenas (no caso a docente).

Ainda, descobrimos que ser professor de música faz parte do que se considera a profissão de músico, pois inevitavelmente está em contato com as outras atividades musicais, mesmo que ocasionalmente a atividade de lecionar não seja tão valorizada ou desejada quanto as outras. É preciso levar em conta que o processo de identificação com as atividades exercidas num contexto de tamanha flexibilidade é extremamente complexo, pois o músico vai se identificar simultaneamente com diversas possibilidades, dependendo da situação em que está inserido. Por exemplo, um compositor de trilhas sonoras vai se sentir professor quando estiver dando aula ou pianista quando estiver na orquestra. Com o próprio processo de identificação é flexível, os músicos acabam selecionando alguns espaços onde possam se expressar mais e se sentir mais identificados.

A construção dessa identidade incomum, mais aberta e flexível, pode revelar um interesse e relevância para estudo das identidades no mundo atual, que busca reavaliar o conceito de "identidade". Por isso Dubar (2005) prefere o termo "formas identitárias", ao invés da ideia de algo pronto que passa a palavra "identidade".

Tendo inspiração na postura teórica de Dubar, que caminha na direção de conciliar escolas teóricas diferentes e tradicionalmente "concorrentes", como o estruturalismo genético de Bourdieu e as abordagens mais fenomenológicas, como as de Berger e Luckmann, esta pesquisa buscou a combinação dos métodos quantitativos e qualitativos, num contexto inspirado também pela abordagem da *grounded theory* (*cf.* FLICK, 2004), onde ao invés de seguir uma ordem linear tradicional, foi necessário através das etapas da pesquisa ir sempre revisando e readaptando os métodos, objetivos e hipóteses teóricas segundo os resultados para a próxima etapa.

Dessa forma, esta pesquisa busca incitar a atenção para essa problemática, pois ainda há poucos estudos sobre os músicos sob a perspectiva de profissionais prestando serviços, e a questão de gênero ainda não foi explorada o suficiente. O que é de interesse tanto para os pesquisadores, quanto para os músicos ao se envolverem em suas negociações identitárias, isto é, suas estratégias para reconhecimento profissional.

Com isso, é preciso levar em conta esses processos diferenciados de socialização através das trajetórias subjetivas e objetivas dos "atores", em articulação com uma análise dos "mundos da arte", ou seja, das extensas relações de cooperação que existem por trás do trabalho final dos músicos. Vale finalizar com a afirmação de Pichoneri (2006, p. 109) que "no Brasil, a heterogeneidade é a palavra-chave na compreensão desses processos de formação, não existindo apenas um único caminho a seguir; as possibilidades são diversas e as estratégias utilizadas pelo músicos para concretizar uma formação altamente especializada e, assim, conseguir espaço num mercado de trabalho restrito e competitivo, dão o tom de percursos educacionais bastante diferenciados".

Gráfico 1

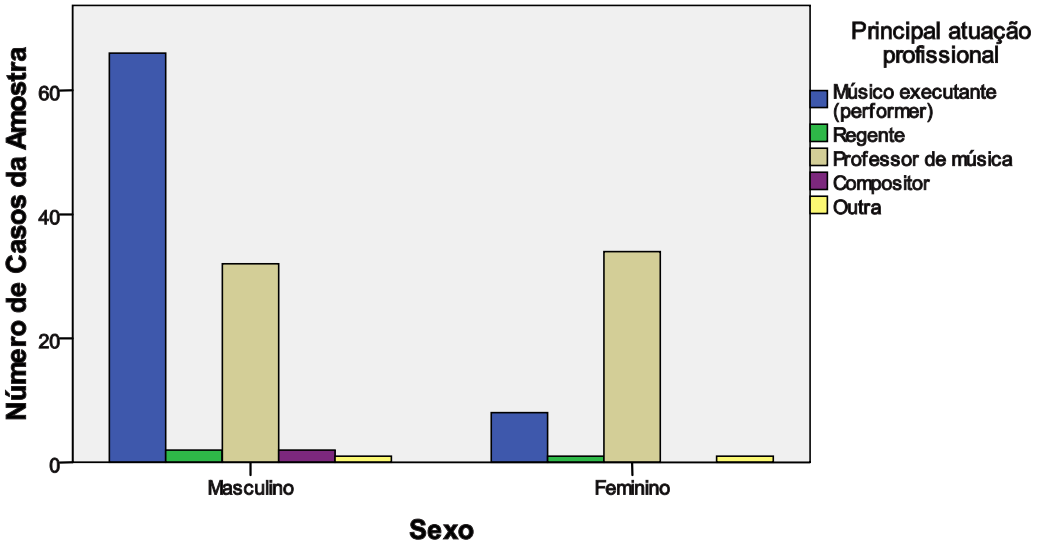


Gráfico 2

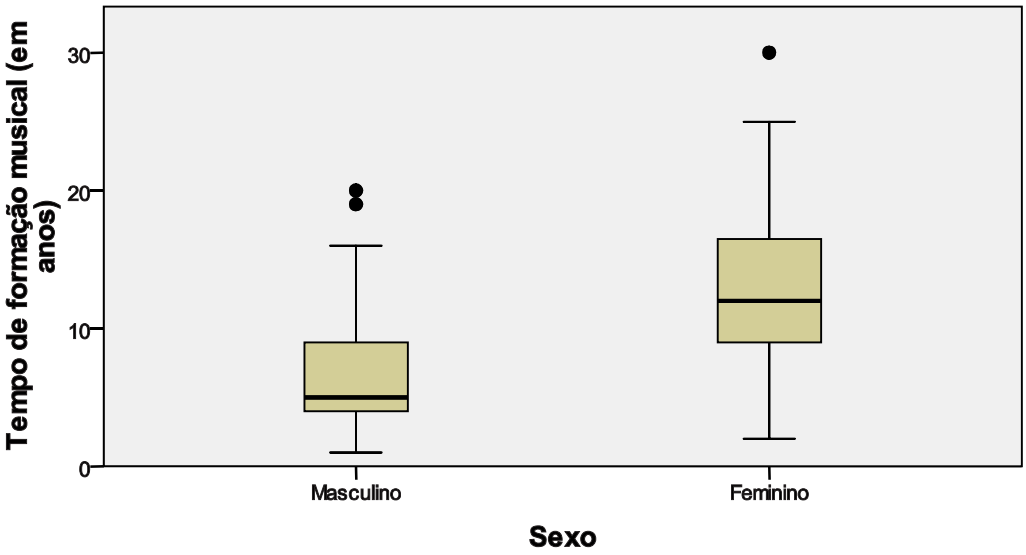


Gráfico 3

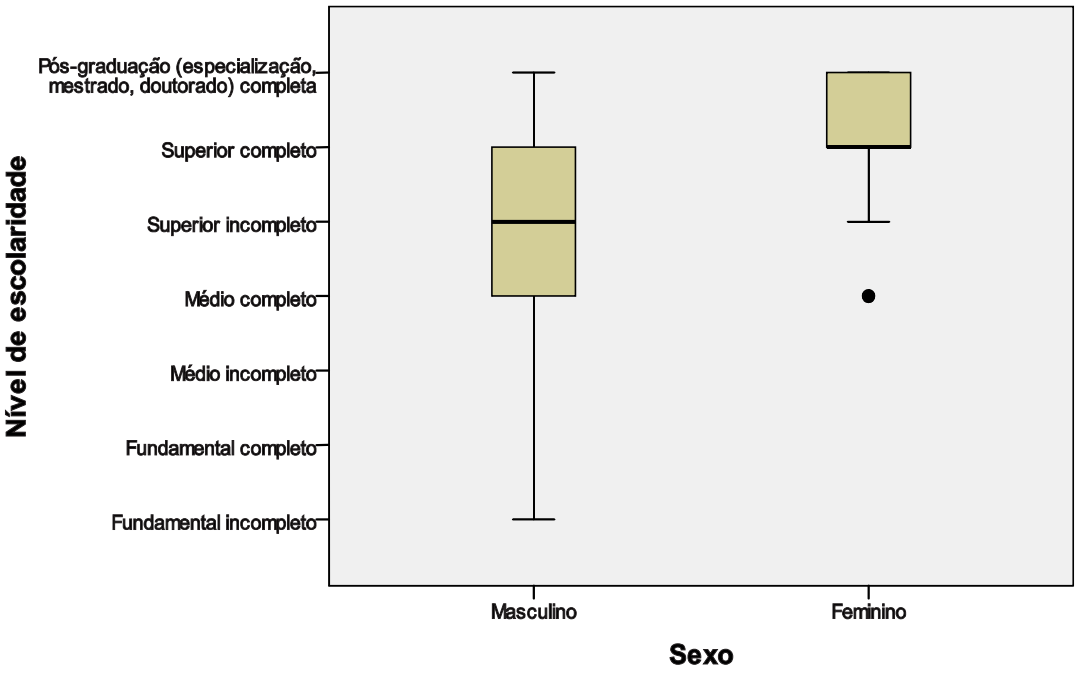
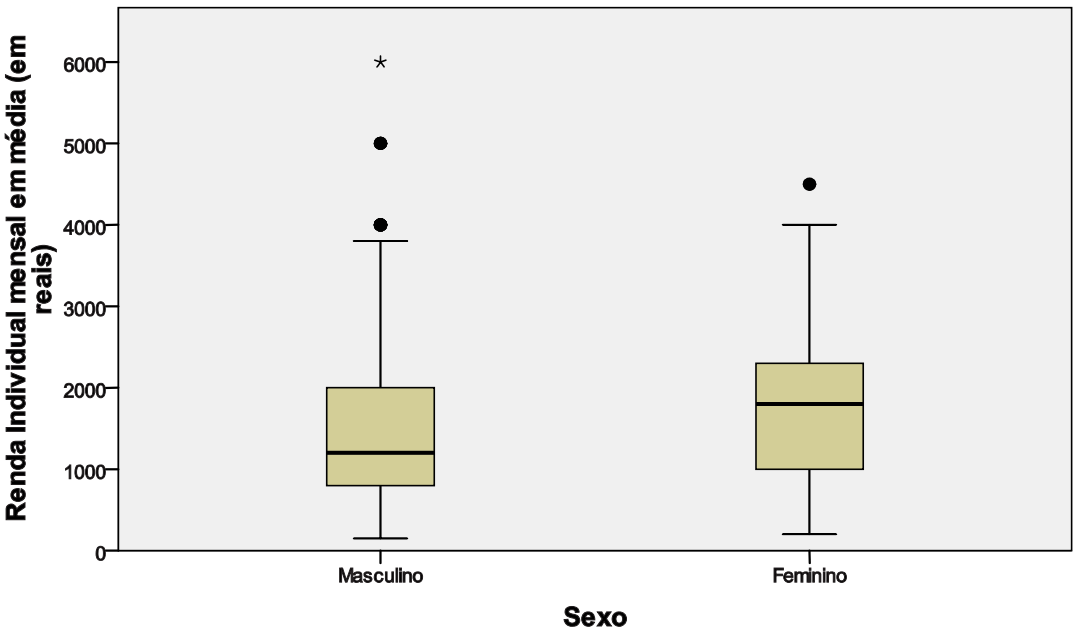


Gráfico 4



Referências

BECKER, Howard Saul. Art Worlds and Collective Activity. In: _____. **Art Worlds**. Berkeley: University of California Press, 1984, p. 1-39.

BORGHETTI, Juliana; MATEIRO, Teresa. Identidade, conhecimentos musicais e escolha profissional: um estudo com estudantes de licenciatura em música. **Música Hodie**, Goiânia, v. 7, n. 2, 2007. pp. 89-108.

DUBAR, Claude. **A socialização, construção das identidades sociais e profissionais.** 1ª ed. São Paulo: Martins Fontes, 2005,

FLICK, Uwe. **Uma Introdução à Pesquisa Qualitativa**. 2ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2004,

LUDOVICO, Thaís Lobosque Aquino. **O *músico anfíbio*: um estudo sobre a atuação profissional multiface do músico com formação acadêmica**. Dissertação (Mestrado em Música) - Escola de Música e Artes Cênicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

NUNES, Jordão Horta; DUTRA, Lúbia Gonzaga; LANDEIRO, Marina Lemes. Trabalho e gênero nas interações de serviços. **Sociedade e Cultura**, Goiânia, v. 11, n. 2, 2008, p. 285-303.

PICHONERI, Dilma Fabri Marão. **Músicos de orquestra: um estudo sobre educação e trabalho no campo das artes**. 2006. Dissertação (Mestrado em Educação) - Faculdade de Educação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 2006.

VIANNA, Cláudia Pereira. O sexo e o gênero da docência. **Cadernos Pagu**. Campinas (SP), n. 17-18, 2002, p. 81-103.

Avaliação da capacidade micoparasítica e produção de enzimas hidrolíticas de isolados de *Trichoderma* spp.

Fabyano Alvares Cardoso Lopes[a], Cirano José Ulhoa[a,*]
[a] *Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970*

E-mail: fabyano_alvares@yahoo.com.br

Palavras-chave: *Trichoderma* spp, fungos fitopatógenos, enzimas hidrolíticas, capacidade micoparasítica.

INTRODUÇÃO

Desde a sua criação, a cultura agrícola coexiste com pragas que devastam inúmeras lavouras, sejam causadas por microorganismos, como fungos ou bactérias, ou por insetos. Todo esse problema levou a utilização de vários agrotóxicos, produtos que causam danos irreparáveis a natureza, interferindo no equilíbrio da comunidade local (LISS *et al.*, 1985; ALFENAS *et al.*, 2004; KUNEIDA-ALONSO *et al.*,2005).

MONTE *et al.* (2001) relata a necessidade de novos métodos que consigam reduzir perdas, que podem atingir até 100% da produção, em lavouras de feijão (*Phaseolus vulgaris*) causadas por fungos fitopatógenos de solo como *Rhizoctania solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

Devido aos efeitos danosos causado ao meio ambiemte e a procura por métodos mais eficientes, o uso de agrotóxicos vem sendo mudado gradualmente pelo o uso de agentes de controle biológicos (ACB), principalmente quando se trata de doenças causadas por fungos fitopatógenos de solo (MANSEOUR *et al.,* 2008).

O *Trichoderma* spp.; é um dos principais ACBs para fungos fitopatogênicos, detendo quase 50% do mercado (WHIPPS *et al.,* 2001), ele tambem é utilizado na bioremediação do solo, contribuindo na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que estão presentes em agrotóxicos, fato devido a produção de um grande arsenal hidrolases, peroxidases e outras enzimas líticas (AZCBN-AGUILAR & BAREA, 1997; KATAYAMA & MATSUMURA, 1991).

De acordo com o banco de dados virtual GenBank (NCBI), que utiliza o Index Fungorum (ver www.indexfungorum.org) como fonte de referência, esse gênero pertence ao Domínio Eucaryota, “Grupo” Fungi/Metazoa, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes. Subclasse

Hypocreomycetidae, Ordem Hypocreales, “Família” Hypocreales mitospóricos (ou Família Hypocreacea, Gênero *Hypocrea* na forma teleomórfica). Este Index, organizado por diferentes e renomadas instituições (CAB Biosciences – Inglaterra, CBS - Holanda, e Landcare Research – Nova Zelândia), é constantemente revisado e atualizado, constituindo uma fonte de referência bastante confiável e útil para fins acadêmicos.

Umas de suas principais características do gênero *Trichoderma* é produzir conídios em abundância a partir de conidióforos que se originam diretamente das hifas, os quais originam colônias caracteristicamente esverdeadas. O gênero *Trichoderma* é natural do solo, especialmente os orgânicos, podendo viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos, havendo poucos relatos sobre ocorrência de doenças de plantas causadas por *Trichoderm*a (KUBICEK *et al*., 2001). Além disso, são fungos mesófilos, sensíveis a temperaturas e pH extremos, apesar de desenvolverem melhor em condições ácidas em relação ao último recurso (MELO, 1996), e são sensíveis a presença de íons metálicos em alta concentração, principalmente de Ca^{2+} (KÜÇÜK *et al*., 2008).

A utilização de *Trichoderma* spp.; tem sido satisfatória, conseguindo cumprir seu papel como ACB de vários fitopatógenos (fungos, invertebrados ou bactérias) em diversas culturas agrícolas (EAPEN *et al*., 2005; HANSON & HOWELL, 2002; COTXARRERA *et al*., 2002) além de promover a resistências de certas plantas, monocotiledôneas ou dicotiledôneas, a esses fitopatógenos (BIGIRIMANA, 1997; DE MEYER *et al*., 1998; HARMAN *et al*., 2004).

O controle do crescimento dos fitopatógenos, utilizando o *Trichoderma* spp.; pode ocorrer por vários mecanismos: competição por nutrientes, produção de antibióticos voláteis e não voláteis e produção de enzimas capazes de hidrolisar a parede celular do hospedeiro (SILVAN *&* CHET, 1989). O último mecanismo também é conhecido como micoparasitismo e é o mais estudado e importante mecanismo de controle biológico se tratando de *Trichoderma* spp.;.

A interação do *Trichoderma* spp.; com o fungos patógenos se dá por enovelamentos, se prendendo a hifa hospedeira por meio de ganchos, e penetração da parede celular através da secreção de enzimas líticas (KUBICEK, *op cit.*).

A parede celular da maioria dos fungos fitopatógenos é constituída por um esqueleto estrutural de quitina disposto em camadas ordenadas e β-1,3-glicanas entre essas camadas, formando uma matriz inter-territorial. Dessa forma, o sistema

quitinolítico, principalmente as quitinases e a N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAGase), as β-1,3-glicanases e as β-glicosidases são fundamentais no processo de micoparasitismo (KUBICEK, *op cit.*).

As enzimas que degradam o polímero de quitina foram divididas por SAHAI & MANOCHA (1993) em três grandes grupos: a) 1,4-β-N-acetilglicosaminidases que quebram a quitina liberando monômeros de N-acetil-D-glicosamina; b) endoquitinases que clivam aleatoriamente a molécula de quitina em sítios internos, liberando oligossacarídeos; c) exoquitinases que catalisam a liberação progressiva de diacetilquitobiose, sem a liberação de mono e oligossacarídeos.

As β-1,3-glicanases, de acordo com o modo de ataque ao substrato, são classificadas como exo ou endo-β-1,3-glicanases, estes dois mecanismos de ação são identificados pelos produtos de hidrólise (PITSON *et al.*, 1993). As exo-β-1,3-glicanases hidrolisam o substrato, β-1,3-glicana, pela clivagem seqüencial de resíduos de glicose a partir da extremidade não redutora, o principal produto de hidrólise é glicose podendo gerar também dissacarídeos e outros oligossacarídeos. As endo-β-1,3-glicanases clivam o substrato aleatoriamente liberando cadeias menores. Entretanto, as exo e endo-β-1,3-glicanases podem agir simultaneamente na hidrólise de β-glicanas de uma forma sinergística. DE LA CRUZ *et al.* (1995) relatam que esta enzima é importante no mecanismo de micoparasitismo, pois é expressa na presença de quitina e parede celular de fungos fitopatogênicos.

As β-glicosidases constituem o maior grupo de enzimas glico-hidrolíticas, catalisando especificamente a clivagem das ligações glicosídicas (HENRISSAT *et al.*, 1989). Essas celobiases degradam a celobiose e celulo-oligossacarídeos, originados após a ação das exo e endo-β-glicanases, a glicose. Essa enzima tem papel fundamental no sistema degradação da celulose e tem sido utilizada em suplementos comerciais de celulose, aumentando a hidrólise da celulose (ASHADI *et al.*, 1996; LYND *et al.*, 2002).

As fosfatases são enzimas que conseguem hidrolisar ésteres e anidridos de ácido fosfórico em fosfato inorgânico (BECK *et al.*, 1989; GUIMARÃES *et al.*, 2004), participando de vários processos biológicos, tais como assimilação de fósforo pela planta (TATE, 1984), metabolismo intermediário e sinalização celular. De acordo com o pH estas enzimas são divididas em dois grupos: fosfatases alcalinas, com pH ótimo igual ou superior a 8,0 e fosfatases ácidas, com pH ótimo de atuação igual ou inferior a 6,0 (GUIMARÃES *et al*, *op cit.*). As fosfatases ácidas são enzimas que

catalisam a hidrólise de uma variedade de compostos fosfatados monoesteres, com a produção de fósforo solúvel, contribuindo para o metabolismo energético, mecanismos de sinalização celular (DICKMAN & YARDEN, 1999) e aquisição de fósforo com propósito nutricional (WALSH *et al.*, 1994).

2 – OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram:

1) Avaliar a atividade enzimática das enzimas NAGase, fosfatase ácida, β-glicosidase e β-1,3-glicanase produzidas pelos isolados de *Trichoderma* spp. em presença da parede celular de *Rhizoctonia solani, Fusarium oxysporum, Fusarium solani e Sclerotinia sclerotiorum*;

2) Analisar, através de experimentos de pareamento de culturas, o potencial de isolados de *Trichoderma* spp.; contra os fitopatógenos em estudo.

3) Treinamento em técnicas de enzimologia e bioquímica de microrganismos.

3 – METODOLOGIA

3.1 - Isolados utilizados

Vinte isolados de *Trichoderma* spp.; extraídos do solo de diferentes regiões do Brasil, e os fitopatógenos: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum,* pertencem a coleção da Embrapa Arroz e Feijão (CPNAF) e foram cedidas pelo Pesquisador Murilo Lobo Junior.

3.2 – Teste de pareamento de culturas

A capacidade de enovelamento dos isolados de *Trichoderma* spp. com os fitopatógenos em estudo foi realizada através da cultura de pareamento modificada por LIMA (2002). Um disco de micélio dos isolados de *Trichoderma* spp. (0,5 cm de diâmetro) e do fitopatógeno foram colocados a 3 cm de distância entre eles em uma lâmina de microscopia contendo 200 µL de meio mínimo [$MgSO_4.7H_2O$ 1,0 g L^{-1}, KH_2PO_4 10,0 g L^{-1}, $(NH_4)_2SO_4$ 6,0 g L^{-1}C, Citrato de Sódio. $2H_2O$ 3,0 g L^{-1} , Glicose 10,0 g L^{-1}, solução elementos traços 0,1% e Ágar ágar 15 g L^{-1}]. Colocada em uma placa de Petri contendo papel de filtro umedecido, a lâmina foi apoiada em palitos de madeira, evitando o contato com o papel. O papel de filtro era umedecido a cada 48 horas. As lâminas foram incubadas a 28ºC até 24 e 48 horas após a interação

Trichoderma-hospdeiro. O crescimento dos fungos foi paralisado através de uma solução de Paraformaldeido 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 acrescido de sacarose 3% e sua coloração foi feita por ácido periódico-Schiff. As lâminas foram levadas à microscopia óptica e observadas a fresco e coloridas em um aumento de 400x e1000x, respectivamente.

3.3 – Produção de enzimas

Para a produção de enzimas hidrolíticas, discos de 3 mm de diâmetro originados das placas dos isolados de *Trichoderma* spp., foram colocados em erlenmeyer de 250 mL contendo 10 mL de meio TLE [$CaCl_2.2H_2O$ 0,3 g L^{-1} , KH_2PO_4 2,0 g L^{-1}, $(NH_4)_2SO_4$ 1,4 g L^{-1}, $MgSO_4.7H_2O$ 0,3 g L^{-1}, Uréia 0,3 g L^{-1}, Peptona 1,0 g L^{-1} e solução elementos traços (Fe^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}) 0,1%] e parede celular do fitopatógeno liofilizada e macerada (0,5%) como fonte de carbono e nitrogênio. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à 28ºC e velocidade de 120 rpm. Após 48 horas de incubação, o sobrenadante de cultura foi coletado, através de uma filtração à vácuo, e utilizado como fonte das enzimas hidrolíticas: NAGase, β-1,3-glicanases, β-glicosidase e fosfatase ácida.

3.4 – Ensaios enzimáticos e determinação de proteína

A atividade de NAGase foi determinada usando-se *p*-nitrofenil-β-N-acetilglicosamina (p-NPNAG) (Sigma Chemical Company) como substrato na concentração de 5 mM (ULHOA & PEBERDY, 1992). A mistura de ensaio contém 10 µL da enzima a 40 µL de solução de p-NPNAG e 100 µL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0. Após incubação da mistura a 37 ºC por 15 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 100 µL de Na_2CO_3 1 M. A quantidade de p-nitrofenol (p-NP) foi determinado espectrofotometricamente a 405nm. A curva padrão foi feita utilizando p-nitrofenol (p-NP). Uma unidade de enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 µmol de p-NP por minuto.

A atividade de fosfatase ácida foi determinada usando-se p-nitrofenilfosfato (p-NPP) (Sigma Chemical Company) como substrato na concentração de 5 mM (LEITÃO, 2007). A mistura de ensaio contém 10 µL da enzima a 40 µL de solução de p-NPP e 100 µL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8. Após incubação da mistura a 37 ºC por 15 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 100 µL de Na_2CO_3 1 M. A quantidade de p-nitrofenol (p-NP) foi determinado

espectrofotometricamente a 405nm. A curva padrão foi feita utilizando p-nitrofenol (p-NP). Uma unidade de enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 µmol de p-NP por minuto.

A atividade de β-glicosidase foi determinada usando-se *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (p-NPGluc) (Sigma Chemical Company) como substrato na concentração de 5 mM (GUNATA & VALLIER, 1999). A mistura de ensaio contém 10 µL da enzima a 40 µL de solução de p-NPGluc e 100 µL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5. Após incubação da mistura a 37 °C por 60 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 100 µL de Na_2CO_3 1 M. A quantidade de p-nitrofenol (p-NP) foi determinado espectrofotometricamente a 405nm. A curva padrão foi feita utilizando p-nitrofenol (p-NP). Uma unidade de enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 µmol de p-NP por minuto.

A atividade de β-1,3-glicanase foi determinada usando-se laminarina (Sigma Chemical Company) como substrato a 0,25% em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (NORONHA & ULHOA, 2000). A mistura de ensaio contém 50 µL da enzima a 100 µL de solução de laminarina 0,25%. Após incubação da mistura a 40 °C por 30 minutos, adicionou-se 1 mL de ácido 3,5-Dinitrossalicílicoreação (DNS). As amostras foram colocadas em banho-maria fervente por 5 minutos. Em seguida, a leitura das amostras foi realizada no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 550 nm. Uma unidade de enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 µmol açúcar redutor por minuto.

A concentração de proteínas foi determinada pela metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA-Sigma) como padrão. Amostras de 100 □L do sobrenadante de cultura foram adicionados a 1 mL da solução de Bradford. Após incubação por 15 minutos, à temperatura ambiente foi realizada a leitura de absorbância das amostras à 595nm.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Teste de pareamento de culturas

O gênero *Trichoderma* é bastante conhecido por sua atuação como agente de controle biológico, sendo alvo de inúmeras pesquisas para uma melhor utilização na agricultura. O micoparasitismo é o principal processo de parasitismo do *Trichoderma* e esse é precedido por uma fase de enovelamento do *Trichoderma* à hifa hospedeira, essa interação se deve a estruturas semelhantes a ganchos denominadas de apressório (BENITEZ *et al.*, 2004). Como o enovelamento e colonização da hifa por fungos é um ponto importante no controle biológico, realizou-se a análise da capacidade de enovelamento de vários isolados de *Trichoderma* spp., oriundos de diversas regiões do Brasil, durante crescimento contra *R. solani*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*.

A princípio, foi realizado apenas o confronto do isolado ALL-42 com os quatro fitopatógenos. O primeiro contato entre o ALL-42 e os fitopatógenos ocorreu dentro de 2-3 dias após o inoculo (Figura 1 e 2). Esse resultado coincide com o resultado de ALMEIDA *et al.* (2007) que relata a interação do *T. harzianum* com o *R. solani* em um período de 2-3 dias. ABDULLAH *et al.* (*op cit.*) também encontrou resultados similares aos descritos neste trabalho quando utilizou *S. sclerotiorum* como modelo.

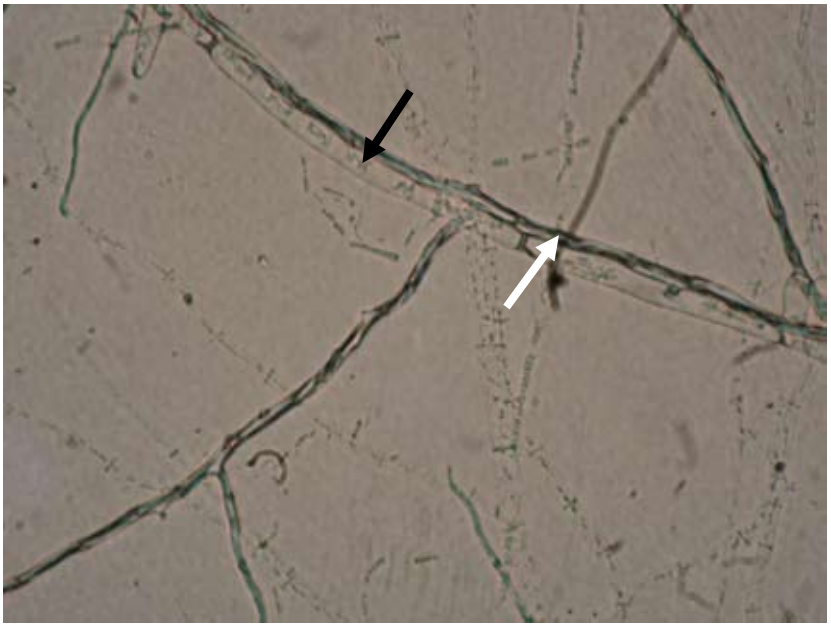


Figura 1 – Microscopia óptica do enovelamento da hifa do ALL-42 (seta branca) sobre a hifa do *R. solani* (seta preta) a fresco. (x400)

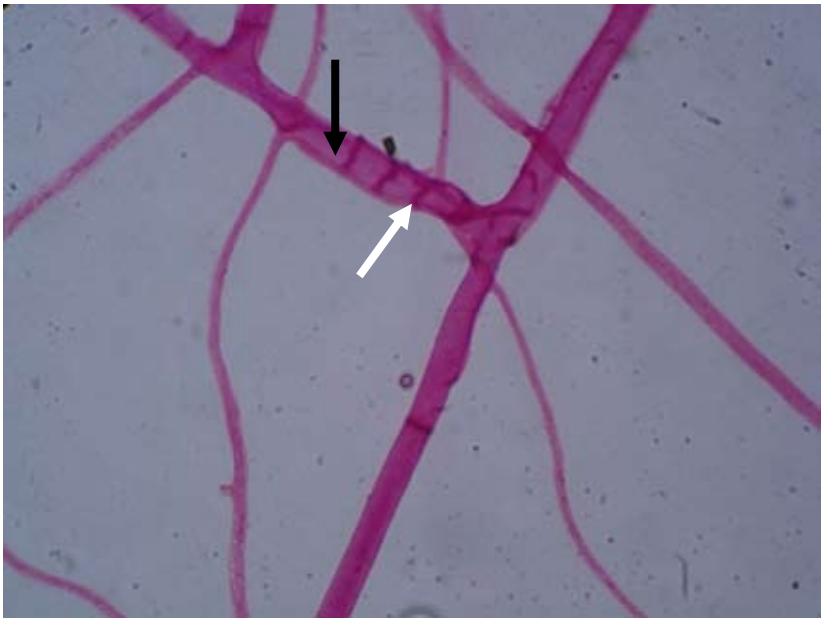


Figura 2 – Microscopia óptica do enovelamento da hifa do ALL-42 (seta branca) sobre a hifa do *R. solani* (seta preta) em coloração sua coloração por ácido periódico-Schiff. (x1000)

A freqüência de enovelamento será realizada no segundo semestre de 2009 através da análise de 10 áreas na zona de interação entre antagonista/patógeno em três repetições segundo técnica descrita por ALMEIDA *et al*. (*op cit*.).

Esta primeira etapa do projeto foi importante para o estabelecimento de um protocolo rápido, barato e de fácil execução que utiliza apenas microscopia óptica.

4.2 – Ensaios enzimáticos e determinação de proteínas

Em geral, obteve-se uma maior produção de proteínas extracelulares quando os isolados foram inoculados em presença de parede celular de *F. oxysporum*. O único isolado que não produziu uma quantidade igual ou superior a 20 µg/mL de proteínas, em qualquer parede celular, foi o 360/01. O isolado 41/02, em presença de parede celular de *F.* oxysporum, obteve o maior destaque na produção de proteínas. Em presença de parede celular de *R. solani*, 15 isolados produziram uma quantidade inferior ou igual a 20 µg/mL de proteínas, 4 isolados produziram uma quantidade entre 20 e 40 µg/mL de proteínas e o isolado 27/04 produziu uma quantidade superior ou igual a 40 µg/mL. Em presença de parede celular de *F. solani*, 12 isolados produziram uma quantidade inferior a 20 µg/mL de proteínas, 6 isolados produziram uma quantidade entre 20 e 40 µg/mL de proteínas e os isolados 327/02 e 55/01 e produziu uma quantidade superior a 40 µg/mL. Em presença de

parede celular de *F. oxysporum*, 1 isolado produziu uma quantidade inferior a 20 µg/mL de proteínas, os isolados 481/02 e 17/06 produziram uma quantidade entre 20 e 40 µg/mL de proteínas e 17 isolados produziram uma quantidade superior a 40 µg/mL. Em presença de parede celular de *S. sclerotiorum*, 8 isolados produziram uma quantidade inferior a 20 µg/mL de proteínas, 9 isolados produziram uma quantidade entre 20 e 40 µg/mL de proteínas e os isolados 03/06, 46/05 e 51/01 produziram uma quantidade superior a 40 µg/mL (tabela 1).

Tabela 1 – Concentração de proteínas produzidas por diferentes isolados inoculados em presença de parede celular de *R. solani*, *F. solani, F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*.

	Proteínas totais (µg/mL)			
ISOLADOS	*R. solani*	*F. solani*	*F. oxysporum*	*S. sclerotiorum*
ALL - 42	35,565 ± 0,484	33,521 ± 31,572	66,564 ± 2,130	28,028 ± 0,501
17/06	4,425 ± 0,813	4,287 ± 5,438	37,567 ± 2,438	8,716 ± 1,253
360/01	3,545 ± 0,484	11,374 ± 9,956	15,920 ± 0,271	9,956 ± 4,510
481/02	19,983 ± 7,991	9,779 ± 9,248	37,280 ± 2,845	19,435 ± 3,633
03/06	15,632 ± 2,303	10,134 ± 8,982	73,678 ± 0,948	41,494 ± 1,754
19/03	23,493 ± 1,574	6,944 ± 7,210	54,234 ± 0,000	17,841 ± 0,626
27/04	106,743 ± 2,980	12,437 ± 9,248	52,036 ± 1,378	19,435 ± 1,879
46/05	19,384 ± 2,058	28,560 ± 27,585	69,399 ± 6,139	62,578 ± 2,506
41/02	19,469 ± 2,422	14,386 ± 15,626	132,385 ± 12,528	29,269 ± 0,752
55/02	4,743 ± 0,242	28,737 ± 27,497	99,696 ± 0,877	17,043 ± 0,251
362/02	8,682 ± 1,695	21,650 ± 18,815	77,195 ± 0,376	29,446 ± 3,007
398/01	12,277 ± 1,695	5,527 ± 5,881	43,886 ± 1,128	12,437 ± 2,005
47T/01	14,932 ± 2,543	16,512 ± 17,486	95,887 ± 7,016	21,296 ± 5,011
45/01	31,113 ± 0,969	9,602 ± 9,425	86,319 ± 5,262	7,919 ± 1,879
327/02	29,443 ± 0,061	40,608 ± 40,254	79,852 ± 5,638	29,003 ± 0,626
346/01	14,503 ± 0,242	25,371 ± 23,776	97,393 ± 3,383	23,067 ± 0,501
55/01	13,604 ± 0,303	90,040 ± 87,648	121,489 ± 2,881	94,469 ± 1,002
352/01	16,301 ± 1,574	18,107 ± 18,372	71,437 ± 0,251	25,725 ± 0,000
301/01	18,870 ± 0,121	25,902 ± 24,396	68,513 ± 3,884	27,320 ± 0,752
362/01	4,829 ± 0,848	25,548 ± 25,637	53,187 ± 3,758	25,194 ± 1,002

Todos isolados produziram NAGase, porém apenas 12 isolados obtiveram uma atividade enzimática superior a 0,010 U/mL quando inoculados em presença de parede celular de algum fitopatógeno. O isolado 19/03, em presença de parede celular de *F.* oxysporum, obteve a maior atividade enzimática de NAGase. Os isolados, quando inoculados em presença de parede celular de *F. solani*, apresentaram atividade enzimática inferior a 0,010 U/mL (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade enzimática de N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAGase) de diferentes isolados inoculados em presença de parede celular de *R. solani*, *F. solani, F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*.

NAGase (U/mL)												
ISOLADOS	*R. solani*			*F. solani*			*F. oxysporum*			*S. sclerotiorum*		
ALL - 42	0,237	±	0,029	0,068	±	0,002	0,015	±	0,002	0,049	±	0,007
17/06	0,109	±	0,004	0,005	±	0,002	0,025	±	0,002	0,011	±	0,000
360/01	0,053	±	0,004	0,058	±	0,006	0,294	±	0,116	0,026	±	0,003
481/02	0,088	±	0,031	0,023	±	0,001	0,022	±	0,002	0,020	±	0,002
03/06	0,044	±	0,004	0,024	±	0,001	0,044	±	0,001	0,024	±	0,003
19/03	0,293	±	0,028	0,075	±	0,010	0,665	±	0,049	0,046	±	0,016
27/04	0,076	±	0,039	0,027	±	0,006	0,020	±	0,001	0,026	±	0,012
46/05	0,046	±	0,015	0,012	±	0,001	0,021	±	0,000	0,059	±	0,000
41/02	0,014	±	0,002	0,015	±	0,002	0,049	±	0,001	0,038	±	0,002
55/02	0,012	±	0,002	0,051	±	0,002	0,052	±	0,004	0,063	±	0,005
362/02	0,040	±	0,005	0,031	±	0,001	0,292	±	0,005	0,080	±	0,039
398/01	0,084	±	0,005	0,030	±	0,004	0,106	±	0,020	0,032	±	0,005
47T/01	0,025	±	0,000	0,048	±	0,001	0,094	±	0,005	0,026	±	0,007
45/01	0,054	±	0,007	0,015	±	0,003	0,281	±	0,054	0,013	±	0,001
327/02	0,118	±	0,017	0,023	±	0,001	0,149	±	0,020	0,062	±	0,006
346/01	0,031	±	0,002	0,021	±	0,002	0,318	±	0,004	0,050	±	0,001
55/01	0,075	±	0,001	0,006	±	0,001	0,028	±	0,004	0,011	±	0,004
352/01	0,082	±	0,001	0,024	±	0,008	0,246	±	0,005	0,029	±	0,012
301/01	0,023	±	0,000	0,036	±	0,023	0,095	±	0,001	0,019	±	0,001
362/01	0,013	±	0,001	0,005	±	0,003	0,012	±	0,007	0,012	±	0,001

Em relação a atividade enzimática de fosfatase ácida, 11 isolados apresentaram atividade enzimática superior a 0,010 U/mL em presença de pelo menos uma parede celular de um fitopatógeno. Os isolados 46/05, 41/02 e 55/02 apresentaram atividade enzimática de fosfatase ácida superior a 0,020 U/mL em presença de duas paredes celulares. O isolado 27/04, em presença de parede celular de *S. sclerotiorum*, obteve a maior atividade enzimática de fosfatase ácida. Os isolados, quando inoculados em presença de parede celular de *F. oxysporum*, apresentaram atividade enzimática inferior a 0,010 U/mL (Tabela 3).

Tabela 3 – Atividade enzimática de fosfatase ácida de diferentes isolados inoculados em presença de parede celular de *R. solani*, *F. solani, F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*.

Fosfatase ácida (U/mL)												
ISOLADOS	*R. solani*			*F. solani*			*F. oxysporum*			*S. sclerotiorum*		
ALL - 42	0,080	±	0,007	0,012	±	0,000	0,034	±	0,005	0,017	±	0,004
17/06	0,125	±	0,011	0,016	±	0,005	0,012	±	0,001	0,010	±	0,003
360/01	0,037	±	0,011	0,030	±	0,000	0,067	±	0,015	0,013	±	0,005
481/02	0,026	±	0,003	0,017	±	0,005	0,010	±	0,002	0,017	±	0,005
03/06	0,145	±	0,021	0,057	±	0,027	0,021	±	0,003	0,017	±	0,005
19/03	0,174	±	0,004	0,070	±	0,010	0,057	±	0,000	0,027	±	0,006
27/04	0,087	±	0,001	0,146	±	0,005	0,016	±	0,000	0,379	±	0,050
46/05	0,091	±	0,002	0,245	±	0,033	0,019	±	0,004	0,282	±	0,003
41/02	0,242	±	0,007	0,114	±	0,008	0,034	±	0,003	0,305	±	0,005

55/02	0,023	±	0,002	0,250	±	0,038	0,042	±	0,005	0,296	±	0,016
362/02	0,112	±	0,001	0,246	±	0,032	0,039	±	0,000	0,041	±	0,009
398/01	0,084	±	0,006	0,004	±	0,002	0,038	±	0,008	0,013	±	0,003
47T/01	0,063	±	0,013	0,176	±	0,024	0,046	±	0,000	0,077	±	0,009
45/01	0,031	±	0,006	0,027	±	0,001	0,024	±	0,005	0,010	±	0,002
327/02	0,154	±	0,011	0,323	±	0,018	0,101	±	0,013	0,186	±	0,018
346/01	0,146	±	0,028	0,035	±	0,001	0,023	±	0,001	0,077	±	0,006
55/01	0,074	±	0,008	0,027	±	0,002	0,043	±	0,008	0,015	±	0,001
352/01	0,115	±	0,014	0,098	±	0,018	0,074	±	0,001	0,040	±	0,010
301/01	0,073	±	0,001	0,043	±	0,000	0,025	±	0,003	0,012	±	0,003
362/01	0,026	±	0,001	0,026	±	0,004	0,030	±	0,007	0,035	±	0,005

Apenas 6 isolados apresentaram atividade enzimática de β-glicosidase inferior a 0,05 U/mL em presença qualquer parede celular. O isolado 346/01 apresentou todas as atividades enzimáticas entre 0,05 e 0,10 U/mL. Os isolados 19/03, 41/02 e 362/02 apresentaram uma atividade enzimática de β-glicosidase superior a 0,10 U/mL em presença de parede celular de *R.* solani, sendo o primeiro o de maior destaque (Tabela 4).

Tabela 4 – Atividade enzimática de β-glicosidase de diferentes isolados inoculados em presença de parede celular de *R. solani*, *F. solani, F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*.

	β-glicosidase (U/mL)											
ISOLADOS	*R. solani*			*F. solani*			*F. oxysporum*			*S. sclerotiorum*		
ALL - 42	0,011	±	0,001	0,024	±	0,001	0,057	±	0,004	0,030	±	0,000
17/06	0,024	±	0,004	0,020	±	0,002	0,005	±	0,001	0,024	±	0,002
360/01	0,006	±	0,002	0,023	±	0,003	0,069	±	0,003	0,037	±	0,003
481/02	0,029	±	0,000	0,006	±	0,000	0,004	±	0,000	0,005	±	0,001
03/06	0,049	±	0,003	0,008	±	0,001	0,012	±	0,000	0,031	±	0,001
19/03	0,229	±	0,012	0,043	±	0,011	0,046	±	0,000	0,026	±	0,005
27/04	0,044	±	0,008	0,025	±	0,006	0,007	±	0,001	0,062	±	0,004
46/05	0,023	±	0,001	0,039	±	0,005	0,009	±	0,001	0,094	±	0,024
41/02	0,103	±	0,010	0,043	±	0,002	0,020	±	0,000	0,090	±	0,001
55/02	0,021	±	0,000	0,052	±	0,006	0,025	±	0,001	0,032	±	0,009
362/02	0,152	±	0,006	0,026	±	0,001	0,027	±	0,001	0,053	±	0,000
398/01	0,021	±	0,001	0,018	±	0,001	0,020	±	0,000	0,041	±	0,004
47T/01	0,017	±	0,003	0,053	±	0,009	0,078	±	0,003	0,048	±	0,000
45/01	0,011	±	0,003	0,004	±	0,002	0,009	±	0,001	0,016	±	0,015
327/02	0,027	±	0,003	0,081	±	0,002	0,027	±	0,001	0,010	±	0,000
346/01	0,086	±	0,020	0,071	±	0,008	0,068	±	0,003	0,097	±	0,004
55/01	0,016	±	0,006	0,009	±	0,000	0,016	±	0,002	0,010	±	0,004
352/01	0,016	±	0,002	0,026	±	0,001	0,024	±	0,001	0,049	±	0,003
301/01	0,012	±	0,005	0,012	±	0,003	0,032	±	0,002	0,059	±	0,000
362/01	0,007	±	0,003	0,060	±	0,001	0,033	±	0,001	0,065	±	0,001

Quando inoculados em presença de parede celular de *F. oxysporum,* somente dois isolados apresentaram atividade enzimática de β-1,3-glicanase superior a 1 U/mL. 12 isolados apresentaram atividade enzimática de β-1,3-glicanase superior a

3 U/mL em presença de pelo menos uma parede celular de fitopatógeno. Os isolados 19/03 e ALL-42 apresentaram atividade enzimática superior a 6 U/mL, sendo o último o de maior destaque (Tabela 4).

Tabela 4 – Atividade enzimática de β-1,3-glicanase de diferentes isolados inoculados em presença de parede celular de *R. solani*, *F. solani, F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*.

	β-1,3-glicanase (U/mL)			
ISOLADOS	*R. solani*	*F. solani*	*F. oxysporum*	*S. sclerotiorum*
ALL - 42	5,126 ± 0,134	3,020 ± 0,098	0,226 ± 0,002	6,059 ± 0,234
17/06	2,301 ± 0,069	2,362 ± 0,142	0,197 ± 0,001	2,327 ± 0,042
360/01	0,547 ± 0,025	2,551 ± 0,033	1,021 ± 0,055	2,413 ± 0,015
481/02	1,552 ± 0,060	0,801 ± 0,021	0,203 ± 0,020	0,806 ± 0,007
03/06	4,067 ± 0,041	1,406 ± 0,034	0,224 ± 0,010	1,411 ± 0,018
19/03	1,880 ± 0,044	4,174 ± 0,224	1,259 ± 0,015	6,051 ± 0,049
27/04	0,904 ± 0,023	0,976 ± 0,015	0,282 ± 0,013	2,034 ± 0,005
46/05	0,667 ± 0,034	0,718 ± 0,005	0,315 ± 0,019	3,046 ± 0,011
41/02	2,616 ± 0,256	0,797 ± 0,007	0,394 ± 0,008	3,441 ± 0,005
55/02	0,738 ± 0,008	1,430 ± 0,095	0,379 ± 0,021	1,212 ± 0,038
362/02	0,760 ± 0,029	1,632 ± 0,005	0,655 ± 0,020	4,537 ± 0,078
398/01	1,311 ± 0,008	0,994 ± 0,033	0,551 ± 0,005	5,183 ± 0,096
47T/01	1,382 ± 0,042	2,973 ± 0,105	1,486 ± 0,007	2,109 ± 0,036
45/01	1,356 ± 0,052	0,886 ± 0,051	0,216 ± 0,010	1,901 ± 0,059
327/02	1,937 ± 0,015	2,463 ± 0,052	0,451 ± 0,002	4,952 ± 0,002
346/01	5,625 ± 0,134	2,957 ± 0,062	0,727 ± 0,020	5,734 ± 0,435
55/01	1,493 ± 0,052	0,572 ± 0,011	0,290 ± 0,015	0,843 ± 0,049
352/01	1,206 ± 0,065	1,780 ± 0,126	0,468 ± 0,035	5,004 ± 0,258
301/01	1,002 ± 0,025	1,061 ± 0,046	0,781 ± 0,004	3,687 ± 0,062
362/01	2,513 ± 0,188	3,430 ± 0,034	0,223 ± 0,017	4,504 ± 0,047

5 – CONCLUSÃO

Durante a execução deste projeto um protocolo rápido de avaliação da interação *Trichoderma harzianum* (ALL42) x *R. solani* através de microscopia ótica foi desenvolvido. Este protocolo será utilizado neste segundo semestre para avaliar o mecanismo de interação de outros 19 isolados.

Todos isolados testados foram capazes de produzir as enzimas relacionadas ao mecanismo de controle biológico (NAGase, fosfatase ácida, β-glicosidase e β-1,3-glicanase). A capacidade de cada isolado em produzir estas enzimas será associada à capacidade de inibir o crescimento dos fitopatógenos *Rhizoctonia solani, Fusarium oxysporum, Fusarium solani e Sclerotinia sclerotiorum*, através de técnicas de pareamento de culturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, M.T.; ALI, N.Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop protection**. v. 27. p. 1354-1359. 2008.

ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004.

ALMEIDA, F.B.; CERQUEIRA, F.M.; SILVA, R.N.; ULHOA, C.J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**. v.29. p. 1189-1193. 2007.

ASHADI, R.W.; SHIMOKAWA, K.; OGAWA, K. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. 2. Mode of action of cellulose hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger* UC. **Journal of General and Applied Microbiology**. v. 42. p.103 – 108. 1996.

AZCBN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae**. v.68 p. 1–24. 1997.

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. p. 248-254. 1976.

BECK, E.; FUBEDER, A.; KRAUS, M. The maize root system in situ: evaluation of structure and capability of utilization of phytate and inorganic soil phosphates. **Zeitschrift fu¨ r Pflanzenera¨hrung und Bodenkunde**. v.152. p. 159–167. 1989.

BENITEZ, T.; RINCON, A.M.; LIMON, M.C.; CODON, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**. v.7(4) p. 249–260. 2004.

BIGIRIMANA, J. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. **Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent**. v. 62. p. 1001–1007. 1997.

COTXARRERA, L.; TRILLAS-GAY, M.I., STEINBERG, C., ALABOUVETTE, C. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 34 p. 467–476. 2002.

DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J.A.; BENÍTEZ, T.; LLOBELL, A.; ROMERO, L.C. A novel endo-β-1,3-glucanase, BGN 13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Bacteriology**. v.177 (23). P. 6937-6945. 1995.

DE MEYER, G., BIGIRIMANA, J., ELAD, Y. & HOFTE, M. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**. v.104 p. 279–286. 1998.

DICKMAN, M.B.; YARDEN, O. Serine/Threonine Protein Kinases and Phosphases in filamentous Fungi. **Fungal Genetic Biology**. v. 26. p. 99 – 117. 1999.

EAPEN, S.J.; BEENA, B.; RAMANA, K.V. Tropical soil microflora of spicebased cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **Journal Invertebrate Pathology**. v. 88. p. 218–225. 2005.

GUIMARÃES, L. H. S. Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**.v. 40. p. 201-207. 2004.

GUNATA, Z.; VALLIER, M.J. Production of a highly glucose-tolerant extracellular β-glucosidase by three *Aspergillus* strains. **Biotechnology Letters**. v.21. p.219–223. 1999.

HARMAN, G. E., PETZOLDT, R., COMIS, A. & CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology** v. 94 (2). p. 147-153. 2004.

HANSON, L.E.; HOWELL, C.R. Biocontrol efficacy and other characteristics of protoplast fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens*. **Mycological Research**. v.106 p. 321–328. 2002.

HENRISSAT, B. ; CLAEYSSENS, M. ; TOMME, P. ; LEMESLE, L. ; MORNON, J. P. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster-analysis. **Gene**. v. 81 p. 83 – 95. 1989.

KATAYAMA, A.; MATSUMURA, F. Photochemically enhanced microbial degradation of environmental pollutants. **Environmental Science & Technology**. v.25. p. 1329–1333. 1991.

KUBICEK, C.P.; MACH, R. L.; PETERBAUER, C. K.; LORITO M. *Trichoderma*: From genes to biocontrol. **Journal of Plant Pathology.** v. 83 (2). p. 11-23. 2001.

KÜÇÜK, C.; KIVANÇ, M.; KINACI, E.; KINACI, G. Determination of the growth and solubilization capabilities of *Trichoderma harzianum* T1. **Biologia**. v. 63 (2). P. 167-170. 2008.

KUNIEDA-ALONSO, S.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A. Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma s*pp., em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. **Fitopatologia brasileira.** v.30 (2). p. 164-168. 2005.

LEITÃO, V. O. **Purificação e caracterização bioquímica de uma fosfatase ácida produzida por *Trichoderma harzianum***. Dissertação (Mestrado em Biologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

LIMA, A. L. **Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp isolados de solo do cerrado brasileiro**. 2002. Tese (Doutorado) - Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

LISS, S.N.; BREWER, D.; TAYLOR, A.; JONES, G.A. Antibiotic activity of an isocyanide metabolite of *Trichoderma hamatum* against rumen bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 31. p.767–772. 1985.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN-ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.66. p. 506 – 577. 2002.

MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como Bioprotetores de Plantas. In: LUZ, W.C. (ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo – R.S - EMBRAPA**. v.4. p. 261 - 295. 1996.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology.** v.4. p. 1-4. 2001.

NORONHA, E.F. & ULHOA, C.J. Characterization of a 29-KDa β-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Lett**. v.183. p.119–123. 2000.

PITSON, S.M.; SEVIOUR, R.J.; McDOUGALL, B.M. Noncellulolytic fungal β-glucanases: their physiology and regulation. **Enzyme Microbial and Technology**. v.15. p. 178-192. 1993.

SAHAI, A.S.; MANOCHA, M.S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Review**. v.11. p. 317-388. 1993.

SILVAN, A.; CHET, I. Degradation of Fungal Cell Walls by Lytic Enzymes of *Trichoderma harzianum*. **Journal of General Microbiology**. v.135. p. 675 – 682. 1989.

TATE, K.R. The biological transformations of P in soil. **Plant and Soil**. v.76. p. 245 – 256. 1984.

ULHOA, C.J & PEBERDY, J.F. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technologyl**. v.14 (3). p.236–240. 1992.

WALSH, G. A.; POWER, R. F.; HEARDSON, D. R. Enzymes in the animal feed industry. **TIFS**. v. 5, p. 81 – 82, 1994.

WHIPPS, J.M. & LUMSDEN, R.D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects, in: T. Butt, C. Jackson, N. Magan (Eds.), Fungal Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. **CABI Publishing**. p. 9–22. 2001.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE β-1,3-glucanases PRODUZIDAS POR ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. EM PRESENÇA DE PAREDE CELULAR DE FITOPATÓGENOS

Amanda Rafaela Rodrigues[a], Cirano José Ulhoa[a,*]
[a] *Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970*

E-mail: amandaraphaella@yahoo.com.br

Palavras-chave: *Trichoderma* spp, fungos fitopatógenos, enzimas hidrolíticas, β-1,3-glucanase

INTRODUÇÃO

Um grande problema observado nas culturas agrícolas são as pragas que devastam e causam doenças às plantações, estas que podem ser causadas por microorganismos como o fungo *Rhizoctonia solani* ou bactérias como *Pseudomonas syringae* e insetos (HARMAN *et al.,*2004). Doenças de plantas, principalmente causadas por patógenos de solo, são responsáveis por grandes perdas em culturas de importância econômica (MENEZES,2002).

Como forma de controlar esse problema a utilização de agrotóxicos foi viabilizada, apesar de ser uma alternativa no combate as pragas, o controle químico de doenças de plantas não é totalmente eficiente, além de proporcionar danos ao ecossistema como contaminação de água, resíduos químicos no solo e danos à saúde humana (MENEZES,2002).

Sabe-se que no controle de fitopatógenos, os métodos utilizados vêm sendo aperfeiçoados com objetivo de assegurar que os produtos químicos sejam usados corretamente, diminuindo os riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Assim, o controle biológico de patógenos substitui os agroquímicos. Entre os biocontroladores usados contra fitopatógenos, tem se destacado *Trichoderma spp. (*REIS et al*.,* 1995*).*

O gênero *Trichoderma* é representado por fungos não patogênicos que são habitantes do solo, fungos antagonistas que possuem um mecanismo de ação denominado micoparasitismo que envolve a produção de enzimas hidrolíticas tais como quitinases e β-1,3-glucanases (HARAN *et al.,*1996). Tais enzimas possuem atividade antifúngica individualmente ou atuando em sinergismo quando em mistura com antibióticos.

O banco de dados virtual GenBank (NCBI) classifica o gênero *Trichoderma* pertencente ao Domínio Eucaryota, "Grupo" Fungi/Metazoa, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes. Subclasse Hypocreomycetidae, Ordem Hypocreales, "Família" Hypocreales mitospóricos (ou Família Hypocreacea, Gênero *Hypocrea* na forma teleomórfica). Esta classificação é revisada e atualizada com freqüência caracterizando-se como referência confiável.

ETHUR *et al.* (2008) relatam que a habilidade do gênero *Trichoderma* em controlar fungos de solo varia, sendo possível melhorar a atuação desses agentes pela seleção de isolados com maior potencial de antagonismo, principalmente contra fitopatógenos que interferem na produção de mudas. Os resultados da utilização de *Trichoderma spp.* como agente de controle biológico tem sido satisfatórios, além de proteger plantas, monocotiledôneas e dicotiledôneas (HARMAN *et al.*,2004), por meio de diferentes mecanismos de ação e por colonizar eficientemente o substrato de várias espécies de plantas, esse gênero está entre os microorganismos mais resistentes às toxinas e produtos químicos naturais sendo capazes de degradar alguns compostos tóxicos sintetizados pelo homem, como hidrocarbonetos e pesticidas (LIMA, 2002).

A parede celular, que mantém a rigidez da célula e confere proteção, está associada a compostos como quitina e β-1,3-glucanas (SILVA *et al.* 2003). Glucanas são polímeros de glucose que são classificados de acordo com sua ligação glicosídica da cadeia principal, participando nos fungos como componentes menores do citosol, da parede celular e polissacarídeos excretados ao meio (SILVA *et al.,*2005). A parede celular também apresenta em menor quantidade β-1,6-glucanas, estas que possuem ocorrência rara na natureza sendo que as ligações glicosídicas deste tipo ocorrem em conjunto com ligações do tipo β-1,3 (SILVA *et al.* 2003).

O polissacarídeo β-1,3-glucana é o componente mais abundante da parede celular de fungos e sua hidrólise enfraquece essa parede podendo resultar na morte celular (HONG e MENG, 2003). As β-glucanases fúngicas estão associadas aos processos de sobrevivência e degradação (NORONHA *et al*., 2000). O crescente interesse no estudo das β-glucanases concentra-se no seu potencial de aplicação industrial, considerando sua ação hidrolítica sobre diversas substâncias naturais (KIRK *et al.*, 2002).

As β-1,3-glucanases são classificadas de acordo com o seu modo de ataque ao substrato sendo exo ou endo- β-1,3-glucanases. As exo-β-1,3-glucanases

hidrolisam o substrato, β-1,3-glucana, pela clivagem seqüencial de resíduos de glicose a partir da extremidade não redutora. As endo-β-1,3-glucanases clivam o substrato aleatoriamente liberando cadeias menores. As exo e endo-β-1,3-glucanases podem agir simultaneamente na hidrólise de β-glucanas de uma forma sinergística. DE LA CRUZ *et al.* (1995) relatam que esta enzima é importante no mecanismo de micoparasitismo.

Através da purificação das β-1,3-glucanases fúngicas, foi verificado que os microorganismos não produzem uma proteína específica e sim um conjunto de proteínas com diferentes massas moleculares, pH e temperatura ótimos, porém, com a mesma especificidade, ou seja, estes fungos produzem β-1,3-glucanases diversas (SILVA *et al.*,2003). Dentre as β-1,3-glucanases purificadas e caracterizadas por fungos do gênero *Trichoderma* as mais estudadas são aquelas produzidas por isolados de *T. harzianum* que é descrito na literatura como produtor de um complexo enzimático que contém no mínimo sete β-1,3-glucanases (Martin *et al*., 2007). Os possíveis motivos da existência desta multiplicidade enzimática incluem a expressão de genes diferentes e as possíveis modificações pós-traducional (MARTIN *et al*.,2001).

A literatura revela que há um aumento na atividade de β-1,3-glucanase quando crescida na presença de paredes celulares de fungos, sugerindo que a regulação da expressão de β-1,3-glucanase nestes fungos pode ser influenciada pela quantidade de β-glucana presente no meio de cultivo, que atua como agente indutor.

2 – OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram:

1) Avaliar a atividade enzimática de β-1,3-glucanases produzidas pelos isolados de *Trichoderma* spp. em presença da parede celular dos fitopatógenos *Rhizoctonia solani, Fusarium oxysporum, Fusarium solani e Sclerotinia sclerotiorum*;

2) Obter bons produtores de β-1,3-glucanases e identificar diferentes atividades enzimáticas.

3 – METODOLOGIA

3.1 - Isolados utilizados

Vinte isolados de *Trichoderma* spp.; de diferentes regiões do Brasil, e isolados dos fitopatógenos: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum,* pertencentes a coleção da Embrapa Arroz e Feijão (CPNAF). Todos os isolados foram cedidos pelo Pesquisador Murilo Lobo Junior.

3.2 – Produção de enzimas

Para a produção de β-1,3-glucanases, discos de 3 mm de diâmetro retirados de placas dos isolados de *Trichoderma* spp., foram inoculados em erlenmeyer de 250 mL contendo 10 mL de meio TLE [$CaCl_2.2H_2O$ 0,3 g L^{-1} , KH_2PO_4 2,0 g L^{-1}, $(NH_4)_2SO_4$ 1,4 g L^{-1}, $MgSO_4.7H_2O$ 0,3 g L^{-1}, Uréia 0,3 g L^{-1}, Peptona 1,0 g L^{-1} e solução elementos traços (Fe^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}) 0,1%] e parede celular dos fitopatógenos *R. solani*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *S. sclerotiorum.* Estes que foram liofilizados e macerados para serem utilizados como fonte de carbono e nitrogênio (0,5%). As culturas foram incubadas a 28°C a 120rpm. Após 48 horas de crescimento, o sobrenadante de cultura foi coletado através de filtração à vácuo para retirada do micélio, e utilizado como fonte da enzima hidrolítica: β-1,3-glucanase.

3.3 – Ensaios enzimáticos e determinação de proteína

A atividade de β-1,3-glucanase foi determinada segundo a metodologia descrita por NORONHA & ULHOA (2000) utilizando o microensaio. Utilizou-se 20µL de solução de laminarina 0,75%, diluída em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0 e 10µL do meio. A mistura foi incubada a 50 °C por 10 minutos, e a atividade enzimática foi determinada usando o método de detecção de açúcares redutores, adicionando 100 µL de ácido 3,5-Dinitrossalicílico (ADNS). As amostras foram colocadas em banho-maria fervente por 5 minutos. A leitura das amostras foi realizada em um comprimento de onda de 550 nm. A unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 µmol açúcar redutor por minuto.

A concentração de proteínas foi determinada pelo método Bradford (1976). Amostras de 100 µL de sobrenadante de cultura foram adicionados a 1 mL da

solução de Bradford. Após incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, foi realizada no espectrofotômetro a leitura de absorvância das amostras à 595nm.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Ensaios enzimáticos e determinação de proteínas

Pode se observar que a maior produção de proteínas extracelulares ocorreu em presença de parede celular de *F. oxysporum* que juntamente com o isolado 41/02 obteve maior produção de proteínas em relação aos outros isolados obtendo 132 µg /mL, apenas o isolado 360/01 produziu uma quantidade inferior a 20 µg/mL de proteínas, os isolados 481/02 e 17/06 produziram uma quantidade entre 20 e 40 µg/mL de proteínas e 17 isolados produziram uma quantidade superior a 40 µg/mL quando inoculados com a mesma parede. Os isolados que apresentaram menor quantidade de proteínas foram 17/06 e 360/01 em presença de parede celular de *R. solani,* ambos obtiveram um resultado de 4 µg /mL de proteínas.

Ainda em presença de parede celular de *R. solani*, 15 isolados apresentaram uma quantidade inferior ou igual a 20 µg/mL de proteínas, 4 isolados produziram uma quantidade entre 20 e 40 µg/mL de proteínas e o isolado 27/04 se destacou com quantidade superior a 40 µg/mL. Com parede celular de *F. solani*, 12 isolados apresentaram quantidade inferior a 20 µg/mL de proteínas, 7 isolados produziram entre 20 e 40 µg/mL de proteínas e o isolado 55/01 obteve resultado superior a 40 µg/mL. Quando inoculados em presença de parede celular de *S. Sclerotiorum,* 8 isolados obtiveram resultados inferiores a 20 µg/mL de proteínas, 9 isolados se apresentaram entre 20 e 40 µg/mL de proteínas e os isolados 03/06, 46/05 e 55/01 se destacaram na produção de proteínas com quantidade superior a 40 µg/mL (tabela 1).

Tabela 1 – Concentração de proteínas produzidas por diferentes isolados quando inoculados em presença de parede celular de *R. solani*, *F. solani, F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*.

PROTEÍNAS TOTAIS				
µg/mL				
ISOLADOS	*R.solani*	*F.solani*	*F.oxysporum*	*S.sclerotiorum*
17/06	4,425	5,438	37,567	8,716
360/01	3,545	9,956	15,920	9,956
481/02	19,983	9,248	37,280	19,435
03/06	15,632	8,982	73,678	41,494
19/03	23,493	7,210	54,234	17,841
27/04	106,743	9,248	52,036	19,435
46/05	19,384	27,585	69,399	62,578
41/02	19,469	15,626	132,385	29,269
55/02	4,743	27,497	99,696	17,043
362/02	8,682	18,815	77,195	29,446
398/01	12,277	5,881	43,886	12,437
47T/01	14,932	17,486	95,887	21,296
45/01	31,113	9,425	86,319	7,919
327/02	29,443	40,254	79,852	29,003
346/01	14,503	23,776	97,393	23,067
55/01	13,604	87,648	121,489	94,469
352/01	16,301	18,372	71,437	25,725
301/01	18,870	24,396	68,513	27,320
362/01	4,829	25,637	53,187	25,194
ALL - 42	35,565	31,572	66,564	28,028

Dos 19 isolados inoculados em diferentes paredes celulares, 7 apresentaram alta atividade enzimática em ensaio liquido. O isolado 346/01 produziu mais unidades de β-1,3-glucanases (4,23 U/mL) que o isolado controle ALL-42 (3,61 U/mL) em presença de parede celular de *R. solani*.

Inoculados em presença de parede celular de *F. oxysporum,* três isolados apresentaram atividade enzimática de β-1,3-glucanase superior a 1 U/mL sendo eles, 360/01; 19/03 e 47T/01. Apenas os isolados 346/01 e ALL-42 apresentaram atividade enzimática de β-1,3-glucanase superior a 3 U/mL quando inoculados em presença de parede celular de *R. solani* . O isolado que apresentou menores unidades de β-1,3-glucanase foi 362/01 quando inoculado em presença de parede celular de *F. oxysporum* (0,211 U/mL). O isolado 19/03 foi destaque entre os isolados inoculados com *S. sclerotiorum* apresentando resultado superior ou igual a 2 U/mL. (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade enzimática de β-1,3-glucanase de diferentes isolados inoculados em presença de parede celular de *R. solani*, *F. solani, F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*.

B -1,3- glucanase				
Atividade Enzimática (U)				
ISOLADOS	*R.solani*	*F.solani*	*F.oxysporum*	*S.sclerotiorum*
17/06	0,612	0,663	0,197	0,741
360/01	0,266	0,691	1,061	0,700
481/02	0,760	0,305	0,217	0,254
03/06	1,045	0,387	0,231	0,403
19/03	1,999	0,972	1,269	2,290
27/04	0,295	0,376	0,292	1,030
46/05	0,418	0,376	0,302	1,215
41/02	1,557	0,326	0,400	1,412
55/02	0,321	0,492	0,364	0,460
362/02	0,494	0,538	0,642	1,442
398/01	0,848	0,396	0,554	1,481
47T/01	0,584	1,170	1,491	0,712
45/01	0,617	0,347	0,209	0,537
327/02	0,802	0,863	0,449	1,622
346/01	4,230	0,997	0,741	1,667
55/01	0,721	0,249	0,279	0,289
352/01	0,794	0,577	0,493	1,278
301/01	0,429	0,326	0,779	1,016
362/01	1,087	1,118	0,211	1,175
ALL - 42	3,610	0,904	0,225	2,070

As atividades específicas variaram de acordo com as paredes celulares dos fitopatógenos. A maior atividade específica foi encontrada no isolado 346/01 (291,677 U/mg) quando inoculado em presença de parede celular de *R. solani* e a menor atividade foi observada no isolado 45/01 (2,295 U/mg) quando inoculado em presença de parede celular de *F. oxysporum*. (Tabela 3).

Tabela 3 – Atividade específica de β-1,3-glucanase de diferentes isolados inoculados em presença de parede celular de *R. solani*, *F. solani, F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*.

B -1,3- glucanase				
Atividade específica (U/mg)				
ISOLADOS	*R.solani*	*F.solani*	*F.oxysporum*	*S.sclerotiorum*
17/06	138,206	121,986	5,247	84,963
360/01	75,100	69,407	66,624	70,332
481/02	38,039	33,018	5,812	13,045
03/06	66,818	43,096	3,128	9,717
19/03	85,088	134,806	23,399	128,374
27/04	2,763	40,613	5,602	52,973
46/05	21,574	13,615	4,350	19,414
41/02	79,966	20,867	3,020	48,236
55/02	67,773	17,888	3,652	26,968
362/02	56,921	28,589	8,311	48,962
398/01	69,040	67,382	12,624	119,071
47T/01	39,110	66,910	15,552	33,423
45/01	19,842	36,795	2,417	67,783
327/02	27,224	21,429	5,626	55,943
346/01	291,677	41,946	7,604	72,283
55/01	52,996	2,840	2,295	3,062
352/01	48,678	31,409	6,901	49,688
301/01	22,710	13,365	11,363	37,179
362/01	225,132	43,617	3,966	46,624
ALL - 42	101,497	28,635	3,376	73,867

5 – CONCLUSÃO

Os isolados em destaque são produtores de β-1,3-glucanases, enzimas capazes de auxiliar no controle biológico. Esta enzima pode atuar inibindo o crescimento dos fitopatógenos *R. solani, F. oxysporum, F.solani* e *S. sclerotiorum*, através de técnicas de pareamento de culturas. Porém, para afirmar a eficiência desta enzima contra os fitopatógenos em questão serão necessários maiores estudos para confirmação dos dados obtidos até o momento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. p. 248-254. 1976.

DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J.A.; BENÍTEZ, T.; LLOBELL, A.; ROMERO, L.C. A novel endo-β-1,3-glucanase, BGN 13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Bacteriology**. v.177 (23). P. 6937-6945. 1995.

ETHUR,L.Z.; BLUME, E. et al.(2008) *Trichoderma harzianum* no desenvolvimento e na proteção de mudas contra a fusariose do tomateiro. **Ciência e Natura**.30(2):57-69.UFSM.

HARAN, S.; SCHICKEKER, H. & CHET, I. (1996). Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology** 142: 2321 – 2331.

HARMAN, G. E., PETZOLDT, R., COMIS, A. & CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology** v. 94 (2). p. 147-153. 2004.

HONG,T.Y.; MENG, M. (2003). Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-β-1,3-glucanase of *Paenibacillus sp*. Isolated from garden soil. Appl. **Microbiology and Biotechnology** 61:472-478.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C.C. (2002). Industrial enzyme applications.**Current Opinion in Biotechnology** 13: 345 – 351.

LIMA, A. L. **Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp isolados de solo do cerrado brasileiro**. Brasília – DF. UnB. ICB / Departamento de Fitopatologia. Imprensa Universitária. 2002. 73p. (Tese de Doutorado)

MARTIN,K.; MCDOUGALL, B.M. *et al.*(2007) Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β-(1,3)- and β-(1,6)-glucanases.FEMS **Microbiol Rev**. 168-192.

MENEZES,J.P. (2002). TRICHODERMA SPP - MICRORGANISMO UTILIZADO NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS. **Agronline**. UFSM.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. (1996). Purification and Characterization of an Endo-β-1,3-Glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal Microbiology** 42: 1039 – 1044.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. (2000). Characterization of a 29-KDa β-1,3-Glucanase from *Trichoderma harzianum*. FEMS **Microbiology Letters** 183: 119 – 123.

REIS, A., OLIVEIRA, S.M.A. de, MENEZES, M. *et al*. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.21, n.1, p.16-20, 1995.

SILVA, M.L.C. *et al.* (2003). Glucanases fúngicas. Produção e aplicação das d β-1,3 e β-1,6 glucanases. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. Ano VI n 30.

SILVA,M.L.C ; MARTINEZ,P.F *et al*.(2005) Chemical characterization and biotechnology applications of fungal glucans. **Química Nova** vol.29 no.1 São Paulo.

Modelo Térmico para Escoamento de Óleo e Água em Meios Porosos

Marcos Vinícius de Oliveira Silva, Dr. Jesus Carlos da Mota

Instituto de matemática e estatística, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-Go 74001-970, Brasil

Email: marcosvo4@hotmail.com , jesus@ufg.mat.br

Palavras-chave: Problema de Riemann, Sistemas de conservação, Equação de Burger.

1 Introdução

Fenômenos de propagação de ondas não lineares como escoamento de um fluido multifásico em meios porosos, impulsos eletromagnéticos através de fibras nervosas, e muitos outros fenômenos, são modelados matematicamente por um sistema de leis de conservação. O objetivo final deste trabalho era, usando técnicas como o método das características, estudar a solução do problema de Riemann (problema de valor inicial com dados iniciais constantes por partes) para o seguinte sistema de leis de conservação,

$$s_t + f_x = e s_{xx} \tag{1}$$

$$\big((s+a)\theta\big)_t + \big((f+b)\theta\big)_x = e((s+a)\theta)_{xx}. \tag{2}$$

Este sistema foi deduzido em [4], e modela o escoamento de óleo e água num meio poroso (reservatório petrólifero), levando-se em conta variações de temperatura, condutividade térmica e pressões capilares.

Aqui, $s = s(x,t)$ é a saturação da água e $\theta = \theta(x,t)$ a temperatura. A função $f = f(s,\theta)$ é não linear e representa o fluxo de água através do meio poroso. Os termos do segunda ordem representam as viscosidades, como pressões capilares e condutividades térmicas. Estes termos de segunda ordem podem ser dimensionalmente pequenos, em comparação com os termos de primeira ordem. Neste caso, o problema recai no estudo das soluções do problema de valor inicial para o sistema parabólico de duas leis de concervação, dado por (1)-(2) quando $(e = 0)$.

Neste trabalho concluiu-se a solução do problema de Riemann para o caso particular em que a temperatura é considerada constante, $\theta = \theta_0$, e portanto o sistema reduz-se apenas à esquação escalar (1), conforme Seção 6.

O trabalho inicial do projeto foi fazer uma revisão de tópicos de equações diferenciais parciais [1], incluindo tópicos de análise de Fourier [2], onde foram estudados o problema de Cauchy para as equações da onda, Seção 2, e do calor, Seção 3. Foram ainda estudados o conceito de solução fraca para um sistema de leis de conservação [3], conforme Seção 5, e a solução do problema de Riemann para a equação de Burger, Seção 4.

2 Equação de onda

Estudamos o problema para pequenas vibrações transversais de uma corda perfeitamente flexível. As vibrações são consideradas que ocorrem no plano (x, u). A corda vibra em torno da posição de repouso ao longo do eixo x e as partículas que compõem a corda se deslocam apenas na direção do eixo u. Foi considerado que a corda não ofereça resistência ao ser dobrada. Com essas hipóteses a equação diferencial, a função $u(x, t)$ que representa a posição da corda no ponto x e no instante t, é;

$$u_{tt} = c^2 u_{xx} + h(x, t, u), \tag{3}$$

onde $c(x, t)^2 = \frac{\tau(t)}{\rho(x)}$ e $h(x, t, u) = \frac{h_1(x,t,u)}{\rho(t)}$, $\rho(x)$ é a densidade da corda, $\tau(t)$ as forças de tensão e $h_1(x, t, u)$ a densidade linear das forças externas (como gravidade, resistência do ar, etc.) que atuam sobre a corda.

De acordo com as forças externas, que atuam sobre a corda, a equação (3) pode variar.

Exemplos:

(i) Supondo que as únicas forças atuantes sejam as de tensão, a equação (3) é dada por

$$u_{tt} = c^2 u_{xx}, \tag{4}$$

onde c e ρ são consideradas constantes.

(ii)Supondo que a corda esteja sujeita a uma força exterior $h(x,t)$, que pode variar com x e t, então a equação (3) é dada por

$$u_{tt} = c^2 u_{xx} + h(x,t), \tag{5}$$

Caso em que as forças externas sobre a corda e as de tensão são constantes.Nesse caso, a equação da onda é dada por (4), com c constante.

Proposição 1. *Se $u(x,t)$ satisfaz a equação $u_{tt} = c^2 u_{tt}$, c > 0 constante, então existem funções φ e ψ reais de variável real, ou seja, $\varphi, \psi : \mathbb{R} \longrightarrow \mathbb{R}$, tais que*

$$u(x,t) = \varphi(x+ct) + \psi(x-ct) \tag{6}$$

Dem. *A função $v(\xi,\eta) = u(x,t)$ satisfaz*

$$v_{\xi\eta} = 0,$$

onde $\xi = x + ct$, $\eta = x - ct$ e $v(\xi,\eta) = u(x,t)$.

Integrando diretamente a equação acima, primeiramente em η e depois em ξ, obtemos

$$v(\xi,\eta) = \varphi(\xi) + \psi(\eta)$$

onde φ e ψ são funções arbitrárias de classe C^2. voltandos as variáveis x,t, temos que $u(x,t) = \varphi(x+ct) + \psi(x-ct)$.

A fórmula (6) é chamada solução geral da equação (4).

Considere agora a vibração de uma corda de comprimento infinito. Nesse caso, não existem condições de fronteira a satisfazer, e assim, o problema consiste em buscar uma função $u(x,t)$ definida no plano $x \in \mathbb{R}$ e $t \geq 0$, tal que a equação (4) seja satisfeita, com a condição inicial

$$\begin{aligned} u(x,0) &= f(x) \\ u_t(x,0) &= g(x) \end{aligned} \tag{7}$$

onde $f(x)$ e $g(x)$ são funções dadas. $f(x) \in C^2(\mathbb{R})$ e $g(x) \in C^1(\mathbb{R})$, pois procuramos soluções $u \in C^2(\mathbb{R})$.

Proposição 2. *(Fórmula de D'Alembert) A função* u *dada por*

$$u(x,t) = \frac{f(x+ct)+f(x-ct)}{2} + \frac{1}{2c}\int_{x-ct}^{x+ct} g(s)dx)$$

é a única solução do problema (4)-(7).

3 Equação do calor

Considere o problema de valor inicial e de fronteira (PVIF) dado por

$$\begin{aligned} &u_t - au_{xx} = 0, \\ &u(x,0) = f(x), \ \ 0 \leq x \leq L, \\ &(0,t) = 0 = u(L,t), \ \ t > 0. \end{aligned} \tag{8}$$

sobre uma região $D = \{(x,t) \in \mathbb{R}^2 : 0 \leq x \leq L, t \geq 0\}$.

Para encontrarmos a solução, basta escrever a função u como produto de duas funções, uma dependendo de x e a outra de t, isto é,

$$u(x,t) = F(x)G(t)$$

Substituindo essa igualdade na equação (8) temos:

$$F(x)G'(t) = aF"(x)G(t) \Rightarrow \frac{1}{a}\frac{G'(t)}{G(t)} = \frac{F"(x)}{F(x)}$$

Logo

$$G'(t) = aG(t), t > 0$$
$$F"(x) - aF(x) = 0, 0 < x < LeF(0) = f(l) = 0$$

A primeira equação tem solução geral: $G(t) = ce^{abt}$. A segunda equação tem solução geral: $F(x) = c_1 cos(\lambda x) + c_2 sen(\lambda x)$, se $b < 0$ e $b = -\lambda^2$.

Com as condições iniciais temos que para cada $n \in \mathbb{Z}^*$

$$u_n(x,t) = e^{\frac{-n^2\pi^2\alpha}{L^2}t} sen(\frac{n\pi}{L}x),$$

é a solução diferencial em questão. Como essa equação é linear, qualquer combinação linear do tipo

$$u(x,t) = \Sigma_{n=1}^{N} c_n u_n(x,t), N \in \mathbb{N}^*$$

é solução da equação, mas não satisfaz a condição inicial $u(x,0) = f(x)$ para qualquer função f dada.

Logo um candidato a solução do problema de valor inicial e de fronteira é

$$u(x,t) = \Sigma_{n=1}^{\infty} c_n e^{\frac{-n^2\pi^2\alpha}{L^2}t} sen(\frac{n\pi}{L}).$$

Se f é escrita na forma

$$f(x) = \Sigma_{n=1}^{\infty} c_n sen(\frac{n\pi}{L}x),$$

o problema se reduz em verificar as propriedades da série de Fourier para a função f de tal modo que a função u acima, seja solução do problema de valores inicial e de fronteira (8).

Definição 1. *Uma função $u : D \longrightarrow \mathbb{R}$, contínua, $D = \{(x,t) \in \mathbb{R}^2 : 0 \leq x \leq L, t > 0\}$, é uma solução PVIF se:*

1.$u_t = au_{xx}, t > 0, 0 < x < L$*;*

2.$u(0,t) = u(L,t) = 0, t > 0$*;*

3.$lim_{t \longrightarrow 0} \int_0^L u(x,t)\varphi(x)dx = \int_0^L f(x)\varphi(x)dx$ *para toda função* $\varphi : [0,L] \longrightarrow \mathbb{R}$ *seccionalmente contínua.*

O que garante as condições mínimas para que u seja solução segundo a definição acima é o teorema a seguir:

Teorema 1. *Se f for de quadrado integrável em $[0,L]$, então $u : D \longrightarrow \mathbb{R}$ é solução do PVIF segundo a definição 1.*

4 Equação de Burger

Considere a seguinte equação

$$u_t + (\frac{u^2}{2})_x = 0. \tag{9}$$

Esta equação é denominda de equação de Burger, e pode ser escrita na forma

$$u_t + uu_x = 0. \tag{10}$$

Esta equação tem a propriedade de que apenas as funções de classe C^1, em $t > 0$, são aquelas monotonicamente não decrescentes em x, para cada $t > 0$.

Agora suponha que u é uma solução de classe C^1 em $t > 0$. Para qualquer ponto (x_o, y_o), $t_o > 0$, denote por $x(t)$ a curva característica por este ponto, a qual é dada por,

$$\frac{dx}{dt} = u(x,t), x(t_o) = x_o. \tag{11}$$

O seguinte cálculo

$$\frac{du(x(t),t)}{dt} = u_x \frac{dx}{dt} + u_t = u_x u + u_t = 0,$$

mostra que de fato u é constante ao longo das características. Portanto as características são retas que possuem inclinação constante, que é igual ao valor de u ao longo dessas linhas. Então para cada $t \geq 0, u(x_1, t) \leq u(x_2)$, se $x_1 < x_2$. Contudo, essas características se interceptam em algum ponto em $t > 0$, mas u é de classe C^1 em $t > 0$, então isso não pode ocorrer.

Logo se $u(x, 0) = u_o(x)$ e $u'_o(\bar{x}) < 0$ para algum $\bar{(x)}$, então (9) não pode ter uma solução de classe C^1 definida para todo $t > 0$.

5 Soluções fracas

Considere o seguinte problema de valor inicial em $t > 0$

$$u_t + f(u)_x = 0, u(x, 0) = u_o(x). \tag{12}$$

Suponha u uma solução clássica de (12) e seja C^1_o a classe das funções C^1 e suporte compacto no semi-plano $t \geq 0$.

Definição 2. *Uma solução mensurável $u(x,t)$ é chamada de solução fraca do problema de valor inicial (12) com valor inicial u_o, se satisfazer*

$$\int \int_{t \geq o} (u\phi_t + f(u)\phi_x) dxdt + \int_{t=0} u_o \phi dx = 0, \tag{13}$$

para toda $\phi \in C^1_o$.

É possível provar que (13) implica na seguinte igualdade

$$s(u_t - u_r) = f(u_t) - f(u_r), \tag{14}$$

onde s é a velocidade de descontinuidade. Essa relação é chamada de *condição de salto* e na dinâmica de gases é conhecida como *condição de Rankine-Hugoniot*. Não mostraremos que (13)⇒(14) neste trabalho.

Exemplo: Considere a equação de Burger (9). Por (14) temos:

$$s(u_t - u_r) = \frac{1}{2}(u_t^2 - u_r^2), \tag{15}$$

desde que $u_t \neq u_r$, $s = \frac{(u_t+u_r}{2}$.

Com isso, considere a seguinte equação de Burger com valores:

$$u(x,0) = \begin{cases} 1, & \text{x} < 0 \\ 1-x, & \text{0} \leq x \leq 1 \\ 0, & \text{x} > 1 \end{cases}$$

Usando o método das características nós obtemos a fórmula dada por

$$u(x,t) = \begin{cases} 1, & \text{x} < t \\ \frac{1-x}{1-t}, & \text{t} \leq x \leq 1 \\ 0, & \text{x} > 1 \end{cases}$$

Vimos que esta equação é definida somente para $t < 1$, para $t \geq 1$, usamos (15) com $u_t = 1$, $u_r = 0$ e $s = \frac{1}{2}$, então se $t \geq 1$, nós definimos u por

$$u(x,t) = \begin{cases} 1, & \text{x} < 1 + \frac{1}{2}(t-1) \\ 0, \text{x} > 1 + \frac{1}{2}(t-1) & \end{cases}$$

6 A solução do problema de Riemann escalar

Nesta seção, apresentamos um resumo da solução do problema de Riemann para a equação de Buckley-Leverett,

$$\begin{cases} s_t + f(s)_x = 0 \\ s(x,o) = \begin{cases} s_l, & \text{x} < 0 \\ s_r, & \text{x} > 0 \end{cases} \end{cases} \tag{16}$$

onde $(x,t) \in \mathbb{R} \times \mathbb{R}_+$, $0 \leq s_l, s_r \leq 1$ e f satisfaz as seguintes propriedades:

(i) $f(0,\theta) \equiv 0, f(1,\theta) \equiv 1$;

(ii) Para cada θ fixo,f é estritamente crescente como função de s e tem um único ponto de inflexão $\bar{s}$; $0 < \bar{s} < 1$;

(iii)$f_s(o,\theta) = f_s(1,\theta) = 0; 0 \leq \theta \leq 1$;

(iv) Para cada s fixo,f é estritamente decrescente como função de θ.

6.1 Ondas de rarefação.

Se λ é o autovalor de f' e se $s(x.t) = s(\frac{x}{t})$ é solução suave do problea de Riemann (16), dependendo de $\xi = \frac{x}{t}$, logo

$$\lambda(s(\xi)) = \xi.$$

Como no caso da equação escalar de lei de conservação $s_t + f(s)_x = 0$, o autovalor de f' é o próprio f', chegamos em:

$$f'(s(\xi)) = \xi \tag{17}$$

isto é, $s = (f')^{-1}$.

Logo, para o problema (16) as ondas de rarefação serão do tipo:

$$s(x,t) = \begin{cases} s_l, & x < \lambda(s_l); \\ s(\frac{x}{t}), & \lambda(s_l) \leq \frac{x}{t} \leq \lambda(s_r); \\ s_r, & x > \lambda(s_r)t \end{cases} \tag{18}$$

onde $s(\frac{x}{t})$ satisfaz (17), $\lambda(s_l) = f'(s_l)$ e $\lambda(s_r) = f'(s_r)$.

Seja $\bar{s}$ o único ponto de inflexão da função f. De acordo com o que encontramos acima, $\lambda = f'$ é crescente de s_l até s_r se, e somente se, $s_l < s_r < \bar{s}$ ou $\bar{s} < s_r < s_l$, isto é, o problema (16) apenas poderá ser resolvido por uma onda de rarefação se, e somente se, essas desigualdades são satisfeitas por s_l e s_r. Sendo a velocidade inicial dada por $v_i = \lambda(s_l) = f'(s_l)$ e a velocidade final dada por $v_f = \lambda(s_r) = f'(s_r)$.

6.2 Ondas de choque

Para o problema de Riemann (16), as ondas de choque com velocidade σ são soluções do tipo:

$$s(x,t) = \begin{cases} s_l, & x < \sigma t \\ s_r, & x > \sigma t \end{cases} \tag{19}$$

onde σ, s_l e s_r satisfazem a condição de Rankine-Hugoniot

$$f(s_l) - f(s_r) = \sigma(s_l - s_r). \tag{20}$$

Para todo s entre s_l e s_r, a condição de entropia exigida pelas ondas de choque com velocidade σ é

$$[f(s) - f(s_l) - \sigma(s - s_l)]sign(s_r - s_l) > 0 \tag{21}$$

O que significa que para todo s entre s_l e s_r, a inclinação da reta que passa pelos pontos $(s_l, f(s_l))$ e $(s, f(s))$ é maior do que a velocidade de choque.

Temos que as velocidades inicial e final de uma onda de choque são idênticas à velocidade do choque. $v_i = v_f = \sigma$

6.3 Solução do problema de Riemann

Em primeiro lugar descrevemos a solução do problema (16) no caso em que $s_l < s_r$.

A solução depende da posição de s_r, em relação ao ponto de inflexão $\bar{s}$.

Se $s_r \leq \bar{s}$, a solução é uma onda de rarefação, dado por (18).

Se $s_r > \bar{s}$, defina um estado intermediário s_m, tal que

$$f'(s_m) = \frac{f(s_m) - f(s_r)}{s_m - s_r}. \tag{22}$$

Se $s_m \leq s_l$, então a solução é uma onda de choque com velocidade σ dada em (20). Agora se $s_l < s_m$, então a solução é uma onda de rarefação de s_l até s_m seguida de uma onda de choque de s_m até s_r com velocidade σ dada por (22). Essa última solução é denominada *onda composta* com *estado intermediário* s_m. No onda composta, a velocidade final da rarefação $f'(s_m)$, é igual a velocidade σ do choque.

O caso em que $s_l > s_r$ é análogo.

7 Referências Bibliográficas

Referências

[1] V. Iório, *EDP um curso de graduação*, 2 ed., IMPA, Rio de Janeiro, 2005.

[2] D. G. Figueiredo, *Análise de Fourier e euqações diferenciais parciais*, IMPA, Rio de Janeiro,2003.

[3] J. Smoller, *Shock waves and reaction-diffusion equations* , 2 ed.,New York: Springer,1994.

[4] J. C. da Mota, *The Riemann problem for a simple thermal model for two phase flow in porous media* , Mat. Aplic. Comp., v.11, n. 2, pp.117-145, (1992).

Anotação e detecção de *SNPs* em genes da superfamília WD40 de *Eucalyptus* spp.

Natália Silveira Virgili[1,3] , Carlos de Melo e Silva Neto[1], Alexandre Siqueira Guedes Coelho[2]

[1]Instituto de Ciências Biológicas/UFG

[2]Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos/UFG

[3]e-mail: natsvirgili@gmail.com

Palavras-chave: Polimorfismo, *primers*, EST, marcador molecular, *Genolyptus*.

INTRODUÇÃO

Muitas famílias de proteínas são caracterizadas pelas suas seqüências-motivo comuns, função catalítica e/ou estrutura. A superfamília de proteínas de repetição WD40 são caracterizadas pela presença de 40 resíduos centrais delimitados inicialmente pelo dipeptídeo glicina-histidina (GH) e terminando com o dipeptídeo triptofano-ácido aspártico (WD).

O domínio WD, também conhecido como Trp-Asp, GH-WD ou WD40 é encontrado em diversas proteínas eucarióticas, envolvidas em uma grande variedade de processos celulares. Esse módulo, encontrado em repetições, se estende por aproximadamente 40 aminoácidos, sendo que as repetições possivelmente formam uma estrutura circularizada do tipo beta-*propeller* (SMITH *et al*., 1999).

A região central, conservada da unidade de repetição, WD, foi primeiramente encontrada na subunidade beta da proteína G heterotrimérica, responsável pela transdução de sinal através da membrana plasmática.

Estudos prévios mostraram que em 82% das unidades de repetição em que GH e WD (ou seus equivalentes não ambíguos) puderam ser identificados, existia um alcance máximo de 23-41 aminoácidos entre GH (Gly-His) e WD. Na mesma repetição o número de aminoácidos contados de WD até o próximo GH foi bem variável (6-94 aminoácidos), porém, seqüências menores são mais comuns, onde a unidade de repetição tem uma distancia de 36 a 46 aminoácidos de WD a WD (NEER *et al*., 1994).

$$\{ X_{6\text{-}94} \text{ (Distância variável)} \text{———} [\, GH \text{——} X_{23\text{-}41} \text{ (Distância constante)} \text{——} WD \,] \}^{N\,4\text{-}8}$$

O modelo sugere uma estrutura comum para o centro da unidade de repetição WD que inclui duas *turns* e três beta-*strands.*

Essas proteínas, contendo módulos WD possuem uma função primária, que é a formação de um arcabouço rígido para a interação entre proteínas, sendo que a especificidade funcional das proteínas da família WD é determinada pelo restante da seqüência. As funções são amplas, além da participação em transdução de sinal. Entre estas funções estão: participação em processamento de RNA, como por exemplo, na formação de partículas snRNP (ANGENSTEIN *et al*., 2002); regulação da formação de vesículas (Golgi); remodelagem de cromatina; remodelagem do citoesqueleto; divisão celular e morte celular (RODRIGUEZ *et al*., 1999).

Estudos anteriores feitos com a planta modelo Arabidopsis puderam identificar 269 proteínas contendo pelo menos uma cópia do motivo WD. Onde 237 continham quatro ou mais copias reconhecíveis do motivo. Foram então classificadas essas 237 proteínas em 143 famílias distintas, onde 49 continham mais de um membro Arabidopsis. Aproximadamente 94 destas famílias, portanto, com somente uma proteína (VAN NOCKER *et al*., 2003).

Tal divisão foi feita através da análise de proteínas que continham pelo menos quatro motivos WD, que foram distribuídas em famílias utilizando o Blastclust (disponível a partir do National Center for Biotechnology Information), ferramenta de clusterização de ligação única, que utiliza o algoritmo BLAST para determinar distância. Tal classificação feita foi utilizada como referência para o presente estudo.

O DNA dos seres vivos, principalmente de eucariótos está repleto de regiões que se diferem entre si apenas por um único nucleotídeo, esse polimorfismo é chamado de SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*). É importante salientar, que estes representam a forma mais comum de polimorfismo encontrada em genes e apresentam enorme potencial de utilização para análise genômica (SOBRINO *et al.*, 2005). O termo SNP se refere, mais restritamente, à alternância que ocorre entre os quatro nucleotídeos em um dado sítio de uma seqüência, em uma dada população. Em outras palavras, são diferenças nas seqüências de diferentes alelos de um dado lóco que ocorrem em um único par de bases. Nessa definição não estão incluídas as inserções e as deleções. Considera-se geralmente, como

necessário, que o alelo mais raro desse lóco polimórfico possua uma freqüência alélica superior ou igual a 1% (RAFALSKI, 2002). Definições mais abrangentes de SNPs incluem polimorfismos decorrentes de inserções e/ou deleções em seqüências genômicas e variantes com freqüência alélica menor que 1% (BROOKES, 1999).

Na verdade, os SNPs podem ser polimorfismos bi, tri ou tetra-alélicos, sendo os bi-alélicos os mais comuns (BROOKES, 1999). Podem ocorrer tanto dentro de éxons, quanto em íntrons. O polimorfismo de nucleotídeos únicos que ocorrem dentro de regiões exônicas pode causar modificações na seqüência de aminoácidos, que podem ser do tipo conservativa, quando o aminoácido substituído possui as mesmas características físico-químicas do aminoácido original, ou pode resultar em uma substituição não conservativa, quando os aminoácidos envolvidos no polimorfismo possuem características físico-químicas diferentes. A substituição dos nucleotídeos pode ainda ocorrer de maneira a gerar o mesmo aminoácido, já que o código genético é degenerado, sendo estas substituições chamadas de silenciosas (LEHNINGER *et al.*, 2000).

Muitos SNPs estão diretamente relacionados a doenças humanas ou a genes de interesse econômico. Mas em muitos casos, em que a associação não é direta, eles funcionam como marcadores moleculares para localizar esses genes através de estudos de herança (STONEKING, 2001).

É justamente a existência desta associação que abre a possibilidade de que o polimorfismo genético responsável por um determinado fenótipo de interesse possa ser monitorado pela análise dos marcadores genéticos. Neste contexto, a descoberta de SNPs dentro ou mesmo próximos a genes de interesse representa um passo fundamental para os modernos estudos de mapeamento por associação.

Dentre as dezenas de milhares de seqüências de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) obtidas no âmbito do projeto *Genolyptus* (Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de *Eucalyptus*) figuram diversos fragmentos identificados como genes WD40. No caso de *Eucalyptus*, os estudos de mapeamento em última análise, poderão avaliar o efeito deste polimorfismo sobre a variabilidade fenotípica.

O presente trabalho se insere, portanto, em um contexto que busca o estabelecimento de marcadores moleculares que permitam a avaliação genotípica diretamente dos genes responsáveis pelo controle genético de características fenótipicas em *Eucalyptus*. Tal iniciativa se justifica na medida em que o polimorfismo presente nestes locos possa ser utilizado em programas de melhoramento genético visando à obtenção de genótipos superiores de elevado valor econômico.

OBJETIVOS

i. Identificação e classificação preliminar dos ESTs de genes WD40 obtidos no âmbito do Projeto Genolyptus, utilizando como referência a classificação dos genes WD40 já descritos para *Arabidopsis thaliana;*

ii. Detectar sítios polimórficos, presentes em seqüências de genes da família WD40 obtidas de diferentes genótipos de *Eucalyptus*;

iii. Desenvolver *primers* que amplifiquem especificamente estas regiões e que possam permitir o uso destes polimorfismos como marcadores moleculares em estudos de mapeamento genético e de desequilíbrio de ligação.

METODOLOGIA

A fim de se estabelecer um critério para a identificação e classificação dos genes WD40 em *Eucalyptus*, foi construída uma árvore filogenética de referência, baseado nos genes da família WD40 em *Arabidopsis thaliana*, já publicados por Nocker *et al*., 2003. As seqüências referentes a cada gene, identificadas pela literatura, foram obtidas do banco de dados *GenBank*, através do site do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Em *A. thaliana*, das 237 proteínas descritas da família WD40, 234 foram encontradas. As seqüências, obtidas no formato FASTA, foram alinhadas pelo programa ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997), que realiza alinhamentos múltiplos para obtenção de árvores filogenéticas. Para construção do alinhamento múltiplo foram utilizados os parâmetros *padrões* do programa. O dendrograma foi construído utilizando-se o algoritmo de Neighbor-Joining (SAITOU *et al*., 1987). Os resultados obtidos foram visualizados através do programa TreeView (PAGE, 1996).

A partir do dendrograma de referência, em concordância com os resultados relatados na literatura em relação à filogenia, dos genes WD40 em *Arabidopsis thaliana*, cada uma das 234 seqüências foi utilizada para identificar, no banco de dados ESTs do projeto Genolyptus, seqüências que apresentassem similaridade com esses genes. A identificação foi realizada através da análise pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

O algoritmo realizado pelo programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) é, sem dúvida, a ferramenta mais popular para a pesquisa de seqüências em um banco de dados, executando comparações de seqüências em pares, procurando regiões de similaridade local (PROSDOCIMI *et al.*, 2002).

A descoberta de seqüências similares a seqüências de DNA ou de proteínas conhecidas é a primeira pista para a identificação da função dessa seqüência. O programa fornece uma informação que é de suma importância para a interpretação dos dados: o valor-E. A grosso modo, este valor-E de um alinhamento entre pares de seqüências, que indica o número de alinhamentos que podem ser encontrados com uma pontuação maior ou igual à pontuação observada, em uma pesquisa feita no banco de dados com uma seqüência aleatória. Portanto, um valor-E alto (>1) indica que o alinhamento provavelmente ocorreu ao acaso e que a seqüência alvo foi alinhada com uma seqüência não relacionada do banco de dados.

Desta forma, um total de 828 *reads* que continham um valor-E menor que 10^{-10} (valor adotado) foram selecionadas utilizando-se como *query* as 234 seqüências de WD40 já publicadas. As seqüências repetidas foram desprezadas de forma que apenas uma cópia de cada clone foi mantida, resultando em 419 seqüências.

Um alinhamento foi realizado entre a seqüências de *A. thaliana* e os ESTs de *Eucalyptus* com o intuito de se verificar o grau de identidade existente entre tais seqüências. A partir deste alinhamento, um dendrograma foi novamente obtido utilizando-se o algoritmo de Neighbor-Joining (SAITOU *et al.,* 1987). A consistência dos nós do dendrograma que deram origem aos diferentes grupos de homologia foi avaliada pelo procedimento de *bootstrap*, utilizando 1000 reamostragens.

Com base no alinhamento realizado com as seqüências de cada um desses grupos, isoladamente, foi possível detectar genes, em *Eucalyptus,* que são homólogos às isoformas dos genes WD40 de *Arabidopsis thaliana.*

Os 419 eletroferogramas obtidos no banco de dados do projeto Genolyptus, foram submetidos à análise de *base-calling* pelo programa PHRED (EWING *et al.,* 1998). As seqüências obtidas e os valores de qualidade a elas associados foram analisados pela utilização do programa Staden Package (STADEN *et al.*, 2000) para detecção dos prováveis SNPs. O programa constrói os *clusters*, que são alinhamentos de seqüências com alta similaridade, com tal agrupamento foram obtidos os *contigs* (grupos de mais de uma seqüência) e os *singlets* (grupos com uma única seqüência). A montagem dos fragmentos gerou diversos *contigs* de tamanhos distintos.

A leitura dos eletroferogramas sob as condições citadas acima gerou um banco de dados, com arquivos ZTR, EXP (*experiment files*) e SCF (relativos aos eletroferogramas) para cada clone, para a interpretação dos resultados obtidos no *software gap4*, constituinte do *Staden Package*.

Analisando os grupos com o programa *gap4*, através da ferramenta *View > Find Internal Joins* presente no *software*, foi possível verificar e corrigir possíveis erros no alinhamento das seqüências, retirando ESTs mal relacionados a um *cluster* e adicionando em outro, ou mesmo fundindo dois *clusters* formados por seqüências muito similares (máximo de 10% de *Mismatch*). Em seguida, a ferramenta *View > SNP Candidates* foi utilizada para detectar os SNPs dentro de cada um dos *contigs.* Após a inspeção visual, as seqüências consenso de cada um dos *contigs,* que foram nomeados pelo próprio *Staden Package*, foram alinhadas com as seqüências de referencia das respectivas famílias de genes WD40, no *software ClustalX.* As seqüências consensos que não apresentaram similaridade com nenhum gene da família foram descartadas do banco de dados, assim como os ESTs que as compunham. Então, foi possível isolar os ESTs correspondentes a cada um dos genes e detectar polimorfismos entre essas seqüências. A inspeção visual desse SNP foi um grande suporte para validar a existência dos mesmos.

Com a localização do SNPs nos *reads* de *Eucalyptus*, foi utilizado a seqüência consenso de cada *contig* em formato fasta para desenhar os *primers* com o *software* Primer3Plus (UNTERGASSER *et al.*, 2007), para a

amplificação dos fragmentos que continham os SNPs, onde estes foram nomeados pela sua posição no *contig* a partir da base número 1 que forma essa região.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Durante as várias etapas descritas no processo de anotação e detecção dos *SNPs* em genes da superfamília WD40 de *Eucalyptus*, das 143 famílias distintas citadas na literatura que foi usada como referencia, apenas 47 apresentaram resultados relevantes (formação de *contigs* e presença de SNPs nos mesmos) para o trabalho. Seqüências de referencia não encontradas, resultados não significativos na etapa de BLAST no Genolyptus, números insuficientes de eletroferogramas para comparação, formação de *singlets* (grupos com uma única seqüência) e *Contigs* com análise de *bootstrap* fraca em relação a outro gene de referencia, foram os motivos que não permitiram a analise destas 96 famílias (Tabela 1.) no presente trabalho.

Tabela 1. Famílias retiradas durante o processo de detecção de SNPs.

Famílias retiradas	Motivo
139-140	Não foi encontrada a seqüência referência
77-78 79-80 93-94 123-124 137-138 145 a 147 152, 157, 159, 163, 172,179 188, 191, 193, 219, 220,225 231, 233, 234,236	Sem resultados significativos no BLAST do Genolyptus
45-49 50-53 85-86 91-91 95-96 101-102 107-108 117-118 143-144 148, 150, 153, 154, 155, 158,165 167, 170, 178, 183, 187,189 194, 195, 197, 198, 200,204 204, 206, 208, 209, 218,224 230,235	Números insuficientes de eletroferogramas para comparação
21-29 54-57	Formação de *singlets* (ESTs únicas)

62-64 65-67 71-73 97-98 113-114 115-116 121-122 123-124 141-142 149, 151, 160, 171, 173,177 186, 192, 201, 205, 210,211 212, 213, 214, 217, 222,228 229,238	
35-39 131-132 133-134 202	*Contigs* com análise de *bootstrap* fraca em relação a outro gene de referencia

As anotações dos contigs de Eucalyptus mostram vários *contigs* bem caracterizados pela análise de *bootstrap* do *ClustalX*, com genes WD40 de *Arabidopsis thaliana*, como mostrado na tabela 2.

Tabela 2. *Contigs* com SNPs relacionados por analise de *bootstrap* com genes WD40 de *A. thaliana.*

Grupo	Nome dos *contigs* com SNPs	Gene referencia de *A. thaliana*	nº de acesso (*GenBank*)	N° de *reads*
2-11	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#17)	At3g51930	NM_115052.	4
	EUGR-TS-001-054-G06-GO.R (#11)	*	*	9
12-20	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#7)	At2g37670	NM_129323.	3
30-34	EUGL-XY-001-112-B11-AF.R (#3)	At3g15880	BAF01694.	4
	EUUR-XY-000-023-F12-BA.R (#23)	At1g80490	NP_178164.	5
	EUGR-TS-002-051-G04-CN.R (#14)	At5g27030	AAO50698.	3
40-44	EUGL-XY-001-103-C03-AF.S (#2)	At4g29730	AAQ89632.	4
	EUGR-ML-000-059-C04-BA.R (#5)	At5g58230	AAM47965.	4
58-61	EUSP-FX-002-023-C06-CN.R (#6)	At3g62770	NP_001030918.4	5
68-70	EUGR-XY-006-044-F03-RS.T (#9)	At1g52730	NM_179469.	15
74-76	EUPE-XY-000-049-A08-MG.R (#38)	At1g18080	AY063016.	35
	EUPE-XY-000-062-H12-MG.R (#40)	*	*	7
81-82	EUUR-XY-000-015-G02-BA.R (#6)	At3g13290	NP_187937	4
83-84	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#3)	At1g62020	NM_104882.	4
	EUPE-XY-003-021-E06-CN.R (#10)	*	*	8
	EUUR-XY-000-015-G02-BA.R (#13)	At2g21390	NM_127711.	4
87-88	EUGL-XY-001-090-F03-AF.R (#2)	At1g18830	NM_101740.	5
89-90	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#17)	At5g23430	NM_122250.	3
99-100	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#12)	At5g08560	NM_001085077.	3

103-104	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#19)	At2g41500	AAW80862.	7
	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#12)	At2g05720	NM_126590.	3
105-106	EUGR-PU-003-077-D04-GO.F (#4)	At1g04510	NM_001035881.	7
109-110	EUGR-SE-001-096-F10-GO.R (#5)	At1g17720	AAN72194.	10
111-112	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#15)	At4g15900(PRL1)	NM_117682.	3
119-120	EUGR-XY-006-084-D01-RS.R (#2)	At2g31300	NP_180688.	3
125-126	EUSP-FX-001-047-E06-CN.R (#46)	At3g49660	NM_114826.	4
	EUPE-XY-000-049-A08-MG.R (#38)	*	*	21
	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#32)	*	*	4
	EUGR-XY-006-048-B08-RS.R (#33)	*	*	5
127-128	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#3)	At5g14530	NM_121457.	3
129-130	EUGL-XY-001-123-D11-AF.R (#1)	At2g46290	NM_130192.	3
	EUGR-XY-022-010-E03-BA.R (#10)	*	*	6
135-136	EUGR-TS-002-020-G10-CN.R (#9)	At2g30050	NM_128560.	4
156	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#4)	At3g44530	NP_190039	4
162	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#7)	At3g21540	NM_113049.	4
164	EUGL-XY-001-112-F12-AF.R (#6)	At4g32551(LUG)	NM_119407	8
166	EUPE-XY-003-018-D01-CN.R (#7)	At1g15440	NM_202107.	3
168	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#8)	At5g08390	NM_120923.	3
169	EUGL-XY-001-112-F12-AF.R (#5)	At2g32700	NM_001036389.	8
175	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#11)	At3g18860	NM_180281.	7
176	EUUR-XY-000-008-H06-BA.R (#7)	At3g05090	NM_180185.	3
	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#5)	*	*	3
180	EUGL-XY-002-007-C11-CN.R (#2)	At5g25150	AAR28022.	5
	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#11)	*	*	4
181	EUGR-ML-000-026-E11-BA.R (#3)	At3g50590	NM_114919	14
182	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#13)	At5g13480(FY)	NM_121351	6
184	EUPE-XY-000-035-C02-MG.R (#2)	At3g44600	AAL32731.	3
	EUSP-FX-001-023-B08-BA.S (#4)	*	*	4
185	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#6)	At1g10580	NM_100933	3
190	EUGL-XY-001-112-B11-AF.R (#2)	At2g25420	NM_128099.	3
196	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#11)	At1g73720	NM_106031.	5
	EUPE-XY-003-018-D01-CN.R (#10)	*	*	3
199	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#12)	At5g50230	NM_124402.	3
203	EUGR-ML-000-059-C04-BA.R (#3)	At2g19540	NM_127512.	3
207	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#13)	At3g49180	NM_114777	7
215	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#11)	At1g71840	NM_105842.	4
216	EUSP-FX-002-032-E09-CN.R (#9)	At4g34460(AGB1)	NM_119611.	3
221	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#17)	At2g43770	NM_129939.	6
	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#14)	*	*	3
223	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#9)	At5g64730	NM_125869.	4
226	EUGR-PU-003-030-D04-MG.R (#2)	At4g29830(VIP3)	NM_119129.	4
	EUGR-SE-001-025-A04-GO.R (#3)	*	*	3
227	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#6)	At1g29260(PEX7)	NM_102666	3
232	EUSP-FX-002-018-D09-CN.R (#9)	At1g61210	NM_104802.	3
237	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#11)	At5g16750	AY117219.	6

*Referente ao quadrante acima.

Com a utilização dos valores *padrões* do programa *Staden Package*, e posterior inspeção visual, foram encontrados um total de 275 SNPs referentes

a todos os *contigs,* cujas posições estão detalhadas na tabela abaixo (Tabela 3.).

Tabela 3. Quantidade de SNPs por *contig* e suas posições.

Famílias	Quantidade de SNPs por *contig*	*Contigs*	Posição dos SNPs nos *contigs*
2-11	1	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#17)	195
	3	EUGR-TS-001-054-G06-GO.R (#11)	634,647,664
12-20	4	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#7)	234,315,396,462
30-34	1	EUGL-XY-001-112-B11-AF.R (#3)	415
	2	EUUR-XY-000-023-F12-BA.R (#23)	531,567
	3	EUGR-TS-002-051-G04-CN.R (#14)	352,376,636
40-44	9	EUGL-XY-001-103-C03-AF.S (#2)	173,221,239,251,296,301,318
		*	395,407,425
	3	EUGR-ML-000-059-C04-BA.R (#5)	301,314,422
58-61	1	EUSP-FX-002-023-C06-CN.R (#6)	947
68-70	9	EUGR-XY-006-044-F03-RS.T (#9)	555,654,657,929,997
		*	1145,1135,1166
74-76	11	EUPE-XY-000-049-A08-MG.R (#38)	221,229,259,464,503,510
		*	771,795,798,801,861
	4	EUPE-XY-000-062-H12-MG.R (#40)	862,866,868,953
81-82	3	EUUR-XY-000-015-G02-BA.R (#6)	336,390,694
83-84	1	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#3)	195
	3	EUUR-XY-000-015-G02-BA.R (#13)	390,435,694
	32	EUPE-XY-003-021-E06-CN.R (#10)	382,392,406,454,464,472
		*	491,495,499,522,527,535
		*	550,553,606,618,637,665
		*	676,679,745,749,766,769
		*	802,811,862,865,869,879
		*	886,922
87-88	2	EUGL-XY-001-090-F03-AF.R (#2)	588,631
89-90	4	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#17)	234,315,396,462
99-100	6	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#12)	183,288,375,405,411,684
103-104	5	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#19)	183,240,405,411,684
	4	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#12)	234,315,396,462
105-106	1	EUGR-PU-003-077-D04-GO.F (#4)	906
109-110	3	EUGR-SE-001-096-F10-GO.R (#5)	781,1054,1153
111-112	6	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#15)	234,315,384,396,414,462
119-120	1	EUGR-XY-006-084-D01-RS.R (#2)	447
125-126	11	EUSP-FX-001-047-E06-CN.R (#46)	276,289,473,475,500,503
		*	523,728,734,749,766
	6	EUPE-XY-000-049-A08-MG.R (#38)	165,167,168,224,458,727
	1	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#32)	195
	8	EUGR-XY-006-048-B08-RS.R (#33)	537,618,687,717,765
		*	768,774,804
127-128	5	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#3)	234,315,396,462,501
129-130	1	EUGL-XY-001-123-D11-AF.R (#1)	480
	1	EUGR-XY-022-010-E03-BA.R (#10)	520
135-136	1	EUGR-TS-002-020-G10-CN.R (#9)	122
156	1	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#4)	195
162	1	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#7)	195
164	9	EUGL-XY-001-112-F12-AF.R (#6)	170,184,192,195,290
		*	428,442,447,761
166	4	EUPE-XY-003-018-D01-CN.R (#7)	403,469,550,631
168	4	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#8)	234,315,396,462
169	11	EUGL-XY-001-112-F12-AF.R (#5)	170,185,191,195,290,416
		*	419,428,442,447,761

175	1	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#11)	183
176	1	EUUR-XY-000-008-H06-BA.R (#7)	446
	4	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#5)	234,315,369,462
180			207,294,324,330
	8	EUGL-XY-002-007-C11-CN.R (#2) *	603,670,671,672
	2	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#11)	195,512
181	3	EUGR-ML-000-026-E11-BA.R (#3)	447,471,486
182	1	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#13)	183
184	8	EUPE-XY-000-035-C02-MG.R (#2) *	430,433,545,561 286,325,347,367
	9	EUSP-FX-001-023-B08-BA.S (#4) *	45,48,176,230,241,297 300,345,367
185	4	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#6)	234,396,462,501
190	5	EUGL-XY-001-112-B11-AF.R (#2)	119,121,122,124,415
196	6	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#11)	183,288,375,405,411,684
	4	EUPE-XY-003-018-D01-CN.R (#10)	403,469,550,631
199	2	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#12)	183,24
203	2	EUGR-ML-000-059-C04-BA.R (#3)	301,314
207	4	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#13)	183,240,288,375
215	1	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#11)	195
216	1	EUSP-FX-002-032-E09-CN.R (#9)	524
221	1	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#17)	183
	6	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#14)	214,315,384,396,414,462
223	2	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#9)	195,512
226	1	EUGR-PU-003-030-D04-MG.R (#2)	283
	2	EUGR-SE-001-025-A04-GO.R (#3)	289,326
227	6	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#6)	234,315,384,396,414,462
232	4	EUSP-FX-002-018-D09-CN.R (#9)	403,517,646,679
237	1	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#11)	183

* Referente ao quadrante acima

As seqüências consenso referentes a cada um dos *contigs* obtidos para os genes WD40 de *Eucalyptus* foram utilizadas para o desenho dos *primers* no programa Primer3Plus (Rozen *et al*., 2000) no intuito de amplificar as regiões que contem os SNPs em cada *contig.* Foram obtidos um total de 69 pares de *primers,* para 63 *contigs* diferentes, nas 47 famílias de WD40 em *Eucalyptus*. Para alguns *contigs,* devido aos tamanhos variados e as posições dos SNPs, foram desenhados mais de um par de *primers*, para que estes conseguissem amplificar todas as regiões dos 275 SNPs encontrados, como mostrado na tabela 4.

Tabela 4. Lista dos *primers* desenhados

Família	*Contig*	Forward primer	Reverse primer
2-11	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#17)	ctccctcgacaaaaccctaa	agaagacgaagtcggtgtgg
	EUGR-TS-001-054-G06-GO.R (#11)	ctcctgggacaagaacctca	gctgacctgtgcttctcca
12-20	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#7)	gtctccggctccttcgac	ggatatgttccatagcctcaga
30-34	EUGL-XY-001-112-B11-AF.R (#3)	ttggcatttcatccacaaga	catccatcaatgctccacag
	EUUR-XY-000-023-F12-BA.R (#23)	gtcgcattaatccgtctgct	tgcatgatcagagcctgaag

	EUGR-TS-002-051-G04-CN.R (#14)	ggcgttctaccactcagcat	gatggatccaaaatggaacg
40-44	EUGL-XY-001-103-C03-AF.S (#2)	cgcgtcccctaactactacc	gcaagagagagaaggccaga
	EUGR-ML-000-059-C04-BA.R (#5)	ctcgatgccatgcaaatctt	tcgcaacaacccattcatta
58-61	EUSP-FX-002-023-C06-CN.R (#6)	acagcctggccttttcttct	cttcatgcagtcggaactga
68-70	EUGR-XY-006-044-F03-RS.T (#9)	gctgctgcctggacactaat	agcatctggtcggttcaagt
	*	tggagacaaaatcccctgtc	ttgcatcaccctcgacatta
74-76	EUPE-XY-000-049-A08-MG.R (#38)	acctgaaggggacgatgaa	ctcccagagtgttccacagc
	*	caactgcaagctgaggaac	gcgcagagccagtacctatt
	EUPE-XY-000-062-H12-MG.R (#40)	tggaagcaccttgttcagtg	acattgaggaccagcgtaca
81-82	EUUR-XY-000-015-G02-BA.R (#6)	aagggatgccatcagttcag	cattgcgatcattggatcag
83-84	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#3)	ctccctcgacaaaaccctaa	agaagacgaagtcggtgtgg
	EUUR-XY-000-015-G02-BA.R (#13)	gcgcaagctcctagctattg	cattgcgatcattggatcag
	EUPE-XY-003-021-E06-CN.R (#10)	agccgggaaatttactgagg	ggcatttgaagattgcagtg
	*	tgcaatcttcaaatgcctca	ggggagcacagtaatcctga
87-88	EUGL-XY-001-090-F03-AF.R (#2)	agcggatgatcaagacaag	aagagagccatgctttccaa
89-90	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#17)	gtctccggctccttcgac	ggatatgttccatagcctcaga
99-100	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#12)	acagccacggtgttcacata	acctgaaggggacgatgaag
103-104	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#19)	acagccacggtgttcacata	acctgaaggggacgatgaag
	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#12)	gtctccggctccttcgac	ggatatgttccatagcctcaga
105-106	EUGR-PU-003-077-D04-GO.F (#4)	ttcggcgtatgacaaagaca	gaaggcaatccaaagattcg
109-110	EUGR-SE-001-096-F10-GO.R (#5)	gaggacttgaccgaggtgat	attggatttttgctggcttc
111-112	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#15)	gtctccggctccttcgac	ggatatgttccatagcctcaga
119-120	EUGR-XY-006-084-D01-RS.R (#2)	gaagacaagtgggagcaa	cactgttttagccccactcc
125-126	EUSP-FX-001-047-E06-CN.R (#46)	ctgtcggtctcaacatcgaa	cacatgagcgattggtgcta
	EUPE-XY-000-049-A08-MG.R (#38)	tctctcctcctcctcctcct	gaccttgtcctccttggtga
	*	atcatcctctggcacctcac	acagccacggtgttcacata
	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#32)	ctccctcgacaaaaccctaa	agaagacgaagtcggtgtgg
	EUGR-XY-006-048-B08-RS.R (#33)	cactccaacctcctcgtctc	caccgagaaggaagcagaaa
127-128	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#3)	cactccaacctcctcgtctc	caccgagaaggaagcagaaa
129-130	EUGL-XY-001-123-D11-AF.R (#1)	caagtggaggtgaggatgg	actcgccccaacatacagac
	EUGR-XY-022-010-E03-BA.R (#10)	gtgatcaccaccgatccttt	acagcatcctctccagcact
135-136	EUGR-TS-002-020-G10-CN.R (#9)	tatttgcagcaaccaccaga	atatgaaagccgtggagctg
156	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#4)	ctccctcgacaaaaccctaa	agaagacgaagtcggtgtgg
162	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#7)	ctccctcgacaaaaccctaa	agaagacgaagtcggtgtgg
164	EUGL-XY-001-112-F12-AF.R (#6)	gacagagagggccagagg	tggaagtgagttcgtggaca
166	EUPE-XY-003-018-D01-CN.R (#7)	ggatatgttccatagcctcag	gtctccggctccttcgac
168	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#8)	gtctccggctccttcgac	ggatatgttccatagcctcaga
169	EUGL-XY-001-112-F12-AF.R (#5)	gacagagagggccagagg	tggaagtgagttcgtggaca
175	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#11)	acagccacggtgttcacata	caatgattgggtgagctgtg
176	EUUR-XY-000-008-H06-BA.R (#7)	acacaatccagacaccacc	tgccaggagtcttagccatt
	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#5)	gtctccggctccttcgac	ggatatgttccatagcctcaga
180	EUGL-XY-002-007-C11-CN.R (#2)	tgaagggtgttgggactga	ccgttctctctcctcctcct
	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#11)	cctgcgtcaagttctccaac	gtgtcgtcgatcagcgtct
181	EUGR-ML-000-026-E11-BA.R (#3)	gaatgggggtgacagctag	ggttgttgagaggcttgagg
182	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#13)	acagccacggtgttcacata	caatgattgggtgagctgtg
184	EUPE-XY-000-035-C02-MG.R (#2)	acgtcaagttccaccgaatc	tcctccctcgaaatcaatctt
	EUSP-FX-001-023-B08-BA.S (#4)	ccacgcgtcggttttctc	ggtgtgcttcttgacgaagtt
185	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#6)	cactccaacctcctcgtctc	caccgagaaggaagcagaaa
190	EUGL-XY-001-112-B11-AF.R (#2)	ctgcccatgtcataccacag	gctcctgaagagaccagtgc
196	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#11)	acagccacggtgttcacata	acctgaaggggacgatgaag
	EUPE-XY-003-018-D01-CN.R (#10)	ggatatgttccatagcctcag	gtctccggctccttcgac
199	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#12)	acagccacggtgttcacata	caatgattgggtgagctgtg
203	EUGR-ML-000-059-C04-BA.R (#3)	gggacatcaatgcaactcct	cagattggacaggcttggtt
207	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#13)	acagccacggtgttcacata	caatgattgggtgagctgtg
215	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#11)	ctccctcgacaaaaccctaa	agaagacgaagtcggtgtgg
216	EUSP-FX-002-032-E09-CN.R (#9)	aatttcaatcagggcacacc	accgtcatcagacccagttc

221	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#17)	acagccacggtgttcacata	caatgattgggtgagctgtg
	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#14)	ccacaccaactacgccttct	tcgtagctgctggagacgat
223	EUGR-XY-006-005-G04-RS.R (#9)	cctgcgtcaagttctccaac	gtgtcgtcgatcagcgtct
226	EUGR-PU-003-030-D04-MG.R (#2)	ttgcgacaggttcaagtgac	ttaacgatcagtggctccaa
	EUGR-SE-001-025-A04-GO.R (#3)	acgagaccgtgaagctgtg	actgcatctgccagacttcc
227	EUGR-XY-006-075-H09-RS.R (#6)	gtctccggctccttcgac	ggatatgttccatagcctcaga
232	EUSP-FX-002-018-D09-CN.R (#9)	gtacctccaacgaccacga	cacaggaagcaagcaagaaa
237	EUSP-FX-002-046-E11-CN.R (#11)	acagccacggtgttcacata	caatgattgggtgagctgtg

* Referente ao quadrante acima

A inspeção visual dos SNPs constitui um passo importante para a confirmação de sua existência. O programa *Staden Package* também foi utilizado com esse intuito, sendo que sua ferramenta de inspeção analisa a qualidade do eletroferograma de cada seqüência, verificando possíveis erros no seqüenciamento que poderiam apontar falsos SNPs.

A localização do SNP no gene e em nível de base deve ser feita, para se estar relacionando genótipos com suas características fenótipicas, pois a localização pode sugerir alterações significativas nas seqüências de aminoácidos de determinadas proteínas, interferindo diretamente em sua função no organismo.

Os SNPs aqui detectados, também podem ser utilizados para se avaliar a extensão do desequilíbrio de ligação presente no contexto deste gene, buscando-se avaliar o potencial de utilização das estratégias conhecidas como mapeamento por associação, onde os *primers* desenhados ajudarão na construção desses mapas.

Por fim, considera-se que os métodos aqui utilizados representam uma iniciativa no sentido de se utilizar as ferramentas de análise genômica para a caracterização de genes, putativamente cruciais para o melhoramento genético do *Eucalyptus.*

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por este trabalho devem ser considerados como uma contribuição preliminar para a realização de estudos posteriores de caracterização da estrutura e dos níveis de polimorfismo presentes em genes de WD40 de espécies do gênero *Eucalyptus.* Através de todo o trabalho descrito, destaca-se a importância dos resultados aqui obtidos em termos de detecção dos sítios polimórficos onde foi possível se detectar 275 SNPs em ESTs de WD40 de diferentes genótipos de *Eucalyptus,* e desenvolver *primers* que permitem a utilização deste polimorfismo como marcador molecular. Tais

marcadores poderão ser utilizados em estudos posteriores, como a construção de mapas genéticos e estudos de desequilíbrio de ligação, muito importantes também no melhoramento da produtividade de espécies de interesse.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGENSTEIN, F., EVANS, A. M., SETTLAGE, R. E., MORAN, S. T(2002). A receptor for activated C kinase is part of messenger ribonucleoprotein complexes associated with polyA-mRNAs in neurons. **J Neurosci** 22, 8827-8837.

ALTSCHUL S. F.; GISH, W.; MILLER, W. MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 215, p. 403- 410, out. 1990.

BROOKES, A. J. The Essence of SNPs. **Gene**, Amsterdam, n. 234, p. 177-186, jul. 1999.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C. & GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p.175-185. 1998.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C. & GELBART, W. M. Introdução à genética. 6º ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2002. 794p.

HENDRICKSON TW, PERRONE CA, GRIFFIN P. ET AL. IC138 is a WD-repeat dynein intermediate chain required for light chain assembly and regulation of flagellar bending. ***Mol Biol Cell***. 2004; 15(12): 5431–42.

LEHNINGER, A.L. et al. **Princípios de bioquímicas**. São Paulo: SARVER. 2000.

NEER EJ, SCHMIDT CJ, NAMBUDRIPAD R, SMITH TF: The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. ***Nature*** 1994, 371:297-300.

PAGE, R. D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, Oxford, v. 12, n.4, p. 357-358, ago. 1996.

PROSDOCIMI F, FARIA-CAMPOS AC, PEIXOTO FC, PENA SD, ORTEGA JM, FRANCO GR: Clustering of Schistosoma mansoni mRNA sequences and analysis of the most transcribed genes: implications in metabolism and biology of different developmental stages. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2002.

RAFALSKI A, 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Curr Opin Plant Biol** 5:94–100.

RODRIGUEZ A, OLIVER H, ZOU H, CHEN P, WANG X AND ABRAMS JM. (1999). Dark is a Drosophila homologue of Apaf-1/CED-4 and functions in an evolutionarily conserved death pathway. ***Nat. Cell Biol.***, 1, 272–279.

SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructin phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, p. 405-425, jul. 1987.

SMITH TF, GAITATZES C, SAXENA K, NEER EJ: The WD repeat: a common architecture for diverse functions. ***Trends Biochem Sci*** 1999, **24:**181-185.

SOBRINO, B.; BRIÓN, M.; CARRACEDO, A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing technologies. **Forensic Science International,** Clifton, n.154, p.181-194, jan. 2005.

STADEN, R.; BEAL, K. F. & BONFIELD, J. K. The staden package. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 132, p. 115-130, fev. 1998. STEVE ROZEN AND HELEN J. SKALETSKY (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: **Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386.

STONEKING, M. Single Nucleotide Polymorphisms- From de evolutionary past....**Nature.** v. 409, p. 821-822. 2001.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. & HIGGING, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleid Acid Researchs**, Oxford, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, dez. 1997.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.;. LEUNISSEN, J.: Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research** 2007 35: W71-W74.

VAN DER VOORN L, PLOEGH HL: The WD-40 repeat. ***FEBS Lett*** 1992, **307:**131-134.

VAN NOCKER S, LUDWIG P. : The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis:conservation and divergence in structure and function. **BMC Genomics**. 2003;

AVALIAÇÃO DO GLUTARALDEÍDO EM USO PARA O REPROCESSAMENTO DE ENDOSCÓPIOS NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA

Francine Vieira Pires[1]
Anaclara Ferreira Veiga Tipple[2]

Faculdade de Enfermagem – UFG

Descritores: Glutaraldeído, Endoscopia, Controle de qualidade; Infecção hospitalar

[1] Doutora em Enfermagem, professora associada da Faculdade de Enfermagem da Universidade Federal de Goiás - FEN/ UFG. Coordenadora do Núcleo de Estudos e Pesquisa em Infecção Hospitalar – NEPIH. E-mail: anaclara@fen.ufg.br
[2] Graduanda em Enfermagem pela FEN/UFG, membro do NEPIH. Bolsista do CNPq-PIBIC 2008/2009. E-mail: francinepvieira@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Durante a realização da endoscopia pode ocorrer a transmissão de microrganismos por via exógena quando os endoscópios não são devidamente reprocessados, podendo ocorrer a contaminação cruzada (COSTA, FERRARI JUNIOR, 1997; COSTA, 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENFERMEIROS DE CENTRO CIRÚRGICO, RECUPERAÇÃO ANESTÉSICA E CENTRO DE MATERIAL E ESTERILIZAÇÃO - SOBECC, 2009).

Para o controle de qualidade de um protocolo de reprocessamento de endoscópios uma das etapas fundamentais é o controle de qualidade do produto desinfetante, uma vez que podem ocorrer alterações de pH e concentração durante o uso que interferem na sua vida útil, e mesmo a utilização de produto fora das normas sanitárias. Na atualidade, os endoscópios são imprescindíveis em procedimentos diagnósticos e terapêuticos e o seu uso não pode representar risco de iatrogenia infecciosa (COSTA, FERRARI JUNIOR, 1997; COSTA, 2000; ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE ESTUDOS E CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR – APECIH, 2003; POSSARI, 2003; BRASIL, 2007; SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENFERMAGEM EM ENDOSCOPIA GASTROINTESTINAL - SOBEEG, 2006).

O glutaraldeído foi proibido no Brasil (BRASIL, 2009) para a esterilização, entretanto continua indicado para a desinfecção de alto nível para artigos que entram em contato com orifícios naturais – endoscópios (ESGNA,

1999; APECIH, 2004; SOBEEG, 2006; WGO-OMGE/OMED, 2006; BRASIL, 2007; SÃO PAULO, 2007).

A atividade do glutaraldeído é influenciada por: tempo de contato, recomenda-se 30 minutos para desinfecção de alto nível; concentração a 2% ou no mínimo 1,5%; pH, o produto que torna-se esporicida com valores entre 7,5 a 8,5; validade após ativação, mantendo sua atividade biocida por 14 a 28 dias; temperatura e presença de matéria orgânica (COSTA, 2000; POSSARI, 2003; WGO-OMGE/OMED, 2006; BRASIL, 2007; SÃO PAULO, 2007).

O controle de qualidade da solução de glutaraldeído deve ser realizado por meio de indicadores químicos próprios que são as fitas testes que medem a concentração de glutaraldeído ativo em solução e outra, para a aferição de pH, com o objetivo de avaliar o produto mediante as condições de reuso (SCARPITTA, 1997; COSTA, 2000; APECIH, 2003; POSSARI, 2003; SOBEEG, 2006; BRASIL, 2007).

Ressalta-se a importância dos profissionais de enfermagem, que são os responsáveis pelo reprocessamento dos endoscópios, na prevenção da transmissão de microrganismos infecciosos intervindo na cadeia de transmissão, já que os esforços para este fim estão diretamente ligados à implementação e observância dos protocolos para o reprocessamento, eliminando os possíveis riscos de transmissão e garantindo a qualidade de todo o processo (BRASIL, 2002; WGO-OMGE/OMED, 2006; BRASIL, 2007).

Neste contexto destaca-se a importância da qualidade do produto utilizado para o reprocessamento destes artigos.

OBJETIVOS

Geral: Avaliar as condições do glutaraldeído em uso para o reprocessamento de endoscópios nos Serviços de Endoscopia Digestiva Alta no município de Goiânia/GO.

Específicos:

- ✓ Identificar a utilização de rótulo no recipiente onde o glutaraldeído foi ativado e disponibilizado para o reprocessamento;
- ✓ Caracterizar os dados existentes no rótulo do produto;

- ✓ Identificar a realização e registro dos testes de concentração e pH nos serviços de endoscopia;
- ✓ Aferir a concentração e o pH do glutaraldeído em uso nos serviço de endoscopia;
- ✓ Caracterizar o recipiente utilizado para o reprocessamento, o modo de descontaminação deste recipiente, a freqüência de troca do germicida e a forma de descarte.

METODOLOGIA

Estudo transversal descritivo e quantitativo realizado em hospitais e clinicas que realizavam Endoscopia Digestiva Alta (EDA) em Goiânia. A relação dos Hospitais e Clínicas que realizavam EDA em Goiânia foi cedida pela Divisão de Controle de Infecção nos Estabelecimentos de Saúde de Goiânia - DPCISS, sendo identificados no primeiro semestre de 2007, 62 serviços de EDA.

Os dados foram obtidos no período de maio a julho de 2007 por meio de observação utilizando-se um roteiro sobre as condições do glutaraldeído em uso para o reprocessamento de endoscópios nos serviços de EDA no município de Goiânia/GO e pela aplicação de um questionário ao profissional que realizava o reprocessamento. A coleta de dados foi realizada após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos profissionais responsáveis pelos serviços e pelo reprocessamento conforme a Resolução n° 196/96.

Este estudo está integrado ao projeto “As Interfaces do Controle de Infecção durante o Reprocessamento Químico de Endoscópios pelo uso de Glutaraldeído nos Serviços de Gastroenterologia de Goiânia” que foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa Humana do Hospital Materno Infantil sob protocolo nº 001/07, registrado na SAPP/PRPPG/UFG n° 32560.

Para a análise foi utilizado o programa Software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 13.0. Os dados foram apresentados em gráficos e tabelas e foi utilizada a estatística descritiva.

RESULTADOS

Todos os 62 serviços de EDA foram contactados, 20 aceitaram participar do estudo. Destes, quatro (20,0%) serviços eram instituições públicas e 16 (80,0%) privadas.

Os parâmetros de qualidade do glutaraldeído realizados pelos próprios serviços de endoscopia estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição da realização de testes de concentração e pH do glutaraldeído pelos serviços de endoscopia do município de Goiânia – GO, Goiânia, 2007.

Variáveis	N	%
Concentração		
Sim	03	15,0
Não	17	85,0
pH		
Sim	00	0,0
Não	20	100,0

Os parâmetros de concentração e pH do glutaraldeído disponível para uso nos serviços de EDA aferidos pelos pesquisadores, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros pH e concentração do glutaraldeído em uso em serviços de endoscopia do município de Goiânia – GO. Goiânia, 2007.

Variáveis	N	%
Concentração		
Igual a 2%	10	50,0
Menor que 2%	10	50,0
Total	20	100,0
pH		
Recomendado	10	50,0
Não recomendado	10	50,0
Total	20	100,0

Metade dos serviços apresentou pH e concentração dentro dos parâmetros recomendados, entretanto estes parâmetros só foram coincidentes em três (15,0%) serviços.

Dentre os parâmetros de avaliação da qualidade do glutaraldeído, existem dois rótulos que são de responsabilidades dos serviços, do recipiente

do produto após a sua ativação e do recipiente onde este é disponibilizado para o reprocessamento. Estes dados foram agrupados na Tabela 3.

Tabela 3 – Dados de Identificação de rótulos do glutaraldeído de responsabilidades dos serviços de endoscopia para o reprocessamento de endoscópios do município de Goiânia. Goiânia, 2007.

Variáveis	N	%
Rótulo no recipiente onde o glutaraldeído foi ativado		
Sim	07	35,0
Não	13	65,0
Total	20	100,0
Informações disponíveis		
Quantidade, data de diluição, data de validade	01	5,0
Data de diluição, data de validade e hora	01	5,0
Data de diluição	02	10,0
Data de validade	03	15,0
Rótulo no recipiente do reprocessamento		
Sim	13	65,0
Não	07	35,0
Total	20	100,0
Informações disponíveis		
Data de diluição e lote	01	5,0
Data de diluição e data de validade	02	10,0
Data de validade	02	10,0
Data de diluição, data de validade e responsável	03	15,0
Data de diluição	05	25,0

As informações contidas no rótulo da embalagem do produto disponível no mercado também são importantes. As informações questionadas quanto ao rótulo do produto foram: validade, validade após ativação, indicação de uso, modo de usar, modo de ativar o produto e o número do registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, em todos constavam estas informações com exceção do registro da ANVISA, que em cinco (25,0%) observou-se inconformidades, sendo que em três (15,0%) serviços o rótulo havia sido removido, impedindo a sua conferência.

A Tabela 4 agrupa informações quanto à conservação e manuseio do glutaraldeído nos serviços de endoscopia.

Tabela 4 – Distribuição dos serviços de endoscopia quanto às características de conservação e manuseio do glutaraldeído utilizados para o reprocessamento de endoscópios no município de Goiânia – GO, Goiânia, 2007.

Variáveis	N	%
Tipo de recipiente		
Plástico	19	95,0
Vidro	00	0,0
Inox	01	5,0
Possui contêiner interno vazado		
Sim	00	0,0
Não	20	100,0
Possui tampa		
Sim	11	55,0
Não	09	45,0
Rotina de descontaminação		
Sim	15	75,0
Não	05	25,0
Tipo de descontaminação		
Limpeza com água e sabão	10	50,0
Limpeza e desinfecção com álcool a 70%	04	20,0
Limpeza e desinfecção com hipoclorito de sódio	01	5,0
Freqüência da descontaminação		
Na troca do produto	15	75,0

A Tabela 5 apresenta os indicadores para a troca do glutaraldeído em uso nos serviços de EDA de Goiânia.

Tabela 5 – Distribuição dos indicadores para a troca do glutaraldeído em uso em serviços de endoscopia (n=20) do município de Goiânia – GO, Goiânia, 2007.

Indicadores da troca do Glutaraldeído	N	%
Teste de concentração	01	5,0
Pacientes de risco	02	10,0
15 em 15 dias	03	15,0
Validade definida pelo fabricante após a ativação	07	35,0
Aspecto da solução	07	35,0

Os modos de descarte do glutaraldeído após o uso variaram entre: 12 (60,0%) direto na pia sem diluição prévia, cinco (25,0%) direto na pia diluído e em três (15,0%) o glutaralteído é acondicionado em bombonas e posteriormente encaminhado para incineração.

DISCUSSÃO

Os endoscópios são considerados artigos semicríticos, ou seja, artigos que entram em contato com mucosa íntegra de sítios colonizados do organismo ou pele não-íntegra (APECIH, 2004; SOBEEG, 2006; WGO-OMGE/OMED, 2006; SOBECC, 2007). Requerem desinfecção de alto nível para que a qualidade de seu múltiplo uso seja garantida, este tipo de desinfecção elimina a maioria dos microrganismos, excetuando os esporos bacterianos (BRASIL, 2001; POSSARI, 2003; APECIH, 2004; SOBEEG, 2006; WGO-OMGE/OMED, 2006; SOBECC, 2009).

Embora seja unânime entre vários autores a importância e a necessidade do controle da qualidade do produto disponível para uso, evidenciou que apenas três (15,0%) serviços de endoscopia realizavam o teste de concentração e nenhum fazia uso da fita medidora de pH.

De acordo com a Tabela 2, a concentração e o pH do glutaraldeído aferida pelo pesquisador, em ambos, metade dos serviços estavam fora dos parâmetros recomendados. Dado que isoladamente está aquém do desejado, mas que é agravado pelo fato de que em apenas três (15,0%) serviços, isto ocorreu simultaneamente para pH e concentração, lembrando que mudança em qualquer um destes parâmetros indica a necessidade de troca do produto (Brasil, 2007).

O grau da atividade biocida do glutaraldeído depende da concentração do produto, com atividade entre 1,5% e 2,0% e do pH da solução, sendo ligeiramente ácido em seu estado natural (APECIH, 2003; SOBEEG, 2006; BRASIL, 2007; SÃO PAULO, 2007).

Para comercialização, o produto é acompanhado pelo agente alcalinizante ou pó ativador que após a mistura e completa homogeneização obtém-se a solução ativa – alcalino. Após ser ativado possui um prazo de validade que pode ser de 14 ou 28 dias conforme o fabricante (LONGHI, RICHTMANN, 1997; SCARPITTA, 1997; POSSARI, 2003; APECIH, 2004; BRASIL, 2007).

Diante dessas considerações, é necessário fazer uso de indicadores para a troca do glutaraldeído em uso nos serviços, sendo recomendado (APECIH, 2003; SOBEEG, 2006; BRASIL, 2007; SÃO PAULO, 2007) o uso de fitas testes para aferição de pH e concentração, principalmente este último.

Mbithi *et al.* (1993) em estudo “in vitro”, coletaram amostras de solução alcalina de glutaraldeído a 2% durante o período de 14 dias. Analisaram a relação do numero de instrumentos desinfetados por método não automatizado e a diluição do desinfetante durante a utilização. No dia 14°, após a desinfecção de 30/54 broncoscópios e 41/59 gastroscópios, o nível de glutaraldeído da solução utilizada foi de 1,15 +- 0,16% e 0,99 +- 0,11% respectivamente. Conclui-se que esta solução poderia tornar-se ineficaz contra alguns vírus e micobactérias em período menor que 14 dias, com 10 a 20 minutos de exposição em temperatura ambiente.

Neste estudo, observou-se que a maioria dos serviços não utiliza a totalidade dos indicadores recomendados para a troca do produto, quais sejam: teste de concentração, pH, prazo de validade após a ativação e acompanhamento das características do produto em uso (APECIH, 2003; SOBEEG, 2006; BRASIL, 2007; SÃO PAULO, 2007). Vale ainda destacar dois parâmetros equivocados adotados pelos serviços para a troca do produto: adoção de um prazo fixo (7/35,0%) e o conhecimento do diagnóstico prévio do paciente para doenças infecto contagiosas. Na primeira opção foram desconsideradas as mudanças no produto que podem ocorrer durante o uso e mesmo os custos adicionais decorrentes por exemplo no caso do período de validade ser de 28 dias. Na segunda opção não foram consideradas as recomendações da aplicação das Precauções Padrão (SIEGUEL, 2007) que devem ser adotadas para todos os pacientes independente do conhecimento de sua sorologia. Para a realização de EDA não é rotina a realização de exames sorológicos, de onde se compreende que na maioria estes são desconhecidos e que os cuidados devem ser os mesmos.

Quanto aos rótulos recomendados para o uso do glutaraldeído são necessários três tipos: um é responsabilidade do fabricante e dois são de responsabilidade dos consumidores, neste caso dos trabalhadores que reprocessam artigos neste produto.

Quanto à rotulagem da embalagem do glutaraldeído, exige-se que existam algumas informações pertinentes ao uso do produto, tais como: nome do produto, classificação do saneante, frases relacionadas com a classe de risco, restrições de uso, modo de usar, modo e quantidade de diluição para o uso, tempo de contato, limitações de uso, cuidados para a conservação,

princípios ativos, frases de advertência e primeiros socorros, lote, data de fabricação, prazo de validade, número do registro com a sigla do órgão competente e nome do responsável técnico com o número de inscrição no Conselho Regional de Farmácia ou de Química, dados do fabricante e a frase "antes de usar leia as instruções do rótulo" (BRASIL, 1988; BRASIL, 2007).

Dentre as informações que foram investigadas, todos os rótulos do frasco de glutaraldeído continham os dados exigidos, com exceção do registro da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA que apresentava inconformidades em cinco (25,0%) frascos. Questiona-se o fato verificado em três (15,0%) serviços onde os rótulos não foram encontrados. Esta prática contraria as recomendações, uma vez que no caso de uma inspeção sanitária tornaria impossível o conhecimento de dados de qualidade importantes para o uso do produto.

Em relação aos rótulos de responsabilidade dos serviços, prevaleceu a identificação no recipiente onde o glutaraldeído era disponibilizado para uso, 13 (65,0%) serviços, enquanto apenas sete (35,0%) faziam o uso do rótulo onde o produto foi ativado. Este fato poderia ser justificado por que a maioria dos serviços ativava o desinfetante e o utilizava na sua totalidade, entretanto a ANVISA (BRASIL, 2007) recomenda que o produto ativado também deva ser rotulado, vale lembrar que no caso de sobras de qualquer quantidade estas só poderão ser utilizadas dentro do prazo de segurança da ativação. As informações contidas nos rótulos na maioria eram insuficientes e os mais completos incluíam a data de validade e diluição, e nome do responsável pela ativação (WGO-OMGE/OMED, 2006; BRASIL, 2007). Durante a ativação, dados importantes como: data de ativação, lote do produto, nome do fabricante, data provável de validade (14 ou 28 dias) e o responsável pela ativação da solução; não constaram na sua totalidade nos rótulos (BRASIL, 2007). Durante o manuseio, dados importantes como: data do recebimento da solução, número do lote/registro e do início do uso; tipo de instrumental sob processamento e o ciclo na solução; horário do início e final do contato do glutaraldeído com o instrumental, o responsável pela operação, em cada um dos ciclos; resultados das análises de monitoramento da qualidade da solução em uso, com a respectiva data, horário de realização, tipo de teste e responsável; não constaram na sua totalidade nos rótulos (BRASIL, 2007).

Quanto à conservação e manuseio do glutaraldeído, a solução deve ser usada em recipiente de vidro ou de plástico, mantida tampada para que se mantenha estável, devidamente identificado. Quando utilizar caixa metálica, proteger o fundo desta com compressa, evitando o contato com os artigos a serem reprocessados, pois a reação de íons dos metais, inativa o glutaraldeído. O recipiente deve conter tampa e permanecer fechado durante o período em que não é utilizado (SCARPITTA, 1997; WGO-OMGE/OMED, 2006; BRASIL, 2007; SÃO PAULO, 2007).

A maioria dos serviços faz uso do recipiente de plástico (19/95,0%), como recomendado (APECIH, 2004; WGO-OMGE/OMED, 2006; BRASIL, 2007), apenas um (5,0%) serviço faz uso do recipiente de inox e sem o uso da compressa. Nenhum serviço utilizava o contêiner interno vazado. Em 11 (55,0%) serviços o recipiente possuía tampa e permanecia fechada, enquanto nove (45,0%) serviços não faziam uso da tampa, além do produto ficar menos estável, sendo tóxico, os profissionais que estão realizando o reprocessamento ficam mais expostos, pois a quantidade do produto no ar aumenta (APECIH, 2004; SOBEEG, 2006; WGO-OMGE/OMED, 2006; BRASIL, 2007; SÃO PAULO, 2007).

É recomendado haver rotina de descontaminação nos vasilhames utilizados para os processos de desinfecção e esterilização de artigos (BRASIL, 1994; APECIH, 2004). Neste estudo, a maioria (15/75,0%) possuía uma rotina, embora com diferentes tipos de descontaminação, sendo que a limpeza era o procedimento mínimo. No nosso ponto de vista, para está finalidade a limpeza do vasilhame é fundamental nas trocas do produto, uma vez que é considerada a primeira etapa dos processos de desinfecção e esterilização (APECIH, 2004) e neste caso, pode haver a formação de biofilme nos vasilhames durante os reprocessamentos, lembrando que o glutaraldeido pode fixar proteínas (APECIH, 2003; APECIH, 2004; SÃO PAULO, 2007).

Para o descarte do Glutaraldeído a Resolução de Diretoria Colegiada nº 306 (BRASIL, 2004) prevê que o produto deve ser acondicionado em bombonas e encaminhado para incineração, o que foi observado em apenas três (15,0%) serviços. O glutaraldeído é contaminante ambiental, sendo contra-indicado o seu descarte diretamente na rede de esgoto.

CONCLUSÕES

Este estudo sobre a avaliação das condições sanitárias do glutaraldeído em uso em 20 serviços de EDA de Goiânia, nos permite concluir que:

- A maioria dos serviços não realizava o controle de qualidade do glutaraldeído considerando a concentração e o pH, que são parâmetros mínimos de segurança e que em metade dos serviços estes parâmetros estavam fora das recomendações quando aferidos pelo pesquisador. Vale ressaltar que em apenas três (15,0%) serviços esses parâmetros foram adequados simultaneamente.

- Todos os rótulos do frasco de glutaraldeído continham os dados exigidos, com exceção do registro da ANVISA que apresentava inconformidades em cinco (25,0%) frascos. Entretanto, quanto aos rótulos de responsabilidade dos serviços, foram encontrados predominantemente no recipiente do produto em uso (13/65,0%) em comparação com o frasco onde foi ativado (7/35,0%).

- Em 19 (95,0%) serviços o glutaraldeído era acondicionado em recipiente plástico, em 11 (55,0%) os recipientes possuíam tampa e a mesma permanecia fechada, em 15 (75,0%) serviços havia rotina de descontaminação do recipiente.

- O conjunto dos parâmetros de qualidade recomendados para a troca do produto não era adotado pela maioria dos serviços.

- Em 12 (60,0%) serviços o glutaraldeído era desprezado diretamente na pia sem diluição, cinco (25,0%) direto na pia diluído e em apenas três (15,0%) era acondicionado em bombonas e encaminhado para incineração.

Vale ressaltar que não foi possível abranger, em nosso estudo, todos os serviços do Município de Goiânia que realizam EDA, pois apenas 20 serviços aceitaram participar do estudo, os outros 42 serviços recusaram. Isso foi um fator limitante para o conhecimento da realidade da prática do reprocessamento de endoscópios. .

Entretanto, os dados apresentados neste estudo mostram que os parâmetros de qualidade do reprocessamento químico utilizando o glutaraldeído para a desinfecção de alto nível em endoscópios, nos serviços investigados pode representar risco aos usuários, não sendo possível extrapolar para outros serviços os resultados encontrados.

Espera-se que os resultados deste estudo sirvam de subsídios para as ações educativas e de vigilância para uma prática segura no reprocessamento, sendo que os maiores beneficiários dessa qualidade serão os clientes, usuários desses serviços.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE ESTUDOS E CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR- APECIH. **Esterilização de artigos em unidades de saúde.** 2. ed. São Paulo: APECIH, 2003. p.6,116-25.

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE ESTUDOS E CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR- APECIH. **Limpeza, Desinfecção de Artigos e Áreas Hospitalares e Anti-sepsia.** 2. ed. São Paulo: APECIH, 2004. p.3-17.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe Técnico Nº 04/07, de 2007.** Glutaraldeído em estabelecimentos de assistência a saúde fundamentos para a utilização. Brasília, DF, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Portaria n° 15**, de 23 de agosto de 1988. Dispõe sobre o regulamento para o registro de produtos saneantes domissanitários e afins, com ação antimicrobiana. D.O.U., de 05 de setembro de 1988. Brasília, DF, 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Portaria nº 593**, de 25 de agosto de 2000. Aprova o Regulamento Técnico para Serviço de Endoscopia Digestiva e Respiratória. D.O.U., de 22 de dezembro de 2000. Brasília, DF, 2002. (legislação 2) BRASIL, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução – RDC nº 08**, de 27 de fevereiro de 2009. Dispõe sobre as medidas para redução da ocorrência de infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido – MCR em serviços de saúde. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução – RDC nº 156**, de 11 de agosto de 2006. Dispõe sobre o registro, rotulagem e reprocessamento de produtos médicos, e dá outras providências. Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução nº 196/96** – Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília, DF, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC n° 306**, de 7 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. D.O.U., de 10 de dezembro de 2004. Brasília, DF, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Orientações Gerais para Central de Esterilização**, Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde.** 2° Ed. Brasília, DF, 1994.

COSTA M.L.M. Endoscopia. In: FERNANDES A.T.; FERNANDES M.O.V.; RIBEIRO N.F. **Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. cap 58, p 1061-1069.

COSTA M.L.M.; FERRARI Jr A.P. O Serviço de Endoscopia. In: RODRIGUES E.A.C.; MENDONÇA, I.S.; AMARANTE, J.M.B.; ALVES FILHO, M.B.; GRINBAUM, R.S.; RICHTMANN, R. **Infecções Hospitalares: Prevenção e Controle.** 1 ed. São Paulo: Sarvier, 1997. Cap 2, p. 463- 469.

ESGNA. Guidelines. **Cleanning and disinfection in GI Endoscopy**. UPDATE. 1999.

LONGHI, L.F.; RICHTMANN, R. Esterilização: processos químicos. In: RODRIGUES, E.A.C.; MENDONÇA, I.S.; AMARANTE, J.M.B.; ALVES FILHO, M.B.; GRINBAUM, R.S.; RICHTMANN, R. **Infecções Hospitalares: Prevenção e Controle.** São Paulo: Sarvier; 1997. cap 1, p. 399-400.

MBITHI, J.N.; SPRINGTHORPE, V.S.; PACQUETTE, M. Bactericidal, virucidal, and mycobactericidal activities of Rreused alkaline glutaraldehyde in endoscopy. **Unit J. Clin. Microbiol**, v.31, 1993. p.2988-95.

POSSARI, João Francisco. **Centro de Material e Esterilização: Planejamento e Gestão.** 1.ed., São Paulo: Iátria,2003. P53-72.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Sanitária (CVS). **Resolução 27 de 28 de fevereiro de 2007**. Norma Técnica para o uso do Glutaraldeído em Estabelecimentos Assistenciais de Saúde. Diário Oficial do Estado, São Paulo, 2007. Disponível em: http://www.cih.com.br/Consulta_P%C3%BAblica_-_Glutaralde%C3%ADdo_-_DOE._13-07-06.htm. Acesso em julho de 2008.

SCARPITTA, C.R.M. Limpeza e Desinfecção de Artigos Hospitalares. In: RODRIGUES, E.A.C.; MENDONÇA, I.S.; AMARANTE, J.M.B.; ALVES FILHO, M.B.; GRINBAUM, R.S.; RICHTMANN, R. **Infecções Hospitalares: Prevenção e Controle.** São Paulo: Sarvier; 1997. cap 2, p. 411-420.

SIEGEL, JD; RHINEHART, E; JACKSON, M; CHIARELLO, L. **Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings**, June 2007. Disponivel em: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf. Acessado em: 01/04/2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENFERMEIROS DE CENTRO CIRÚRGICO, RECUPERAÇÃO ANESTÉSICA E CENTRO DE MATERIAL E ESTERILIZAÇÃO - SOBECC, **Práticas Recomendadas da SOBECC: Centro**

Cirúrgico, Recuperação Anestésica e Centro de Material e Esterilização, 5. ed., São Paulo, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENFERMAGEM EM ENDOSCOPIA GASTROINTESTINAL (SOBEEG). **Manual de Reprocessamento de Limpeza e Desinfecção de Aparelhos e Acessórios Endoscópicos**, 2006.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION (WGO-OMGE) AND ORGANIZATION MONDALE D'ENDOSCOPIE DIGESTIVE (OMED) Practice Guideline. Endoscope Disinfection. Word Gastroenterol. **News**, vol. 11, n.1, p. 1-12, 2006. guideline, 2005 - WGO-OMGE/OMED, 2006.

Perfil microbiológico de alimentos comercializados em feiras especiais de Goiânia, Goiás

Raphaela Moiana da Costa [1], Maria Raquel Hidalgo Campos [1]
[1] *Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Goiás*

E-mail: raphamcosta@gmail.com

Palavras-chave: feiras, microbiologia de alimentos, controle de qualidade

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o hábito alimentar vem sofrendo grandes alterações nos centros urbanos, principalmente devido às mudanças no modo de vida da população (famílias menos numerosas, mulheres que trabalham fora de casa e período cada vez mais curto para realização de refeições). Sendo assim, a preferência recai sobre refeições mais rápidas, seja na aquisição e preparo, seja no consumo, o que consequentemente leva a um aumento significativo no número de serviços de alimentação como lanchonetes, restaurantes comerciais e institucionais, refeitórios industriais e feiras (GERMANO; GERMANO, 2000; RIBEIRO; REIS; ROSSI, 2000).

Os alimentos de rua, parte integrante dos serviços de alimentação, constituem uma categoria de alimentos extremamente heterogênea, abrangendo tanto refeições como lanches e bebidas. A definição mais utilizada para tal categoria é a da *Food and Agricultural Organization* (FAO), segundo a qual alimentos de rua são “alimentos e bebidas prontos, preparados e/ou vendidos por vendedores e ambulantes, especialmente em ruas e outros lugares públicos similares para consumo imediato ou posterior, mas sem etapas de preparo ou processamento adicionais. Frutas frescas e vegetais vendidos fora de áreas comerciais autorizadas também fazem parte desta definição” (GERMANO et al., 2000a; FOOD AND AGRICULTURE..., 1989).

A comercialização de alimentos nas ruas torna-se cada vez mais uma atividade econômica relevante, de sustento e de sobrevivência, principalmente nos

países em desenvolvimento. Tal realidade advém do aumento dos índices de desemprego e da degradação das condições de vida nas áreas rurais, com consequente aumento do processo de urbanização e marginalização de grupos sociais (ARAMBULO et al., 1994; GERMANO et al., 2000b).

O crescimento do comércio ambulante de alimentos, principalmente em feiras especiais, é caracterizado por deficiências físico-estruturais, falta de conhecimento sobre manipulação segura por parte dos comerciantes, falta de equipamentos, disponibilidade de água inadequada, dentre outros fatores. Este tipo de comércio vem se expandindo em grandes proporções nos países em desenvolvimento, onde o trabalho informal torna-se uma alternativa de renda para os comerciantes e de baixo custo para os consumidores (RODRIGUES et al, 2003; CURI et al; 2008).

Os alimentos e bebidas vendidos nas ruas representam um problema de saúde pública, pois podem conter microorganismos potencialmente patogênicos, colocando em risco a saúde de quem os consome (DALLARI et al., 2000). A contaminação destes ocorre devido a falhas no processamento, tais como: incorreta higienização de mãos, equipamentos e utensílios; conservação imprópria destes, contaminação cruzada e manejo incorreto da água (SILVA Jr, 2005). O número reduzido de estudos sobre o quadro microbiológico desses alimentos associado à necessidade de assumir decisões políticas e de propor um planejamento público capaz de assegurar a saúde dos consumidores, evidencia a importância de investigar não só a qualidade dos produtos, como também as condições de manipulação.

Diante do exposto, a equipe do Centro Colaborador em Alimentação e Nutrição da Região Centro-Oeste (CECAN-RCO) elaborou e executou o projeto "Perfil higiênico-sanitário de alimentos comercializados em feiras especiais de Goiânia – diagnóstico e capacitação técnica", cujos temas de investigação incluíram o diagnóstico das instalações fisico-estruturais; monitoramento do binômio Tempo/Temperatura de exposição dos produtos nas feiras; análise microbiológica de amostras dos produtos; orientações sobre técnica de boas práticas de preparação de alimentos e reaproveitamento de sobras; elaboração de receituários e fichas técnicas das preparações de alimentos; capacitação em educação sanitária; produção de material educativo ilustrado com foco na legislação sanitária de alimentos e elaboração e certificação do Manual de Boas Práticas de Fabricação de Alimentos para Comércio em Feiras Especiais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Traçar o perfil microbiológico de alimentos prontos para o consumo, produzidos artesanalmente e comercializados em feiras especiais de Goiânia, Goiás.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar análises microbiológicas das amostras coletadas de produtos comercializados;
- Analisar os resultados encontrados com base nos padrões microbiológicos para alimentos exigidos pela Resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA/MS);
- Verificar a presença de microrganismos patogênicos em amostras dos alimentos.

3 METODOLOGIA

O perfil microbiológico foi avaliado em amostras de alimentos sólidos e bebidas, comercializados nas feiras incluídas no estudo. Este previu a inclusão de 22 feiras especiais de Goiânia que comercializavam produtos prontos para o consumo e desenvolveu-se no período de setembro a dezembro de 2008. Os produtos coletados foram selecionados considerando a maior freqüência de comercialização, compondo nove grupos de alimentos, sendo: 1) espetinho; 2) pizza; 3) crepe e panqueca; 4) empadão e torta; 5) salgado; 6) pastel; 7) lasanha; 8) sucos e 9) cremes.

Primeiramente o feirante era abordado pelo fiscal da Vigilância Sanitária/Secretaria Municipal de Saúde (VISA/SMS), o qual fazia a apresentação do projeto e o preenchimento do termo de coleta, sendo este um documento oficial da

VISA/SMS, emitido em três vias: uma para o feirante, uma para o laboratório responsável pela análise microbiológica das amostras coletadas e a terceira via para a VISA/SMS.

No segundo momento realizava-se a coleta da amostra segundo Midura & Bryant (2001): coletou-se uma unidade do produto ou quantidade referente à amostra de 100g, colhida assepticamente, em saco plástico esterilizado, identificado e lacrado, acondicionada em caixa isotérmica com placas de gelo reciclável, a fim de evitar a sua alteração devido à temperatura ambiente. Além desses procedimentos, ao final da coleta era entregue ao feirante um termo de esclarecimento, no qual havia informações sobre o projeto, bem como contatos para possíveis esclarecimentos.

Após a coleta, as amostras foram transportadas ao Laboratório de Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos da Faculdade de Nutrição/Universidade Federal de Goiás para a realização das análises microbiológicas em um prazo máximo de duas horas. Estas foram realizadas seguindo os padrões microbiológicos exigidos pela Resolução RDC n° 12 de 02/01/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e de acordo com a metodologia descrita pela *American Public Health Association* (2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas 226 amostras, dentre as quais havia 196 alimentos sólidos e 30 bebidas. Das 196 amostras de alimentos sólidos coletadas, 11,7% (n = 23) apresentou contagem microbiológica acima dos padrões permitidos pela legislação sanitária vigente em pelo menos um dos microrganismos pesquisados. Considerando a possibilidade de contaminação por mais de um microrganismo em uma mesma amostra, obteve-se um total de 31 contagens. Destas, 35,5% (n = 11) corresponde a Coliformes a 45ºC/g; 41,9% (n = 13), a *Estafilococos* coagulase positiva e 22,6% (n = 7), a *Bacillus cereus* (Quadro 1).

Quadro 1. Contaminação por Grupo de Alimento pesquisado

Grupo de Alimento	Microorganismo Pesquisado		
	Coliformes a 45ºC/g	**Estafilococos coagulase positiva**	***Bacillus cereus***
Espetinho	1	0	0
Pizza	0	3	0
Crepe e Panqueca	3	2	1
Empadão e Torta	4	1	2
Salgado	1	3	1
Pastel	0	2	1
Lasanha	2	2	2
Creme	5	1	0
Suco	2	0	0

Das 23 amostras de alimentos sólidos contaminadas por pelo menos um microrganismo pesquisado, 4,3% (n = 1) era de Espetinho, 13,0% (n = 3) de Pizza, 21,7% (n = 5) de Crepe e Panqueca, 26,1% (n = 6) de Empadão e Torta, 13,0% (n = 3) de Salgado, 13,0% (n = 3) de Pastel e 8,7% (n = 2) de Lasanha.

Comparando com a literatura, observa-se que tais resultados diferem dos encontrados por outros autores. Em pesquisa realizada por Borges (2008), com tortas de frango/empadão em uma feira de Goiânia, foi encontrado para coliformes termotolerantes (45ºC/g) 28,4% de amostras com contagem acima dos padrões sanitários vigentes. Rodrigues et al. (2003) avaliaram a qualidade higiênico-sanitária de lanches comercializados por ambulantes em Pelotas/RS, e constataram que, de 60 amostras coletadas, 25,0% apresentaram valores acima do limite da legislação brasileira para coliformes a 45ºC. Mensah et al. (2002), ao analisarem 511 amostras de comida de rua, como pratos frios, sopas e lanches na cidade de Accra, Gana, obtiveram 163 (31,9%) amostras contaminadas por *S. aureus*.

Em nenhuma amostra de alimento sólido analisada neste trabalho foi constatada a presença de *Salmonella* e contagem para *Clostridium* sulfito redutor. Resultados semelhantes foram detectados por Rodrigues et al. (2003) quando

pesquisaram as condições higiênico-sanitárias no comércio ambulante de alimentos em Pelotas-RS e por Furnaleto & Kataoka (2004) ao realizarem análises microbiológicas de lanches comercializados por carrinhos ambulantes no estado do Paraná.

Das 30 amostras de bebidas coletadas, oito (26,7%) (seis cremes e dois sucos), obtidas em cinco feiras, apresentaram contagem acima dos padrões permitidos pela legislação sanitária para pelo menos um dos microrganismos pesquisados. Destas, 23,3% (n = 7) apresentaram contagem para Coliformes a 45^{o}C/g e 3,3% (n = 1) para Estafilococos coagulase positiva (Quadro 1). Não foi evidenciada a presença de *Salmonella* sp em nenhuma das amostras de bebidas.

Resultados diferentes foram encontrados por Ruschel et al. (2001), que ao analisar 52 amostras de suco de laranja não pasteurizado comercializados em ruas de Porto Alegre, encontrou 5,8% de amostras contaminadas por coliformes fecais e uma com presença de *Salmonella cholerasuis*.

Segundo Picoli et al. (2006), as principais bactérias que comprometem a qualidade de alimentos a base de leite são Estafilococos coagulase positiva e Coliformes. Nesta perspectiva, os resultados deste estudo reforçam a indicação de que para o preparo de derivados de leite é necessário manter condições higiênico-sanitárias ideais, uma vez que este produto é tido como excelente substrato para a multiplicação de microorganismos (OLIVEIRA et al., 2001).

5 CONCLUSÃO

Considerando os resultados microbiológicos obtidos, tanto de alimentos sólidos como de bebidas, nas feiras especiais de Goiânia, é possível perceber que tais produtos podem apresentar riscos à saúde dos consumidores tendo em vista o grande fluxo de pessoas, clientes em potencial, que freqüentam e se alimentam nestes locais assiduamente.

Faz-se necessária a implantação de programa de capacitação em boas práticas para os comerciantes envolvidos, com vistas à melhoria da qualidade dos alimentos comercializados e consequente segurança alimentar a seus consumidores.

REFERÊNCIAS

ARAMBULO, P.; ALMEIDA, C. R.; CUELLAR, J.; BELOTTO, A. J. Street food vending in Latin America. **Bulletin of the Pan American Health Organization,** Washington, v. 28, p.344-354, 1994.

BORGES, L. J.; AMORIM, L. J. M.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; CAMPOS, M. R. H.; SERAFINI, A. B. Qualidade microbiológica de empadão goiano comercializado em uma feira de lazer de Goiânia-Go e teste de susceptibilidade antimicrobiana de cepas isoladas. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 2, p. 131-142, 2008.

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária**. Resolução - RDC n. 12 de 02 de Janeiro de 2001.** Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 10 set. 2008.

CURI, J. D. P.; GALLO, C. R.; DIAS, C. T. S. Condições microbiológicas de lanches (cachorro-quente) adquiridos de vendedores ambulantes, localizados na parte central da cidade de Limeira, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 22, n.164, p. 61-66, 2008.

DALLARI, S. G.; BRAVO, E. S.; RIBEIRO, I. A.; OLIVEIRA, J. C.; FERREIRA, J. A. Vigilância sanitária de alimentos de consumo imediato no município de São Paulo: a importância da informação para o planejamento. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, p.24-26, 2000.

DOWNES, F. P; ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4 ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001, 600p.

Food and Agriculture Organization (FAO). **Street foods: a summary of FAO studies and other activities relating to street foods**. Rome: FAO. 46p. 1989.

FURNALETO, L.; KATAOKA, A. F. Análise microbiológica de lanches comercializados em carrinhos de ambulantes. **Lecta**, São Francisco, v.22, p. 49-52. 2004.

GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L.; CASTRO, A. P.; ANDRIGHETTO, C.; BABADOPULUS, P.; KOSHIO, S.; PEDRO, S. C. M.; COLOMBARI, V. Comida de rua: prós e contras. **Revista Higiene Alimentar,** São Paulo, v.14, p.27-33, 2000b.

GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L.; KAMEI, C. A. K.; ABREU, E. S.; RIBEIRO, E. R.; SILVA, K. C.; LAMARGO, L. C. A.; ROCHA, M. F. G.; VIEIRA, V. K. I.; KAWASAK, I. V. M. Manipuladores de Alimentos: Capacitar? É preciso.

Regulamentar? Será preciso? **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, p. 18-22, 2000a.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos como fator de promoção da saúde. **O mundo da saúde**, São Paulo, v. 24, n.1, 2000.

MENSAH, P.; YEBOAH-MANU, D.; Owusu-Darko, K.; ABLORDEY, A. Street foods in Accra, Ghana: how safe are they? **Bulletin of the World Health Organization**, v.80, n.7, p. 546-554, 2002.

MIDURA, T. F.; BRYANT, B. G. Sampling Plans, Sample Collection, Shipment and Preparation for Analysis. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination for Foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001, cap.02, p. 13-23.

OLIVEIRA, C. A. F. de; GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S.; Qualidade do leite no processamento de derivados. In: GERMANO, P. M. L; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária dos alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. p. 91-102.

PICOLLI, S. U.; BESSA, M. C; CASTAGNA, S. M. F.; GOTTARDI, C. P. T.; SCHIMIDT, V.; CARDOSO, M. Quantificação de coliformes, Staphylococcus aureus e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo Frescal de leite de cabra em laticínios. **Revista Ciência Tecnologia Alimentar**, Campinas, v. 26, n. 165, p. 64-69, 2006.

RIBEIRO, A. C.; REIS, D. O.; ROSSI, D. A. Procedimento de higienização na redução do número de microrganismos das mãos de manipuladores, em uma indústria frigorífica. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, p. 52-57, 2000.

RODRIGUES, K. L.; GOMES, J. P.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J. B. Condições higiênico-sanitárias no comércio ambulante de alimentos em Pelotas - RS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.3, 2003.

RUSCHEL, C. K.; CARVALHO, H. H.; SOUZA, R. B.; TONDO, E. C. Qualidade microbiológica e físico-química de sucos de laranja comercializados nas vias públicas de Porto Alegre/RS. **Revista Ciência Tecnologia Alimentar**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 94-97, 2001.

SILVA Jr., E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 6ª ed. 2005. 623p.

Micropropagação de *Cyrtopodium eugenii* Rchb. f. & Warm (Orchidaceae)

Gabriel Feresin Pantalião[1], Sérgio Tadeu Sibov[1]

[1] Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, CEP 74001-970
E-mails: gabrielferesin@hotmail.com, stsibov@yahoo.com.br

Palavras-chave: Cerrado, orquídeas, cultivo *in vitro*.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de orquídeas encontradas no Cerrado, 42 delas estão compreendidas no gênero *Cyrtopodium*. Este gênero encontra-se amplamente distribuído em ambientes secos e rochosos e suas flores apresentam cores chamativas, dispostas em inflorescências racemosas (Pansarin et al., 2008). Espécies pertencentes a este gênero ocorrem desde o sul da Flórida até o norte da Argentina e, no Brasil, são encontradas principalmente no Cerrado (Menezes, 2000; Pansarin et al.,2008).

Cyrtopodium eugenii constitui uma espécie terrestre, comumente encontrada crescendo sobre solos arenosos, em ambientes secos e à meia-sombra. É uma espécie distribuída em todo o território brasileiro, sendo a floração na época da seca, com início no final de abril e término em agosto, meses coincidentes com o aumento da freqüência dos incêndios no Planalto Central, seu principal centro de diversidade (Menezes, 2000).

A degradação de áreas do Cerrado pela ação antrópica, associada a algumas características de determinadas espécies da família Orchidaceae, como o baixo sucesso reprodutivo, habitat restrito ou ainda o fato de algumas espécies serem alvo de extrativismo predatório, justificam a importância e a necessidade de estudos relacionados às características morfológicas, reprodutivas e fenológicas destas espécies (Pereira et al., 2005). Além disso, Gribel (2001) alerta que a riqueza natural do Cerrado, por si só é suficiente para demonstrar a importância destes

estudos para cultivo, conservação, manejo, melhoramento e reintrodução de diversas espécies em seu habitat nativo.

Uma técnica que já obteve grandes avanços e que tem sido utilizada com sucesso na produção de mudas em larga escala, é a do cultivo *in vitro* ou micropropagação. As orquídeas começaram a ser cultivadas *in vitro*, como plantas ornamentais, por volta do século XIX, mas como não se tinha conhecimento dos meios de cultura adequados à cada espécie o sucesso era variável (Grattapaglia & Machado, 1998). Com o passar dos anos, o conhecimento da necessidade de se manter presentes nos meios nutritivos macro e micronutrientes, além de reguladores de crescimento, em determinadas concentrações, permitiram o estabelecimento de um grande número de protocolos para o cultivo *in vitro* de diversas culturas, principalmente orquídeas (Torres et al., 1998).

Para Moreira et al. (2007), o cultivo *in vitro* de orquídeas surgiu como uma alternativa de propagação, uma vez que na natureza a germinação de sementes é quase nula e a propagação vegetativa é lenta. Como a exigência de mudas para suprir o mercado de plantas ornamentais é elevada, a utilização desta técnica, além de evitar a retirada das plantas de seu habitat natural, ainda permite a produção de grande quantidade de mudas, num menor intervalo de tempo e com melhor qualidade. Desta forma, diversas espécies de orquídeas pertencentes aos gêneros *Cattleya* Lindl. (Bach & Castro, 2004; Silva et al., 2007), *Dendrobium* Sw. (Faria et al., 2004; Buyun et al., 2004), *Cymbidium* Sw. (Chang & Chang, 1998), *Vanda* (Johnson & Kane, 2007), dentre outras, já apresentam protocolos de propagação bem estabelecidos, os quais representam uma grande conquista para o mercado de plantas ornamentais e para conservacionistas e melhoristas.

2 OBJETIVOS

Em função da preocupação com a preservação de *C. eugenii* em seu habitat natural, do potencial ornamental e comercial desta espécie e do sucesso da germinação *in vitro* de orquídeas, este trabalho tem como objetivo o estabelecimento de protocolos para micropropagação da espécie via germinação *in vitro.*

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta das cápsulas

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. Em abril de 2008, cápsulas de *C. eugenii* foram coletadas na Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo, localizada na Serra Dourada, município de Mossâmedes - GO (16°04'36.4"S e 50°11'16.9"W – 1.006 m de altitude). Os frutos encontravam-se em fase de maturação, apresentando coloração verde-amarelada, consistência macia e sem rachaduras ou qualquer sintoma da presença de contaminantes.

Após a coleta, as cápsulas foram conduzidas ao laboratório e, em câmara de fluxo laminar, foram tratadas por 5 minutos em álcool 70 %, por 10 minutos em hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5 % e lavadas por três vezes consecutivas em água destilada e autoclavada.

3.2 Germinação *in vitro*

Para a germinação *in vitro* de sementes de *C. eugenii,* os meios de cultura utilizados foram os mais difundidos para orquídeas (Grattapaglia & Machado, 1998; Stancato et al., 2001), ou seja, o meio MS completo (Murashige & Skoog, 1962), o MS com redução da metade da concentração dos macronutrientes (½ MS) e o meio KC (Knudson, 1946), nos quais, o pH foi ajustado para 5,7-5,8. A solidificação dos meios foi feita com 0, 7 % de ágar, tendo sido distribuídos 30 mL de meio de cultura por frasco de vidro com capacidade de 120 mL, os quais foram tampados com papel alumínio e autoclavados à temperatura de 120°C, por vinte minutos.

Em câmara de fluxo laminar, uma cápsula previamente desinfestada, foi cortada longitudinalmente com um bisturi. Com o auxílio de uma pinça, uma das metades da cápsula foi suspensa sobre os frascos contendo meios de cultura e com uma espátula as sementes foram semeadas uniformemente. Após a semeadura, os frascos permaneceram em câmara de crescimento, em condições de 16 horas de luz, intensidade luminosa de 35 μEinstein m^{-2} s^{-1} e temperatura de 25°C ± 2°C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e 12 repetições. O processo de germinação das sementes de orquídeas tem início com a ruptura do tegumento do embrião e a formação de estruturas

esféricas clorofiladas denominadas protocormos (Arditti, 1967). A avaliação do número de protocormos obtidos nos três tratamentos foi feita semanalmente, durante 13 semanas. Foram atribuindo-se estádios de 0 a 5, de acordo com o número de protocormos obtidos: 0 (nenhum protocormo); 1 (1 a 5 protocormos); 2 (6 a 10 protocormos); 3 (11 a 15 protocormos); 4 (16 a 20 protocormos); 5 (mais de 20 protocormos);.

Os dados referentes ao número de protocormos obtidos por frasco e por meio foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$, e submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

3.3 Repicagens

Para a repicagem dos protocormos dos frascos em que foram inoculadas as sementes de *C. eugenii*, o meio de cultura utilizado foi o meio MS com redução da metade da concentração dos macronutrientes (½ MS), com a adição de 2g/L de carvão ativado, para evitar a oxidação dos protocormos após a repicagem. Em câmara de fluxo laminar, os frascos utilizados na semeadura de *C. eugenii* foram abertos e os protocormos orgininados foram repassados para novos frascos com meios de cultura objetivando obter maior número de plântulas formadas para futuros testes de micropropagação.

Após a repicagem, foram obtidos 202 frascos que permaneceram em câmara de crescimento, em condições de 16 horas de luz, intensidade luminosa de 35 µEinstein m^{-2} s^{-1} e temperatura de 25°C ± 2°C. A avaliação realizada teve como parâmetros a medição do desenvolvimento do maior explante em cada frasco, assim como a observação de contaminação nos mesmos, durante 4 semanas. Após 2 meses dessa primeira avaliação, realizou-se uma avaliação quantitativa, observando-se o número de explantes mais vigorosos para utilização no experimentos de multiplicação.

3.4 Teste de multiplicação *in vitro*

Nessa etapa, objetivou-se avaliar as influências dos reguladores de crescimento e suas concentrações no desenvolvimento e multiplicação de novas

plântulas de *C. eugenii*. Preparou-se meio ½ MS para cada concentração de hormônio utilizada, sendo, portanto, 1 mg de ácido naftalenacético - ANA (A); 3 mg de 6-benzilaminopurina - BAP (3B); 1 mg de ANA + 3 mg de BAP (AB) e 5 mg de BAP (5B); e preparou-se também meio ½ MS sem reguladores de crescimento (0), como controle. A solidificação dos meios foi feita com 0, 7 % de ágar, tendo sido distribuídos 20 mL de meio de cultura por tubo de ensaio, os quais foram tampados com papel alumínio e autoclavados à temperatura de 120°C, por vinte minutos.

Na câmara de fluxo, com o auxílio de um bisturi, cortou-se as raízes e parte das folhas obtendo um explante de aproximadamente 1 cm contendo o meristema apical. Esses explantes foram colocados nos tubos de ensaio com e sem hormônios, e permaneceram em câmara de crescimento, em condições de 16 horas de luz, intensidades luminosas de 35 µEinstein m^{-2} s^{-1} e temperatura de 25°C ± 2°C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e 32 repetições. A avaliação realizada teve como parâmetros a contagem do número de brotos originados em cada tubo de ensaio, a medição do desenvolvimento desses brotos, e a contagem do número de folhas, durante 7 semanas.

3.5 Aclimatização

Para a aclimatização dos explantes desenvolvidos nos tubos de ensaio, utilizou-se 5 tipos de composição de substratos diferentes: Plantmax + Fibra de coco (PF); Plantmax + Vermiculita + Fibra de coco (PVF); Plantmax + Casca de pinus (PC); Plantmax + Vermiculita + Casca de Pinus (PVC); e Plantmax + Casca de pinus + Fibra de coco (PCF). Para cada tipo de susbtrato foram plantadas 30 plântulas com aproximadamente 7 cm de altura em vasos pequenos, com capacidade de 1L, em telados com 50% de sombreamento e regas diárias.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e 30 repetições. A avaliação terá como parâmetros a contagem do número folhas, números de raízes, peso fresco, comprimento da maior folha e comprimento da maior raiz, ao final de 6 meses.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Germinação *in vitro*

O processo de desinfestação das cápsulas utilizando os materiais e os tempos recomendados mostraram-se eficientes, dado que a taxa de contaminação foi nula. Além disso, o fato das cápsulas apresentarem-se completamente fechadas, em fase de maturação e sem sinais de contaminantes também contribuiu para a ausência de contaminação.

Sete dias após a semeadura, notou-se que as sementes de *C. eugenii* contidas nos três tratamentos apresentaram uma coloração escura, em tom castanho, como se passassem por um intenso processo de oxidação. Todavia, três dias após terem escurecido, as sementes de *C. eugenii* contidas em meio ½ MS apresentaram-se intumescidas, indicando o primeiro estádio de desenvolvimento do embrião. Nesta fase, os protocormos que surgiram apresentaram uma coloração esbranquiçada e, só após 60 dias de cultivo, mostraram-se clorofilados (Figura 1).

Araújo et al. (1999) trabalhando com germinação de *Cyrtopodium palmifrons* nos meios de cultura MS completo e KC, observaram elevadas taxas de oxidação nos meios cujas concentrações de auxinas eram baixas. Todavia, 45 dias após a semeadura o processo de germinação foi iniciado e mostrou-se satisfatório em ambos os meios de cultura. Logo, o fato das sementes apresentarem alteração da cor antes de iniciar o processo de germinação sugere uma fase comum às sementes das espécies pertencentes ao gênero *Cyrtopodium*.

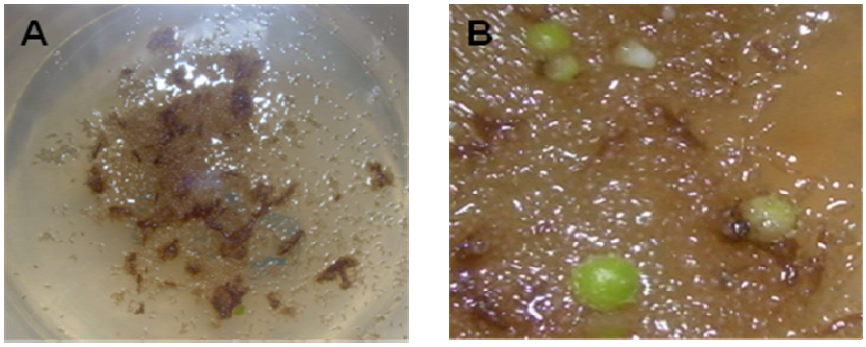


Figura 1. (A) Sementes de *Cyrtopodium eugenii* Rchb. f. & Warm. no meio KC, sete dias após a semeadura *in vitro*, apresentando coloração escura; (B) Protocormos iniciais de *C. eugenii* no meio ½ MS, 21 dias após a semeadura *in vitro*.

A Figura 2 ilustra o surgimento dos primeiros protocormos no meio ½ MS 14 dias após a semadura e, aos 49 dias, todos os tratamentos já apresentavam a formação de protocormos. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o meio ½ MS, têm apresentado bons resultados para diversas espécies, uma vez que meios contendo elevadas concentrações de nutrientes, como o MS completo, alteram o potencial osmótico do meio, diminuindo assim a absorção de água, sais e nutrientes pelas sementes, o que retarda o seu desenvolvimento.

Aos 85 dias de cultivo *in vitro* foram observados o surgimento dos primórdios foliares e a formação das primeiras raízes no meio ½ MS. A Figura 3 ilustra as sementes de *C. eugenii* inoculadas nos três meios de cultura aos 91 dias de cultivo *in vitro.* Observa-se que enquanto os protocormos presentes no meio ½ MS convertiam-se em plântulas, os protocormos presentes nos meios MS completo e KC ainda encontravam-se em desenvolvimento, indicando que o meio ½ MS proporcionou não apenas uma maior quantidade de protocormos germinados, mas também uma germinação e desenvolvimento precoces em relação aos demais meios.

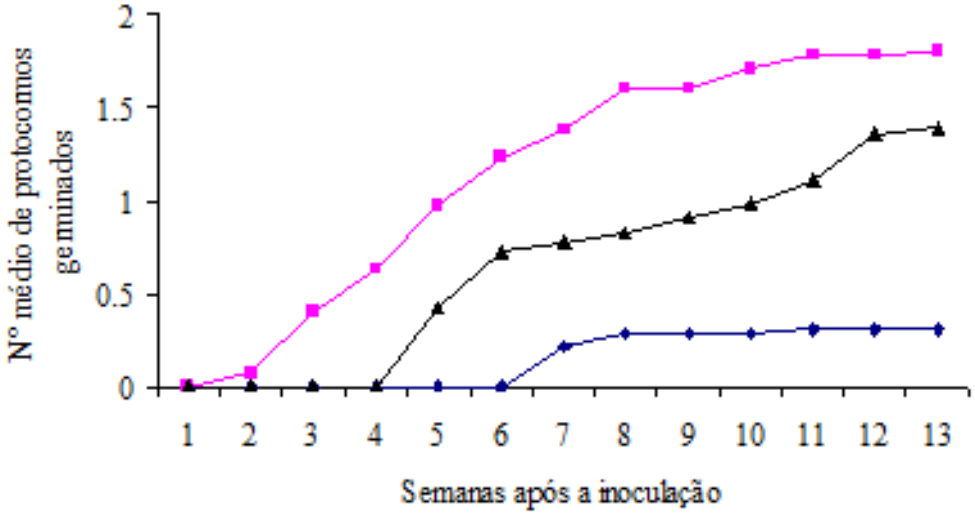


Figura 2. Número médio de protocormos de *Cyrtopodium eugenii* Rchb. f. & Warm. obtidos nos meios MS 1/2 MS KC, durante os 91 dias de cultivo *in vitro*.

Os resultados da análise de variância para o número de protocormos originados a partir de sementes de *C. eugenii,* semeadas nos três diferentes meios

de cultura, indicando que há diferença significativa entre os meios de cultura (p < 5%). As médias referentes ao número médio de protocormos originados a partir de sementes de *C. eugenii* nos três diferentes meios de cultura foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade (Tabela 1). Observa-se pelas médias que durante os 91 dias de cultivo, o meio ½ MS apresentou uma maior média para o número de protocormos, quando comparado aos meios MS completo e KC.

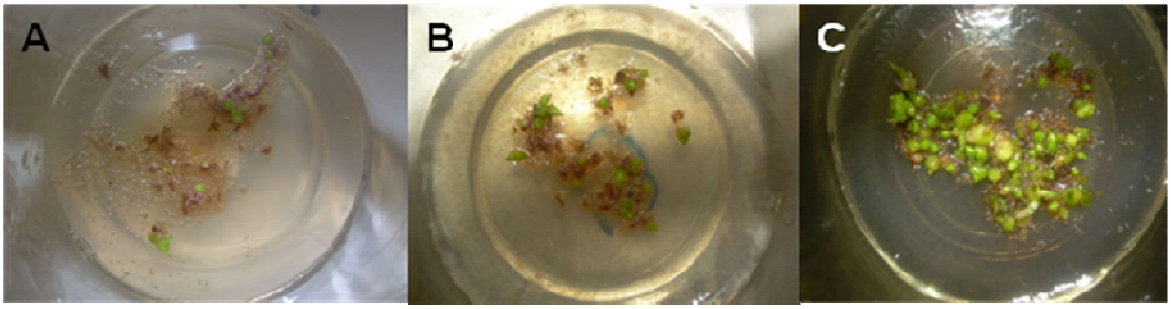


Figura 3. Protocormos de *Cyrtopodium eugenii* Rchb. f. & Warm., aos 85 dias de cultivo *in vitro* assimbiótico nos meios (A) MS completo, (B) KC e (C) ½ MS.

Mello (2000), testando a conservação de sementes de orquídeas do Cerrado, trabalhou com quatro espécies de *Cyrtopodium* e obteve altas taxas de germinação, acima de 60 %, para *C. eugenii*, *C. inaldianum* e *C. saintlegerianum* Hort., também em meio ½ MS. As sementes de *C. eugenii* cultivadas no meio KC apresentaram uma taxa de germinação inferior quando comparadas às sementes do meio ½ MS, porém melhor que a taxa de germinação no meio MS completo, no presente trabalho.

Tabela 1. Valores médios para o número de protocormos originados de sementes de *Cyrtopodium eugenii* Rchb. f. & Warm., em três diferentes meios de cultura, durante 91 dias de cultivo *in vitro.*

Meios de cultura	Média do número de protocormos
½ MS	1,46035 a[1]
KC	1,17372 b
MS	0,79692 c

[1] Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 %.

4.2 Ação dos reguladores de crescimento na multiplicação dos explantes

Os resultados da análise de variância para a produção de novas brotações a partir de explantes de *C. eugenii* submetidos a diferentes combinações de meio de cultura e reguladores de crescimento indicaram que os efeitos dos tratamentos não foram significativos. Para os três caracteres avaliados após sete semanas: tamanho do explante (F_{calc} = 0,1033), número de brotos novos ($F_{calc.}$ = 0,0690) e número de folhas novas (F_{calc} = 0,3222), não existem evidências estatísticas de que as médias sejam diferentes ($F_{4,30,5\%}$ = 2,69) e a variação obtida foi devida ao acaso.

A figura 4 mostra que a tendência de produção e desenvolvimento de novos brotos e folhas em função do tempo foi linear para todos os tratamentos. Os gráficos também indicam que *C. eugenii* não apresentou resposta significativa à aplicação de reguladores de crescimento.

Melhores respostas de espécies nativas co Cerrado aos meios com menor concentração dos macronutrientes tem sido relatadas por diversos autores (Grattapaglia & Machado, 1998; Caldas ET al., 1998). Da mesma forma, a adição de reguladores de crescimento a diversos meios nutritivos, realizada por Caramaschi (2001), não apresentou resultados satisfatórios para a germinação de sementes imaturas de *C. eugenii* e de *C. cristatum.* Araújo et al. (1999) também sugerem a utilização de meios de cultura sem adição de reguladores de crescimento para germinação e desenvolvimento de *C. palmifrons*, por proporcionar melhor rendimento de produção de mudas e menor custo. Ramos (2005), ressalta que, em alguns casos, espécies nativas apresentam boas respostas em meios com menores concentrações de reguladores de crescimento e, em outros, a resposta é praticamente nula. Stancato & Faria (1996) também verificaram melhor desenvolvimento de *Laelia cinnabarina* Batem. em meio ½ MS sem reguladores de crescimento, proporcionando plântulas mais vigorosas. De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se considerar que *C. eugenii* foi pouco eficiente na produção de novas brotações, provavelmente sendo uma característica da espécie.

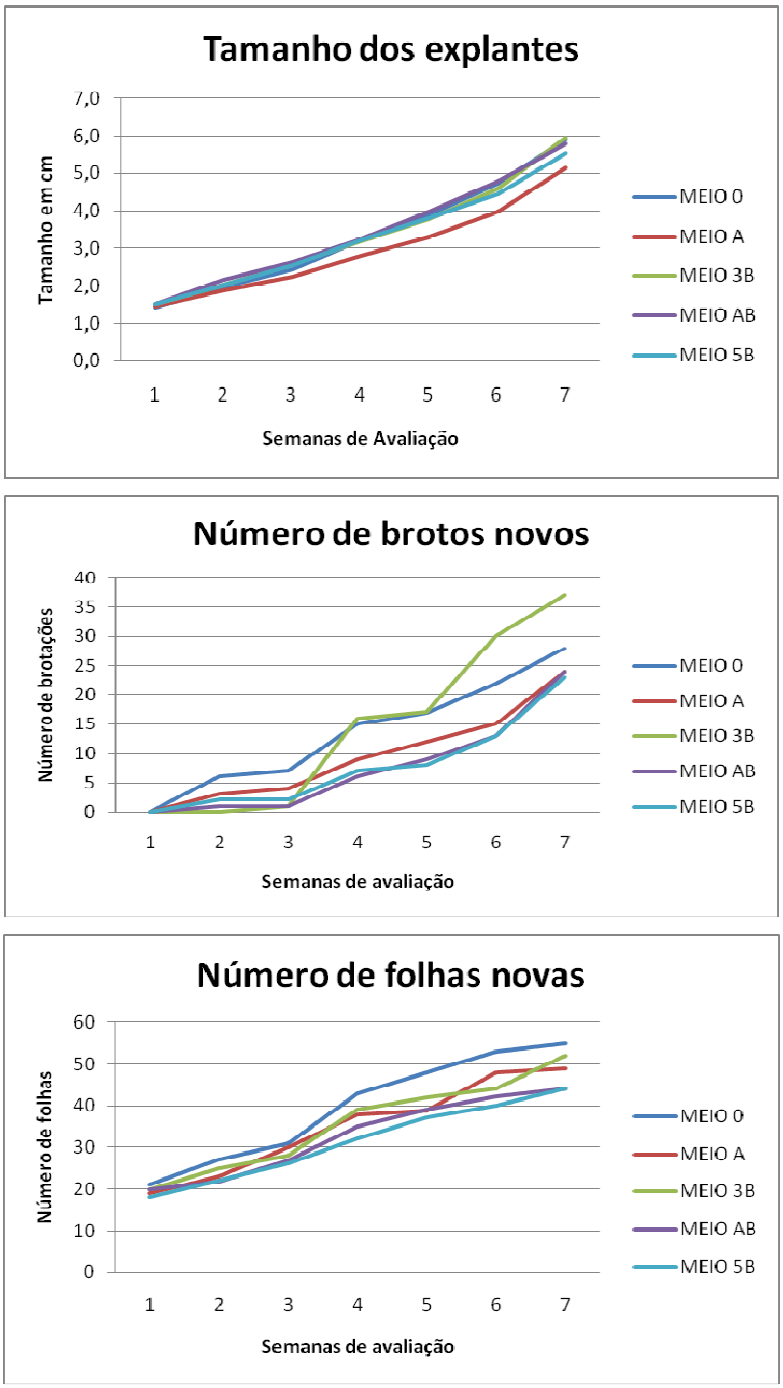


Figura 4. Efeito da aplicação de ANA e BAP sobre produção de novos brotos e folhas de explantes de *Cyrtopodium eugenii* cultivados *in vitro* em meio ½ MS sendo: ½ MS sem reguladores de crescimento (MEIO 0);1 mg de ANA (MEIO A); 3 mg de 6-benzilaminopurina - BAP (MEIO 3B); 1 mg de ANA + 3 mg de BAP (MEIO AB) e 5 mg de BAP (MEIO 5B).

4.3 Aclimatização

A aclimatação de plantas oriundas de cultura de tecidos consiste em retirá-las das condições *in vitro* e transplantá-las para recipientes com substrato adequado, em casa-de-vegetação, objetivando prepará-las para a mudança de ambiente que deverão enfrentar quando forem transferidas para o local definitivo. Fatores como genótipo, estresse hídrico, estresse pela luz, além das variações de temperatura, interferem no sucesso da aclimatização. Porém, um dos fatores mais decisivos é a escolha do substrato apropriado (Coutinho & Carvalho, 1983).

Em junho de 2009 plantas de *C. eugenii* produzidas *in vitro* foram transferidas para casa de vegetação iniciando o processo de aclimatização. O experimento terá duração de seis meses. Até o momento, plantas de *C. eugenii* estão se adaptando muito bem às novas condições. Não houve perdas em nenhum dos cinco tipos de substratos que estão sendo testados.

5 CONCLUSÕES

- Para a germinação *in vitro* de *Cyrtopodium eugenii*, o meio MS com redução à metade da concentração de macronutrientes é o meio mais eficiente em comparação aos meios MS completo e KC.
- Explantes de *Cyrtopodium eugenii* não apresentam resposta significativa para aumento no número de brotações na presença de reguladores de crescimento ANA e BAP, adicionados separadamente ou atuando em conjunto no meio ½ MS.
- Plantas de *Cyrtopodium eugenii* desenvolvidas *in vitro* adaptam-se muito bem às primeiras semanas em casa de vegetação, no início do processo de aclimatização.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, L. G.; CARNEIRO, I. F.; PRABHU, A. S. Produção *in vitro* de mudas de *Cattleya walkeriana* e *Cyrtopodium palmifrons* a partir de sementes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 29, n. 2, p. 67-71, 1999.

ARDITTI, J. Factors effecting the germination of orchid sees**. The Botanical Review,** New York, v. 33, p.1-97, 1967.

BACH, E. E.; CASTRO, O. L. Germinação de sementes de *Cattleya* sp. (Orchidaceae) em cultura de tecidos visando produção de mudas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 17-49, 2004.

BUYUN, L.; LAVRENTYEVA, A.; KOVALSKA, L.; IVANNIKOV, R. *In vitro* germination of seeds of same rare tropical orchids. **Acta Univeritatis Latviensis Biology**, Latvia, v. 676, p.159-162, 2004.

CALDAS, L. S. HARIDASSAN, P. FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C. CALDAS, L. S. BUSO, J. A. (Org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-CNPH, 1998. v. 1, cap.3, p. 87-117.

CARAMASCHI, G. M. C. L. **Propagação *in vitro* de *Cyrtopodium* spp (Orchidaceae).** 2001. 110f. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2001.

CHANG, C.; CHANG, W. C. Plant regeneration from callus of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. **Plant Cell Reports**, Dordrecht, v. 17, p. 251-255, 1998.

COUTINHO, M.; CARVALHO, E. J. M. Caracterização das propriedades de alguns substratos para a propagação de mudas. **Bragantia** , Campinas, v. 14, p. 167-176, 1983.

FARIA, R. T.; RODRIGUES, F. N.; OLIVEIRA, L. V. R.; MULLER, C. *In vitro Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucroseconcentrations. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n.4, p. 780-783, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. CALDAS, L. S. BUSO, J. A (Org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-CNPH, 1998. v. 1, p.183-245.

GRIBEL, R. Biologia reprodutiva de plantas amazônicas: importância para o uso, manejo e
conservação dos recursos naturais. **Humanidades,** Brasília, n.48, p.110-114, 2001.

JOHNSON, T. R.; KANE, M. E. Asymbiotic germination of ornamental *Vanda*: *in vitro* germination and development of three hybrids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 91, p. 251-261, 2007.
KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Societ Bulletin**, West Palm Beach, v. 15, p. 214-217, 1946.

MELLO, C. M. C. de. **Conservação de sementes de orquídeas no cerrado**. 2000. 48f. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2000.

MENEZES, L. C. **Orquídeas genus *Cyrtopodium*: espécies brasileiras**. 1. ed. Brasília: IBAMA, 2000. 208p.

MOREIRA, B. M. T.; TOMBA, E. C.; ZONETTI, P. C. Crecimento *in vitro* de plântulas de orquídea (*Laelia purpurata* Lindl. var *venosa* X *Cattleya warneri* T. Moore alba) sob diferentes concentrações de sacarose e frutose. **Revista Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 2, n.2, p. 16-21, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

PANSARIN, L. M.; PANSARIN, E. R.; SAZIMA, M. Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a Cyrtopodiinae pollinated by deceit. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 10, n. 5, p. 650-659, 2008.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; ROLLEMBERG, C. L.; CHAER, G. M. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 191-197, 2005a.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; ROLLEMBERG, C. L.; CHAER, G. M. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (ORCHIDACEAE) por fungos micorrízicos rizoctonióides. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 199-206, 2005b.

RAMOS, T. V. **Micropropagação de *Cattleya* x *mesquitae* (Orchidaceae) autofecundada: híbrido natural do estado de Goiás.** 2005. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal)-Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

SILVA, K. S.; DIAS, A. L. F.; RIVAS, R.; MONTARROYOS, P. A. V.; MAIA, M. M. D.; LAUREEN. M. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya labiata* em diferentes concentrações de GA_3. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 13, p. 36-40, 2007.

STANCATO, G. C.; FARIA, R. T. *In vitro* growth and mineral nutrition of lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem (Orchidaceae). **Lindleyana**, Flórida, v. 11, p. 41-43, 1996.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: Estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 7, p. 25-33, 2001.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C. CALDAS, L. S. BUSO, J. A. (Org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** 1. ed. Brasília: Embrapa-CNPH, 1998. v. 1, cap. 1, p. 11-37.

ANÁLISE DAS ATIVIDADES/INTERVENÇÕES DE ENFERMAGEM REFERIDAS PELA EQUIPE PARA O DIAGNÓSTICO PADRÃO RESPIRATÓRIO INEFICAZ EM IDOSOS[1]

Patrícia Silva Nunes [2], Adélia Yaeko Kyosen Nakatani[3]
Faculdade de Enfermagem/UFG, Goiânia-GO 74605-080, Brasil
e-mail: patriciasn_gyn@hotmail.com, adeliafen@gmail.com

Palavras chave: intervenções de enfermagem, atividades de enfermagem, idoso.

Introdução

A Sistematização da Assistência de Enfermagem (SAE) é um método que busca organizar os cuidados prestados a partir das respostas humanas de uma pessoa, família ou comunidade, com base nos princípios científicos. Embora a SAE esteja regulamentada pela Lei do Exercício Profissional de Enfermagem, (Lei nº 7.498/86), como uma das atividades privativas do enfermeiro (BRASIL, 1986), a maioria dos profissionais ainda não tem utilizado uma assistência sistematizada, promovendo cuidados de enfermagem pouco resolutivos. Isto tem sido observado na prática onde trabalhadores da enfermagem mantém-se arraigados no cumprimento de normas e rotinas e sobrecarregados pelas atividades desempenhadas nas instituições de saúde.

A SAE, compreendida como o Processo de Enfermagem consta de cinco fases inter-relacionadas para a realização da assistência: coleta de dados, diagnóstico de enfermagem, planejamento, prescrição e evolução (NAKATANI et al., 1998). Truppel et al. (2009) afirmam que o processo de enfermagem necessita de constante aprimoramento em resposta a demanda e ao avanço científico e tecnológico, sendo imprescindível a atualização da equipe de enfermagem, a educação permanente e a utilização dos sistemas de classificação de enfermagem, durante as realização deste.

[1]Esta pesquisa contou com o apoio do Cnpq, e foi desenvolvida junto ao Núcleo de Estudos e Pesquisas de Saúde Integral, da Faculdade Enfermagem (FEN) da Universidade Federal de Goiás.
[2]Bolsista do Programa de Iniciação Cientifica PIBIC/Cnpq/UFG, aluna do 7º período de graduação da Faculdade de Enfermagem FEN/UFG. Email: patriciasn_gyn@hotmail.com
[3]Doutora em Enfermagem. Professora Associada da FEN/UFG. Orientadora.

Vários estudos apontam o benefício à qualidade da assistência com a utilização do processo de enfermagem e dos sistemas de classificação, pois, buscam universalizar a linguagem, organizando os elementos da prática da enfermagem conforme suas similaridades (SILVA; RIBEIRO; FABRÍCIO, 2007; GARCIA; NÓBREGA; CARVALHO, 2004; ANTUNES, 2006). Entre os sistemas de classificação comumente utilizados estão a North American Nursing Diagnosis Association (NANDA), a Nursing Intervention Classification (NIC) e a Nursing Outcomes Classification (NOC).

A taxonomia da NIC está estruturada em três níveis: domínio. Classe e intervenção de enfermagem. Cada intervenção de enfermagem tem um título identificador, uma definição e um conjunto de atividades. As intervenções de enfermagem, para cada diagnóstico de enfermagem, são agrupadas em três níveis: as prioritárias, as sugeridas e adicionais optativas (DOCHTERMAN; BULECHEK, 2008).

De acordo com a NIC, as intervenções de enfermagem é qualquer tratamento baseado no julgamento e no conhecimento clínico realizado para melhorar os resultados do paciente/cliente. Atividades de enfermagem são comportamentos ou ações específicas realizadas para implementar uma intervenção visando o alcance dos resultados desejados (DOCHTERMAN; BULECHEK, 2008). Observa-se na prática que as intervenções de enfermagem são manifestadas pelas atividades implementadas pelo profissional de enfermagem.

Pesquisas vem sendo desenvolvidas, utilizando-se os sistemas de classificação, como os que relacionam diagnósticos e intervenções de enfermagem. Destacam-se os estudos com a população idosa, grupo emergente, que requer olhares diferenciados, pois, é acometida por doenças crônicas, principalmente as cardiovasculares e as respiratórias, que tem como desfecho a hospitalização e reinternações acarretando altos custos ao sistema de saúde (MARTINS, 2005; GUEDES, 2008).

Muitas doenças crônico-degenerativas evidenciadas em idosos apresentam sintomas respiratórios (dispnéia, taquipnéia, tiragem intercostal entre outros), que caracterizam respostas humanas como o diagnóstico de enfermagem Padrão Respiratório Ineficaz. Este diagnóstico é definido pela NANDA como “inspiração e/ou expiração que não proporciona ventilação adequada” (NANDA; 2008, p.246). Nunes e Nakatani (2008) identificaram a prevalência do Padrão Respiratório Ineficaz em

60% dos idosos admitidos para tratamento de doenças cardiovasculares no setor de clínica médica em um hospital de ensino. Almeida et al. (2008) ao analisarem 1665 prontuários de idosos internados identificaram quatro diagnósticos prevalentes, entre eles destaca-se o padrão respiratório ineficaz cujo fator relacionado foi o processo infeccioso das vias aéreas. Neste estudo, as atividades prescritas foram vigiar o padrão respiratório, manter a cabeceira elevada, implementar rotinas com oxigenoterapia/cateter nasal, monitorar o padrão respiratório e comunicar alterações do padrão respiratório.

Diante da alta prevalência de agravos respiratórios em idosos e da necessidade de sistematizar a prática da enfermagem, acredita-se que identificar as atividades que a equipe de enfermagem realiza frente ao idoso portador de Padrão Respiratório Ineficaz e mapeá-las com as intervenções e atividades da NIC dará visibilidade as ações realizadas e não realizadas pela equipe de enfermagem, despertando os profissionais para a possibilidade de outras práticas de intervenções de enfermagem que poderão refletir em uma assistência de enfermagem resolutiva.

Dessa forma o presente estudo visa identificar as atividades realizadas pela equipe de enfermagem frente ao Padrão Respiratório Ineficaz em idosos e mapeá-las com as intervenções/atividades preconizadas pela NIC para este diagnóstico.

Metodologia

Trata-se de estudo descritivo desenvolvido no setor de clínica médica de um hospital escola da região centro-oeste, no período de agosto a outubro de 2008. A amostra foi constituída por trabalhadores de enfermagem do setor. Considerou-se como critérios de inclusão: ser funcionário da instituição e da clínica médica a mais de seis meses e concordar em participar da pesquisa mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Para exclusão, adotou-se como critério a não concordância em participar do estudo, o afastamento do trabalho por qualquer motivo e o desencontro com o trabalhador, após o terceiro agendamento e após cinco visitas consecutivas.

A primeira etapa da pesquisa foi realizada junto à equipe de enfermagem a fim de identificar as atividades realizadas pela equipe de enfermagem diante de idosos portadores de padrão respiratório ineficaz. Num segundo momento, as atividades referidas foram mapeadas com as intervenções e atividades preconizadas pela NIC

para este diagnóstico, utilizando-se como referencial as regras de Coenen, Ryan e Sutton (1997).

O mapeamento cruzado procedeu na seguinte ordem: buscou-se primeiro mapear as intervenções/atividades prioritárias, quando não havia possibilidade, prosseguia o mapeamento para as intervenções/atividades sugeridas e, posteriormente, para as adicionais optativas. Duas pesquisadoras realizaram o mapeamento de forma independente, porém utilizando a mesma regra. Em caso de desacordos entre elas para algumas atividades mapeadas, uma terceira pesquisadora foi consultada, conferindo assim, maior confiabilidade ao mapeamento.

Os dados foram lançados em um banco de dados elaborado no software Statistical Package of Social Sciences for Windows®, versão 16.0, que permitiu a realização de estatística descritiva das atividades referidas pelos participantes.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás-UFG, com número de protocolo 007/009.

Resultados e Discussão

Participaram do estudo 44 trabalhadores de enfermagem, sendo 07 enfermeiros, 35 técnicos de enfermagem e 02 auxiliares de enfermagem. Predominou o sexo feminino, a idade média de 39 anos e tempo de trabalho entre 1 e 5 anos.

Foram descritas 62 atividades pela equipe, destas, 53 foram mapeadas para intervenções do diagnóstico Padrão Respiratório Ineficaz. As atividades referidas pela equipe que não puderam ser mapeadas com as intervenções do diagnóstico em foco (09) foram excluídas.

As atividades de maior prevalência foram: “Elevar a cabeceira do leito = ou > 45º” (63,6%), “Colocar suporte para oxigenoterapia (cateter, máscara, máscara de Venturi)” (88,6%), “Administrar medicação (61,3%)”. Pimental, et al (1990) e Hardie et al. (2002) constataram que o uso do posicionamento como recurso terapêutico é largamente utilizado, e que a equipe de enfermagem realiza esta atividade visando a melhora da ventilação do paciente. A administração de oxigênio aquecido e umidificado está indicada em algumas situações em que a capacidade de aquecer e

umidificar o ar inspirado pode ser comprometida como: insuficiência respiratória e pelo próprio processo do envelhecimento (SCANLAN; WILKINS; STOLLER, 2000). Quanto a administrar medicação, Telles Filho e Cassiani (2004) relataram que esta atividade é uma prática habitual e de responsabilidade legal da enfermagem, ocupando papel relevante na terapêutica do cliente.

Na tabela 1 é apresentado o mapeamento das atividades referidas pela equipe de enfermagem com as contidas na NIC e as respectivas intervenções com freqüência superior a 50%.

Tabela 1 – Atividades referidas, pela equipe de enfermagem, como implementadas no cuidado de idosos com Padrão Respiratório Ineficaz e mapeadas, de acordo com a intervenção/atividades da *NIC*, com freqüência > 50%.Goiânia, 2008.

Atividades descritivas	**Intervenções (NIC)**	**Atividades (NIC)**	***f* %**	**n**
Elevar a cabeceira do leito = ou > 45º	Posicionamento **99,9%**	Posicionar o paciente, de forma a maximizar o potencial ventilatório	63,6	28
Posicionar o paciente de forma correta no leito		Posicionar o paciente, visando aliviar a dispneia	36,3	16
Colocar suporte para oxigenoterapia (cateter, máscara, máscara de Venturi)	Oxigenoterapia **99,8%**	Ajustar o equipamento e administrar o oxigênio, por meio de um sistema aquecido e umidificado	88,6	39
Observar conexões (umidificador, volume de O_2, obstrução de cateter)		Monitorar a posição do dispositivo de distribuição de oxigênio	6,8	03
Realizar higienização adequada		Limpar as secreções orais, nasais e traqueais, quando adequado	2,2	01
Conferir a prescrição médica do O_2		Administrar oxigênio suplementar, conforme prescrito	2,2	01
Administrar medicação	Administração de Medicamentos **70,3%**	Dar o medicamento, usando a técnica e a via adequada	61,3	27
Administrar corticóide		Administrar medicamentos, para promover a desobstrução das vias aéreas, e a troca de gases	4,5	02
Administrar broncodilatador		Administrar broncodilatador, conforme adequado	4,5	02

Conforme evidenciado na tabela 1 as intervenções mais prevalentes foram: “Posicionamento” (99,9%), Oxigenoterapia (99,8%) e Administração de Medicamentos (70,3%).

Doenges, Moorhouse e Geissler (2003) enfatizam que o posicionamento adequado favorece a ventilação pulmonar, contudo, apontam a existência de diferentes posições terapêuticas que otimizam a resposta ventilatória.

Observou-se que não foram referidos pela equipe de enfermagem os diferentes tipos de posicionamentos usados como medida terapêutica no cuidado a idosos portadores de Padrão Respiratório Ineficaz. Apenas a elevação de cabeceira foi referida, fato que nos leva a considerar o uso dessa terapêutica pela enfermagem, limitando-se apenas a este um único posicionamento; enquanto que outras posições como exemplo a prona tem sido apontadas por diversos autores na melhoria da oxigenação dos pacientes (SCANLAN, WILKINS e STOLLER, 2000).

Em relação à intervenção oxigenoterapia Higgins (2005) refere que esta deve ser monitorada criteriosamente a fim de que o profissional decida com base nas condições clínicas do indivíduo, o sistema de oferta de oxigênio mais apropriado.

Para isso, deve ser observado o propósito da terapia, a idade do paciente e a eficácia do equipamento na execução da mesma. Portanto, o enfermeiro deve ter conhecimento e habilidade para identificar as situações clínicas que requeiram o uso de oxigenoterapia e, dessa forma, administrá-la rápida e adequadamente, sem causar danos ao paciente.

Embora a intervenção "Administração de medicamentos" seja uma atividade dependente da prescrição médica, Coimbra e Cassiani (2001) atentam para a necessidade da equipe de enfermagem e, principalmente o enfermeiro, conhecer o medicamento (forma de administração, indicações, contra-indicações, interações, tempo e forma de ação, etc.), fazendo assim um juízo clínico da situação do paciente, não sendo executada mecanicamente e em subordinação a ordem médica. A administração criteriosa evita efeitos adversos e transtornos, ante a uma escolha terapêutica equivocada.

Na tabela 2 é apresentado o mapeamento das atividades referidas pela equipe de enfermagem com as contidas na NIC e as respectivas intervenções com freqüência inferior a 50% e superior a 20%.

Tabela 2 – Atividades referidas, pela equipe de enfermagem, como implementadas no cuidado de idosos com Padrão Respiratório Ineficaz e mapeadas, de acordo com a intervenção/atividades da NIC, com freqüência < 50% e >20%. Goiânia, 2008

Atividades descritivas	Intervenções (NIC)	Atividades (NIC)	f %	n
Tranquilizar o paciente e diminuir a ansiedade	Redução da Ansiedade **42,9%**	Usar uma abordagem calma e segura	20,4	09
Conversar com o paciente		Encorajar a verbalização de sentimentos, quanto ao diagnóstico, ao tratamento e ao impacto no estilo de vida	15,9	07
Permanecer ao lado até a sua melhora		Permanecer com o paciente, para promover segurança e reduzir o medo	2,2	01
Incentivar o apoio e a presença da família		Encorajar a família a permanecer com o paciente, conforme apropriado	2,2	01
Realizar massagem		Realizar massagem nas costas/nuca, conforme apropriado	2,2	01
Fazer aerossolterapia	Controle de Vias Aéreas **40,5%**	Administrar tratamentos com aerossol, conforme adequado	22,7	10
Incentivar a respiração correta		Encorajar a respiração lenta e profunda, a mudança de posição e o tossir	6,8	03
Fazer inaloterapia		Ensinar o paciente a usar inaladores, conforme adequado	2,2	01
Observar vias aéreas		Monitorar o estado respiratório e a oxigenação, conforme apropriado	2,2	01
Auscultar e avaliar os sons respiratórios		Auscultar os sons respiratórios, observando as áreas de ventilação diminuídas ou ausentes e a presença de ruídos adventícios	2,2	01
Dar suporte ventilatório (intubação se necessário)		Inserir via aérea artificial na oro/nasofaringe, conforme adequado	2,2	01
Realizar fisioterapia		Realizar fisioterapia de tórax, conforme adequado	2,2	01
Observar padrão respiratório	Monitoração Respiratória **36,8%**	Monitorar padrões respiratórios: bradipneia, taquipneia, hiperventilação, respiração de Kussmaul, de Cheyne-Stokes, respiração apnêustica, respiração de Biot e padrões atáxicos	18,8	08
Fazer nebulização		Usar nebulizador ultra-sônico, conforme apropriado Iniciar tratamento de fisioterapia respiratória (p. ex.: nebulização, se adequada)	13,6	06
Anotar o padrão respiratório		Monitorar padrões respiratórios: bradipneia, taquipneia, hiperventilação, respiração de Kussmaul, de Cheyne-Stokes, respiração apnêustica, respiração de Biot e padrões atáxicos	2,2	01
Solicitar fisioterapia respiratória		Iniciar tratamentos de fisioterapia respiratória	2,2	01
Colocar oxímetro	Assistência Ventilatória **36,3%**	Monitorar o estado respiratório e a oxigenação	31,8	14
Desobstruir as vias aéreas (aspirar / instilar solução fisiológica nas narinas)		Manter as vias aéreas desobstruídas	4,5	02

Anotar sinais vitais	Monitoração de Sinais Vitais **31,8%**	Monitorar a pressão arterial, o pulso, a temperatura e o padrão respiratório, quando adequado	27,2	12
Observar sinais de cianose de extremidades		Monitorar a presença de cianose central e periférica	9,0	04
Acionar o médico e/ou enfermeiro	Controle da Asma **31,8%**	Encaminhar para avaliação médica, se adequado	31,8	14
Manter paciente em repouso	Controle de Energia **31,7%**	Promover conforto no leito/limitação de atividades	13,6	06
Orientar o paciente a reduzir esforços físicos		Orientar o paciente / pessoas significativas a reconhecer sinais e sintomas de fadiga que requeiram a redução da atividade	9,09	04
Auxílio da deambulação		Auxiliar nas atividades físicas regulares (p. ex.: deambulação), conforme a necessidade	6,8	03
Auxiliar na mudança de decúbito		Auxiliar nas atividades físicas regulares (p. ex.: mudança de decúbito)	2,2	01
Proporcionar conforto ao paciente	Supervisão **29,5%**	Monitorar o nível de conforto e implementar intervenções adequadas à situação	15,9	07
Observar sinais de alteração de nível de consciência		Monitorar o nível de consciência Monitorar o estado neurológico	9,09	04
Observar alterações do quadro do paciente (melhora ou piora)		Comparar o estado atual do paciente, para detectar melhoras e pioras em sua condição	4,5	02
Dar apoio psicológico e emocional	Suporte emocional **27,2%**	Permanecer com o paciente, oferecer segurança e proteção, durante períodos de ansiedade Encaminhar o paciente para aconselhamento, quando adequado	27,2	12
Manter o ambiente ventilado	Controle da Dor **24,9%**	Controlar os fatores ambientais capazes de influenciar a resposta do paciente, ao desconforto	11,3	05
Administrar medicamento para minimizar a dor		Oferecer à pessoa alívio ideal da dor, com uso dos analgésicos prescritos	6,8	03
Investigar/observar algias		Realizar uma avaliação abrangente da dor, que inclua o local, as características, o início, a duração, a frequência, a qualidade, a intensidade ou a gravidade da dor e os fatores precipitantes	6,8	03

A frequência da intervenção “redução da ansiedade”(42,9%) demonstra que a ansiedade é uma manifestação comum em pessoas submetidas à internação hospitalar. Em se tratando de idosos, torna-se mais evidente, pois estes sentem vulneráveis e ameaçados diante de doenças crônicas que requerem, geralmente, hospitalizações frequentes em ambientes desconhecidos. Dessa forma, reconhecer a necessidade de amenizar estressores em indivíduos durante o processo de hospitalização demonstra sensibilidade por parte da equipe de enfermagem e reflete a importância dada por esses trabalhadores, ao cuidado emocional. Francisco et al. (2006) destacaram que a depressão, ansiedade e problemas emocionais podem ser decorrentes de patologias do sistema respiratório. A exacerbação de sintomas e a progressão da doença refletem diretamente na impossibilidade de realizar as atividades rotineiras, levando a frustrações, descaso com a vida e diminuição da auto-estima.

O “Controle de vias aéreas” corresponde a uma intervenção da NIC prioritária o que expressa como parte das atividades essenciais para o diagnóstico Padrão Respiratório Ineficaz. A frequência das atividades referidas e mapeadas para esta intervenção foi de 40,5%, o que demonstra que os participantes atentam primeiramente para outras atividades diante desta resposta humana.

Ressalta-se que as atividades: “fazer inaloterapia” e “fazer aerossolterapia” citadas pelos participantes são frequentemente executadas de acordo com a

prescrição médica sem, contudo, diferenciar o dispositivo utilizado para cada terminologia. Dessa forma a equipe de enfermagem deve ter segurança no manuseio de cada dispositivo, bem como a vantagem e desvantagem deste, a fim de informar quanto à maneira correta de utilizar e, assim como avaliar a eficácia do dispositivo para o paciente.

Doenges, Moorhouse e Geissler (2003) enfatizam ainda a importância dos exercícios respiratórios. Para as autoras, esta atividade pode fortalecer os músculos que atuam no processo respiratório, minimizando a fadiga respiratória e possíveis colapsos das pequenas vias aéreas, auxiliando no controle da dispnéia e contribuindo beneficamente para aumentar a tolerância na realização de atividades.

A intervenção "Assistência Ventilatória" apresentou uma frequência de 36,8% distribuída entre as atividades: "colocar oxímetro" (31,8%) e "desobstruir as vias aéreas (aspirar / instilar solução fisiológica nas narinas) (4,5%). A oximetria de pulso constitui uma técnica não invasiva, que permite a monitoração contínua da saturação parcial da hemoglobina arterial pelo oxigênio, e possibilita estimativas seguras relativas à oferta de oxigênio ao paciente (SCANLAN; WILKINS; STOLLER, 2000). A desobstrução de vias aéreas é imprescindível quando há acúmulo de secreções e impossibilidade de expeli-las, visando a sua eliminação, possibilitando a passagem de ar pelas vias aéreas (GUERREIRO; GUIMARÃES; MARIA, 2000; MARTINS; GUTIÉRREZ, 2005). Em indivíduos idosos, além do agravo respiratório instalado, a senilidade reduz a eficácia na remoção de resíduos e umidificação das vias aéreas, contribuindo assim, para o acúmulo de secreção e diminuição da capacidade ventilatória eficiente.

"Controle da Asma" (31,8%) é definida pela NIC como: "identificação, tratamento e prevenção de reações à inflamação/ contrição das vias aéreas" (DOCHTERMAN; BULECHEK, 2008) e é uma das intervenções prioritárias para o diagnóstico de enfermagem em questão. Suas atividades referidas e mapeadas dizem respeito ao reconhecimento de problemas e a investigação clínica do paciente. Dessa forma a assistência deve ser pautada na competência adquirida, ao longo da práxis assistencial, para assim, estarem aptos à assistência de pessoas que se encontram em situações de vulnerabilidade causadas principalmente: pelo desenvolvimento de agravos crônico degenerativos, internação hospitalar e do envelhecimento.

As intervenções “Monitoração Respiratória” (36,8%) e “Monitoração de sinais vitais” (31,8%) requerem da equipe de enfermagem o conhecimento sobre: a fisiologia do sistema respiratório, os principais sinais e sintomas evidenciados durante a instalação de agravos, o conhecimento das alterações fisiológicas e patológicas dos pacientes idosos, favorecendo a obtenção de dados significativos, para o planejamento da assistência de enfermagem, destes pacientes.

A não identificação de alterações e o descaso relativo à anotação de informações significativas são fatores dificultadores no acompanhamento do tratamento dispensado à pessoa. Em geral a prática de enfermagem tem sido limitada a procedimentos de rotina e cumprimento da prescrição médica, mostrando-se simples, incompletas, fragmentadas e repetitivas (OCHO-VIGO et al., 2001).

A intervenção “Controle de Energia”(31,7%) constituída pelas atividades referidas “Manter paciente em repouso”, “Orientar o paciente a reduzir esforços físicos”, “Auxílio da deambulação” e “Auxílio na mudança de decúbito”, remete a necessidade da equipe de enfermagem reconhecer precocemente os sinais clínicos de dispnéia, de forma a auxiliar na reversão do quadro, incluindo as atividades acima que são de suma importância para o sucesso da terapêutica.

A intervenção “Supervisão” (29,5%) remete para necessidade da equipe de enfermagem, manter-se atenta ao paciente, durante todo o turno de trabalho afim de reconhecer os sinais de piora ou melhora diante dos sinais e sintomas. A necessidade dos cuidados está diretamente relacionada à observação realizada pelo enfermeiro, juntamente com o idoso ou seu acompanhante e outros profissionais envolvidos, no cuidado.

A monitoração contínua do indivíduo, inclusive quando apresenta sinais de instabilidade, são relevantes para uma tomada de decisão rápida. Bettencourt (2002) descreveu que entre as condutas do enfermeiro, está o acompanhamento da evolução clínica do paciente/cliente para, então, apresentar intervenções de repercussão coerentes com a situação avaliada.

Na intervenção “Suporte Emocional”(27,2%) inclui a atividade “dar apoio psicológico” referida por 27,2%. Para Oriá, Moraes e Victor (2004) o processo de hospitalização é permeado pelo medo do desconhecido, do ambiente e de pessoas estranhas. Nesse sentido, demonstrações de afeto e cuidados, que vão além de técnicas, procedimentos e protocolos terapêuticos, repercutem na vida pessoal dos

indivíduos assistidos, oferecendo novas perspectivas essenciais, fora do ambiente hospitalar.

O "Controle da Dor" foi referido por 24,9% dos participantes. Em idosos, a manifestação da dor apresenta-se por meio do isolamento social, da apatia, da agitação. Durante o cuidado, é importante observar as expressões faciais, posicionamentos antálgicos, expressões paralinguísticas e rubor. Contudo, alguns profissionais da saúde, acreditam que as sensações dolorosas são comuns ao envelhecimento, por isso habituam-se, e não procuram saná-las (ANDRADE; PEREIRA; SOUSA, 2006). Assim, a sensibilidade da equipe de enfermagem para identificar presença/ausência de dor, assim como implementar atividades farmacológicas e não-farmacológicas são importantes, para melhorar o padrão respiratório, visto que a tendência da pessoa que está com dor, principalmente na região abdominal alta, é de respirar superficialmente, agravando ainda mais o seu estado de saúde que está com a respiração comprometida.

A tabela 3 refere-se ao mapeamento das atividades referidas pela equipe de enfermagem com as contidas na NIC e as respectivas intervenções com freqüência inferior a 20%.

Tabela 3 – Atividades referidas, pela equipe de enfermagem, como implementadas no cuidado de idosos com Padrão Respiratório Ineficaz e mapeadas, de acordo com a intervenção/atividades da NIC, com freqüência <20%. Goiânia, 2008.

Atividades descritivas	Intervenções (NIC)	Atividades (NIC)	f %	n
Aspirar se necessário	Aspiração de vias aéreas **9,0%**	Aspirar à nasofaringe com seringa ou dispositivo de aspiração, conforme apropriado Inserir dispositivo nasal para facilitar a aspiração nasotraqueal, conforme apropriado. Aspirar à orofaringe após o término da aspiração da traquéia.	6,8	03
Preparar a cabeceira com dispositivo de O_2 e o aspirador		Aspirar à nasofaringe com seringa ou dispositivo de aspiração, conforme apropriado. Usar equipamento esterilizado descartável para cada procedimento de aspiração traqueal.	2,2	01
Orientar alimentação leve e fracionada	Controle da Nutrição **9,0%**	Oferecer alimentos leves e cremosos, quando adequado	4,5	02
Oferecer dieta para DPOC		Oferecer alimentos selecionados Adaptar a dieta ao estilo de vida do paciente, quando adequada	4,5	02
Controlar gotejamento da soroterapia	Terapia endovenosa **6,8%**	Monitorar a taxa de fluxo EV, bem como o sítio de punção durante a infusão	6,8	03
Solicitar gasometria	Monitoração ácido-básica **4,5%**	Obter sangue para a determinação dos níveis da gasometria arterial, assegurando a circulação adequada à extremidade antes e após a coleta	4,5	02
Realizar punção periférica	Punção venosa **4,5%**	Inserir agulha conforme a instrução do fabricante	4,5	02
Orientar o paciente a evitar o cigarro	Assistência para parar de fumar **2,2%**	Oferecer ao fumante conselhos claros e consistentes para deixar de fumar	2,2	01
Orientar quanto à automedicação	Controle de medicamentos **2,2%**	Ensinar o paciente e / ou família o método de administração do medicamento, quando adequado Providenciar ao paciente e aos seus familiares informações escritas e ilustradas para melhorar a auto-administração de medicamentos, quando adequado	2,2	01
Hidratar o paciente	Controle hídrico **2,2%**	Oferecer líquidos, quando adequado	2,2	01
Regular os parâmetros do ventilador mecânico	Ventilação mecânica **2,2%**	Monitorar rotineiramente os parâmetros do ventilador Verificar regularmente as conexões	2,2	01

As atividades evidenciadas na tabela acima tiveram baixa freqüência de aparecimento, entretanto devem ser levadas em consideração em se tratando do diagnóstico de enfermagem Padrão Respiratório Ineficaz em idosos, com peculiaridades e cuidados específicos para essa população.

Evidencia-se na prática que essas atividades estão sendo compartilhadas com outras categorias profissionais repercutindo em uma menor delimitação dos fazeres de enfermagem no atendimento de uma clientela específica (DOCHTERMAN; BULECHEK, 2008). Chama atenção ainda, que as atividades que envolvem orientação foram referidas com uma frequencia baixa, apesar de serem de suma importância para autonomia do indivíduo no autocuidado, o que poderia refletir em uma diminuição de reinternações e melhora na qualidade de vida do idoso.

Conclusões

Participaram do estudo 44 trabalhadores de enfermagem entre estes enfermeiros, técnicos de enfermagem e auxiliares de enfermagem, com tempo de trabalho predominando entre 1 e 5 anos.

Das 53 atividades referidas, as de maior prevalência foram: “Elevar a cabeceira do leito = ou > 45º”, “Colocar suporte para oxigenoterapia (cateter, máscara, máscara de Venturi)” e “Administrar medicação”.

As atividades foram mapeadas em sua maioria com intervenções sugeridas para o Padrão Respiratório Ineficaz, assim podem apresentar baixo impacto na resolutividade da assistência prestada pela equipe de enfermagem.

As intervenções de enfermagem mapeadas com as atividades referidas de maior freqüência foram: “Posicionamento”, “Oxigenoterapia”, “Administração de medicamentos”, “Redução da ansiedade”, “Controle de vias aéreas”, “Assistência ventilatória”. A maioria das intervenções mapeadas pertencia ao domínio fisiológico e classe de função respiratória.

Verificou-se que de 42 intervenções sugeridas pela NIC para o diagnóstico de enfermagem Padrão Respiratório Ineficaz, 22 foram identificadas na realidade estudada e que a maior prevalência das atividades mapeadas pertenciam ao grupo de intervenções sugeridas para o diagnóstico em estudo.

O estudo permitiu despertar a equipe de enfermagem para a possibilidade de outras práticas de intervenções que poderão refletir em uma assistência de

enfermagem resolutiva e identificar as fragilidades do cuidado de enfermagem diante do Padrão Respiratório Ineficaz. Considerando a prevalência dos problemas respiratórios em pessoas idosas, é necessário investir no aprofundamento da temática visando selecionar intervenções de maior impacto diante desta resposta humana nesta população, além da necessidade de gestão de pessoas e adequação dos recursos materiais para assistência de enfermagem de qualidade.

Referências Bibliográficas:

ALMEIDA, M.A.; ALITI, G.B.; FRANZEN, E.; THOMÉ, E.G.R.; UNICOVSKY, N.R.; RABELO, E.R., et al. Diagnósticos de enfermagem e intervenções prevalentes no cuidado ao idoso hospitalizado. **Rev. Latino-Am. Enferm**, v.16, n.4, p.1-6, 2008.

ANDRADE, F.A.; PEREIRA, L.V.; SOUSA, F.A.E.F. Mensuração da dor no idoso: uma revisão. **Rev. Latino-am. Enfermagem**, v.14, n.2, p.71-6, 2006.

ANTUNES, M.J.M. A Prática de Enfermagem e Os Sistemas de Classificação: a Ótica da ABen. Sistemas de Classificação da prática de Enfermagem. 8º Simpósio Nacional de Diagnósticos de Enfermagem; João Pessoa, Brasil: Associação Brasileira de Enfermagem, p.9-19, 2006.

BETTENCOURT, A.R.C.; OLIVEIRA, M.A.; FERNANDES, A.L.G.; BOGOSSIAN, M. Educação de pacientes com asma: atuação do enfermeiro. **Jornal de Pneumologia**, v.28, n.4, p.193-200, 2002.

BRASIL. Conselho Federal de Enfermagem. LEI 7498/86 – Regulamentações do exercício profissional. Brasília: COFEN, 1986.

COENEN, A.; RYAN, P.; SUTTON, J. Mapping Nursing Interventions from a Hospital Information System to the Nursing Interventions Classification (NIC). Nursing Diagnosis, v.8, n.4, p.145-151, 1997.

COIMBRA, J.A.H.; CASSIANI, S.H.B. Responsabilidade da enfermagem na administração de medicamentos: algumas reflexões para uma prática segura com qualidade de assistência. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v.9, n.2, p.56-60, 2001.

DOENGES, M.E.; MOORHOUSE, M.F.; GEISSLER, A.C. Planos de cuidado de enfermagem: orientações para o cuidado individualizado do paciente. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

DOCHTERMAN, J.M.; BULECHEK, G.M. Classificação das Intervenções de Enfermagem – NIC. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

FRANCISCO, P.M.S.B.; DONALISIO, M.R.; BARROS, M.B.A.; CÉSAR, C.L.G.; CARANDINA, L.; GOLDBAUM, M. Fatores associados a doença pulmonar em idosos. **Rev. Saúde Pública**, v.40, n.3, p.428-435, 2006.

GARCIA, T.R.; NÓBREGA, M.M.L.; CARVALHO, E.C. Processo de enfermagem: aplicação à prática profissional. **Online Brazilian Journal of Nursing**, v.3, n.2, p.1-7, 2004.

GUERREIRO, A.L.S.; GUIMARÃES, H.C.Q.C.P.; MARIA, V.L.R. Diagnóstico de enfermagem do paciente adulto no primeiro pós-operatório de cirurgia cardíaca. **Acta Paul. Enf**, v.13, n.2, p.59-67, 2000.

HARDIE, J.Á.; MORKVE, O.; ELLINGSEN, I. Effect of body position on arterial oxygen tension in the elderly. **Clinical Investigations**, v.69, n.2, p.123-8, 2002.

HIGGINS, D. Oxygen Therapy. **Nurse Times**, v.101, n.4, p.30-31, 2005.

MARTINS, I.; GUTIÉRREZ, M.G.R. Intervenções de enfermagem para o diagnóstico de enfermagem Desobstrução ineficaz de vias aéreas. **Rev. Acta Paul. Enferm**, v.18, n.2, p.143-9, 2005.

NAKATANI, A. Y. K., et al. Metodologia da Assistência de Enfermagem: estudo do processo operacional em um hospital de ensino**. Revista Enfermagem UERJ**, v.6, n.1, p. 259-65, 1998.

NANDA, North American Nursing Diagnosis Association. Diagnósticos de Enfermagem da NANDA: definições e classificação – 2007/2008. Tradução Jeanne L. M. Michael. Porto Alegre: Artmed, 2008.

NUNES, D.P.; NAKATANI, A.Y.K. Diagnósticos de enfermagem identificados na admissão e alta hospitalar de idosos com doenças cardiovasculares. In: Congresso de pesquisa, ensino e extensão da UFG – CONPEEX. V, 2008, Goiânia. Anais eletrônicos do XVI Seminário de Iniciação Científica [CD-ROM], Goiânia, p.3118-3130, 2008.

OCHOA-VIGO, K.; PACE, A.E.; ROSSI, L.A.; HAYASHIDA, M. Avaliação da qualidade das anotações de enfermagem embasadas no processo de enfermagem. **Rev. esc. enferm. USP**, v.35, n.4, p.390-98, 2001.

ORIÁ, M.O.B.; MORAES, L.M.P.; VICTOR, J.F. A comunicação como instrumento do enfermeiro para o cuidado emocional do cliente hospitalizado. **Rev. Eletr. de Enf**, v.6, n.2, p.292-7, 2004.

PIMENTA, C.A.M.; KOIZUMI, M.S. Posição corporal e oxigenação parte 2 – paciente com disfunção pulmonar bilateral. **Rev. Esc. Enf. USP**, v.24, n.1, p.67-76, 1990.

SCANLAN, C.L.; WILKINS, R.L.; STOLLER, J.K. Fundamentos da terapia respiratória de Egan. 7. ed. São Paulo: Manole, 2000.

SILVA, D.C.; RIBEIRO, A.A.; FABRÍCIO, S.C.C. Produção do conhecimento sobre Sistematização da Assistência de Enfermagem a Idosos. **Rev. Enf. UERJ**, v.15, n.3, p.406-10, 2007.

TELLES FILHO, P.C.P.; CASSIANI, S.H.B. Administração de medicamentos: aquisição de conhecimentos e habilidades requeridas por um grupo de enfermeiros**. Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v.12, n.3, p.533-540, 2004.

TRUPPEL, T.C.; MEIER, M.J.; CALIXTO, R.C.; PERUZZO, S.A.; CROZETA, K. Sistematização da Assistência de Enfermagem em Unidade de Terapia Intensiva. **Rev. Bras. Enferm**, v.62, n.2, p.221-7, 2009.

VELLOSO, M.; JARDIM, J.R. Funtionality of patients with chronic obstructive pulmonary disease: energy conservation techniques. **J. Bras. Pneum**, v.32, n.6, p.580-86, 2006.

Nova formulação de curcumina: associação em bicamadas de ácido dodecanóico funcionalizado em nanopartículas de magnetita

Michelly Christine dos Santos[a,*], Emília Celma de Oliveira Lima[a], Lidia Andreu Guillo[b]

[a]*Instituto de Química,* [b]*Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 74.001-970, Brasil*

* E-mail: michellycds@gmail.com

Palavras-chave: magnetita, curcumina, adsorção, potencial zeta, estabilidade coloidal.

1 INTRODUÇÃO

Estudos apresentam a curcumina, pigmento isolado dos rizomas do açafrão (*Curcuma longa* L.), como um agente terapêutico em potencial (MAHESHWARI *et al.*, 2006). Atividades antioxidante, antiinflamatória (SANDUR *et al.*, 2007), antibactericida (SINGH *et al.*, 2002) e antitumor (WANG *et al.*, 2008) são alguns dos efeitos biológicos desse composto polifenol de caráter hidrofóbico. Além disso, a curcumina mostra efeitos inibitórios de crescimento de células cancerosas, o que sugere seu uso na prevenção de câncer (KUO; HUANG; LIN, 1996) e ainda é capaz de induzir apoptose em células cancerosas, potencializando seu uso no tratamento de câncer (SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005).

Por outro lado, a curcumina apresenta farmacocinética desfavorável principalmente devido sua baixa solubilidade em meio aquoso, o que resulta em baixa biodisponibilidade sistêmica no organismo (SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005). Assim, para que a curcumina atue como um agente terapêutico eficiente, o desenvolvimento de uma nova formulação deste composto se torna pertinente.

A literatura relata a síntese de nanopartículas poliméricas menores que 100 nm que encapsulam a curcumina, com um centro hidrofóbico e uma cobertura hidrofílica, que possibilita a dispersão completa da curcumina em meio aquoso (BISHT *et al.*, 2007). Maiti *et al.* (2007) relatam o desenvolvimento de um complexo de curcumina-fosfolipídeo com propriedade antioxidante superior à curcumina livre.

Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro são amplamente utilizadas em várias aplicações biomédicas. Além de sua utilização como agentes de contraste em imagens obtidas por ressonância magnética (PORTET *et al.*, 2001), na manipulação de membranas celulares (WILHELM *et al.*, 2002) e no tratamento de hipertermia para células cancerosas (ITO *et al.*, 2005), as nanopartículas de óxido de ferro estão

sendo estudadas como sistemas de liberação de drogas, que sob um campo magnético podem ser direcionadas a uma região específica (ALEXIOU *et al*., 2005). Entretanto, para estas aplicações biomédicas, as nanopartículas devem se manter estáveis em meio aquoso e em pH fisiológico.

Uma maneira de cumprir estes requisitos é a funcionalização da superfície das nanopartículas com moléculas que, além de permitirem a dispersão das nanopartículas em meio aquoso, podem ter afinidade com um determinado órgão ou tecido (GUPTA; WELLS, 2004). Assim, diferentes sistemas vêm sendo desenvolvidos, de forma que haja a união das propriedades magnéticas das nanopartículas, que facilitam a manipulação destas, com propriedades medicinais provindas de agentes terapêuticos (HANESSIAN *et al*., 2008; RUDGE *et al*., 2001). Para essa associação, Jain *et al*. (2005) sugerem que as nanopartículas devem ser funcionalizadas com bicamadas de tensoativo e o agente terapêutico seja incorporado nas bicamadas formadas.

Assim, unindo a necessidade de uma nova formulação para a curcumina em meio aquoso e a possibilidade de direcionamento das nanopartículas magnéticas funcionalizadas, propomos o desenvolvimento de uma estável formulação para a curcumina a partir da associação da curcumina nas bicamadas de ácido dodecanóico (ácido láurico) em nanopartículas de magnetita.

2 OBJETIVOS

2.1 Preparar sistemas coloidais aquosos de nanopartículas de magnetita funcionalizadas com bicamadas de ácido láurico e posterior adsorção de moléculas de curcumina nas bicamadas;

2.2 Caracterizar as nanopartículas puras e o sistema coloidal antes e após a adsorção da curcumina;

2.3 Construir a isoterma de adsorção da curcumina nas bicamadas;

2.4 Realizar o estudo da variação do potencial zeta das nanopartículas com o pH;

2.5 Realizar o estudo da estabilidade coloidal em meio de cultura enriquecido com diferentes proteínas.

3 METODOLOGIA

3.1 Preparação das nanopartículas de magnetita

As nanopartículas de magnetita foram sintetizadas misturando-se soluções aquosas de cloreto ferroso e férrico seguida da adição de amônia concentrada sob agitação vigorosa (KHALAFALLA; REIMERS, 1980). O precipitado negro de magnetita foi lavado várias vezes, sedimentado com o auxílio de um magneto e o sobrenadante foi retirado.

3.2 Caracterização das nanopartículas de magnetita

3.2.1 Estrutura cristalina e diâmetro médio estimado

A análise de difração de raios X (DRX) da magnetita foi realizada em um equipamento XRD 6000 (Shimadzu) equipado com um tubo de radiação Cu-Kα. Os dados foram obtidos em 2θ de 15° a 80°. Os dados obtidos foram refinados pelo software XRD 6000 - Basic Process e o parâmetro de rede das nanopartículas foi calculado com o software Unit Cell. O diâmetro médio do domínio nanocristalino foi estimado usando a fórmula de Debye-Scherrer.

3.2.2 Caracterização das nanopartículas puras por DRIFTS

As bandas devidas às absorções características de óxido de ferro foram observadas nos espectros obtidos por análises de espectroscopia vibracional na região do infravermelho em um espectrofotômetro FTIR Bomem. Os espectros foram obtidos utilizando-se a técnica de reflectância difusa (DRIFTS) e a região espectral variou de 4000 a 400 cm^{-1}.

3.2.3 Teores de Fe(II) e de Fe(III)

Para avaliar a composição das nanopartículas, foram determinados os teores de Fe(II) e de Fe(III). O método utilizado foi o da orto-fenantrolina (EATON *et al.*, 1995), cujas medidas de absorvância foram obtidas em um espectrofotômetro Biospectro SP-220.

3.3 Funcionalização das nanopartículas de magnetita com bicamadas de ácido láurico (MAGN-BLL)

Para a preparação das nanopartículas de magnetita funcionalizadas com bicamadas de ácido láurico, 2,5 g das nanopartículas de magnetita foram dispersas em água destilada a 70-75 °C. Ácido láurico foi adicionado e o pH foi ajustado para 8, sob agitação contínua por 10 minutos. A suspensão coloidal aquosa de nanopartículas foi dialisada contra água deionizada para remoção de laurato livre. A amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos para remover grandes aglomerados.

3.4 Caracterização das nanopartículas funcionalizadas por DRIFTS

Medidas de espectroscopia vibracional na região do infravermelho foram realizadas em um espectrofotômetro FTIR Bomem. Foram obtidos os espectros utilizando-se DRIFTS e a região espectral variou de 4000 a 400 cm^{-1}.

3.5 Preparação da formulação de curcumina (MAGN-BLL-CUR)

Um volume de uma solução de curcumina em DMSO foi adicionado em um volume de MAGN-BLL. A mistura permaneceu sob agitação por um período de aproximadamente 20 horas. Após a agitação, as nanopartículas que continham curcumina associada foram separadas do sobrenadante, que apresentava curcumina não associada, através de separação magnética com o auxílio de uma lã metálica e de um magneto. As nanopartículas foram lavadas uma vez e redispersas em água deionizada.

3.6 Caracterização da formulação de curcumina

3.6.1 Isoterma de adsorção da curcumina nas nanopartículas funcionalizadas com ácido láurico

Volumes variados de uma solução de curcumina em DMSO foram adicionados em volumes fixos de MAGN-BLL. As formulações com diferentes concentrações de curcumina permaneceram sob agitação por um período de aproximadamente 20 horas. Após este período, as nanopartículas carreadoras de curcumina foram separadas do sobrenadante, através de separação magnética. O sobrenadante retirado foi analisado por espectroscopia eletrônica e foi calculada a quantidade de curcumina associada nas bicamadas das nanopartículas.

3.6.2 Caracterização das nanopartículas funcionalizadas após a associação de curcumina por DRIFTS

A fim de observar as bandas referentes da curcumina associada às nanopartículas funcionalizadas, foram realizadas medidas de espectroscopia vibracional na região do infravermelho utilizando-se DRIFTS, em um espectrofotômetro FTIR Bomem. A região espectral variou de 4000 a 400 cm^{-1}.

3.6.3 Variação dos valores de potencial zeta com o pH

Foram medidos os valores de potencial zeta das nanopartículas funcionalizadas após a associação da curcumina em uma faixa de pH variando de 1 a 10. Os valores de potencial zeta foram calculados usando medidas de mobilidade eletroforética realizadas em um equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments).

3.6.4 Estabilidade coloidal em meio de cultura celular enriquecido com proteínas

Para avaliar o efeito da adição de proteína ao meio de cultura celular na estabilidade das nanopartículas da formulação, foram empregadas duas diferentes proteínas. Primeiramente, foi utilizado o meio de cultura enriquecido com soro fetal bovino (FBS), cuja adição variou de 5 a 20% (v/v) e medidas de diâmetro hidrodinâmico foram realizadas por um período de 72 horas. Ainda também foi estudada a estabilidade coloidal das nanopartículas em meio enriquecido com albumina de soro bovino (BSA) na faixa de concentração que variou de 5 a 20% (v/v) por um período de 72 horas.

As medidas de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas nos diferentes meios foram obtidas por medidas de espalhamento dinâmico de luz em um equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das nanopartículas de magnetita

Os picos de DRX, apresentados na Figura 1, indicam a formação de uma estrutura cristalina do tipo espinélio inverso, característica da magnetita (MILLAN *et*

al., 2007). O parâmetro de rede calculado para o óxido de ferro apresentou um valor de a = 8,373 Å, que se aproxima do valor encontrado na literatura para a magnetita: a = 8,375 Å (JCPDF 88-0315). O diâmetro médio estimado das partículas foi de 8 nm, calculado a partir da largura a meia altura do pico de difração (311) através da fórmula de Debye-Scherrer (CULLITY, 1978).

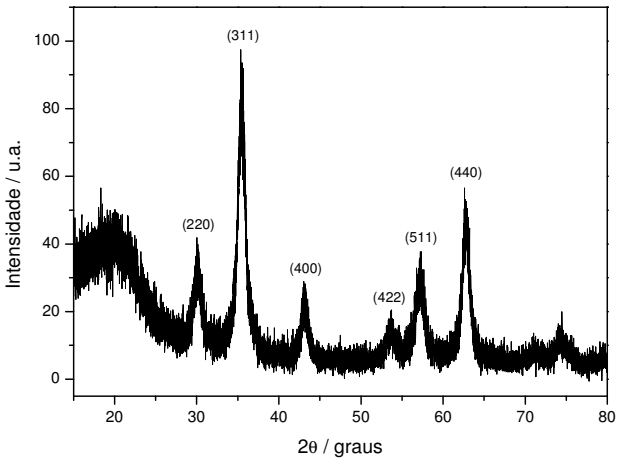


Figura 1. Difratograma de raios X das nanopartículas magnéticas.

No espectro obtido por DRIFTS das nanopartículas puras (Figura 2), observa-se a existência de bandas em 584 e em 451 cm^{-1}, referentes aos estiramentos das ligações Fe-O na rede cristalina do sólido (YU; ZHENG; YANG, 2000). Essas duas bandas são características da magnetita, sugerindo a formação do óxido de ferro de interesse.

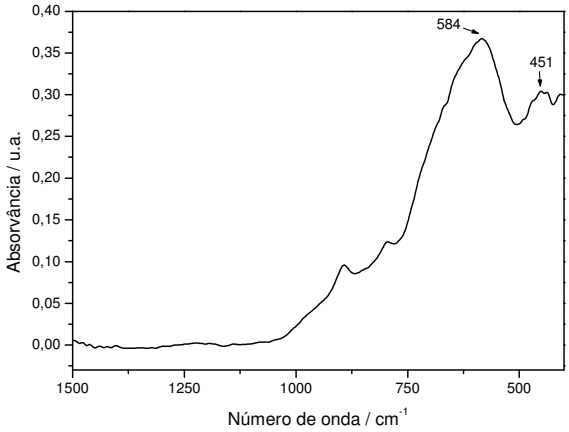


Figura 2. Espectro de DRIFTS das nanopartículas de magnetita.

Por outro lado, a determinação do teor de Fe(II) e de Fe(III) pelo método da orto-fenantrolina, apontou que a magnetita sofreu uma leve oxidação, originada de sua exposição ao ar atmosférico. Foi obtida uma relação Fe(II):Fe(III) em uma

proporção de 1:4, o que sugere a oxidação parcial da magnetita, uma vez que este óxido de ferro pode ser identificado pelo fato de apresentar Fe(II) e Fe(III) em sua estrutura na proporção 1:2 (CHAUDHURI; LACK; COATES, 2001).

4.2 Caracterização das nanopartículas funcionalizadas com bicamadas de ácido láurico

O espectro de DRIFTS das nanopartículas funcionalizadas com bicamadas de ácido láurico é mostrado na Figura 3, onde a funcionalização com laurato é sugerida pela presença das bandas em 2922 e em 2852 cm^{-1} atribuídas às vibrações de estiramento dos grupos $–CH_2–$ e em 1579 e em 1439 cm^{-1}, proveniente das vibrações assimétricas e simétricas de COO^-. A presença da banda em 1718 cm^{-1}, atribuída às absorções C=O de ácido láurico protonado, indica a presença de ácido láurico livre na suspensão coloidal (JAIN *et al.*, 2005). Ainda na Figura 3, é apresentado o espectro do ácido láurico puro para comparação.

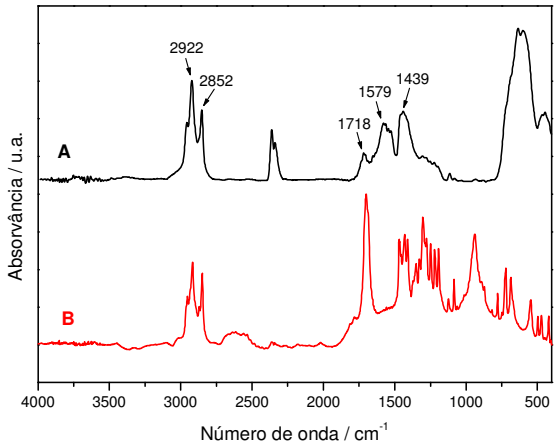


Figura 3. Espectros de DRIFTS: (A) nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com bicamadas de ácido láurico; (B) ácido láurico puro.

4.3 Caracterização da nova formulação de curcumina

Os experimentos realizados para a verificação da associação de curcumina nas bicamadas de ácido láurico das nanopartículas de magnetita foram realizados em uma faixa de concentração de curcumina adicionada que variava de 65,8 até 6578,4 µg/mg de ferro.

De acordo com a isoterma de adsorção apresentada na Figura 4, nota-se que ocorre a adsorção de curcumina nas bicamadas e que a eficiência de adsorção varia com a concentração utilizada. Abaixo de 1749,85 µg de curcumina adicionada/mg de

ferro obteve-se praticamente 100% de adsorção da curcumina; entretanto, nos valores de concentração acima de 1749,85 µg/mg de ferro foi observada uma diminuição gradual da eficiência de adsorção, chegando a uma eficiência de 37,2% no último ponto da curva.

Pelo comportamento da curva, a faixa de saturação da curcumina nas bicamadas estende-se de 3947,0 à 6578,4 µg de curcumina adicionada/mg de ferro, observando-se um valor constante de aproximadamente 2430,8 µg de curcumina adsorvida/mg de ferro. Devido à máxima adsorção de curcumina neste valor, a amostra cuja concentração era de 5262,7 µg de curcumina adicionada/mg de ferro, foi empregada para a realização da caracterização por DRIFTS e dos estudos de variação do potencial zeta em função do pH e de estabilidade coloidal.

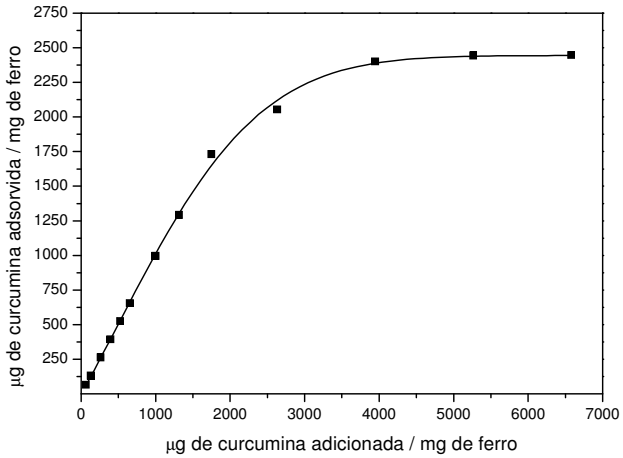


Figura 4. Isoterma de adsorção da curcumina.

Estudos *in vitro* fornecem importantes informações acerca dos efeitos tóxicos causados por agentes terapêuticos em uma determinada linhagem celular. A literatura relata que, em células de melanoma humano, a concentração inibitória (IC_{50}) da curcumina livre é de 10 µM, o que equivale a aproximadamente 3,68 µg de curcumina/mL (CARNEIRO, 2007). Este baixo valor de IC_{50} sugere uma potencial aplicação da curcumina no tratamento de tumores.

Agentes insolúveis em meio aquoso, de rápida degradação ou de baixa eficácia terapêutica, como a curcumina, são amplamente estudados no sentido de serem encapsulados ou associados a sistemas que permitam um aumento na eficácia terapêutica; diminuição significativa da toxicidade, devido ao possível uso de doses menores e; até o aumento de sua internalização celular.

Nesse sentido, como a relação 2430,8 µg de curcumina adsorvida/mg de ferro da formulação se mantém constante, independente de variações na concentração, poderia-se esperar do teste de citotoxicidade que, em uma determinada concentração, a quantidade de curcumina na formulação seria cerca de dez vezes maior que o valor de IC_{50} que apresenta quando livre. Por outro lado, a quantidade de ferro adicionada nesse caso seria razoável, visto que se encontraria em uma concentração muito abaixo do valor de IC_{50} (IC_{50} = 254 µg de ferro/mL) observado para um sistema semelhante à MAGN-BLL (FREITAS *et al.*, 2008). Essa comparação entre os valores de IC_{50} sugere que a formulação apresente maior citotoxicidade do que a curcumina livre, potencializando o efeito de morte em células tumorais.

Observando-se o espectro obtido por DRIFTS na Figura 5(A), nota-se a presença de bandas pertencentes à curcumina no espectro das nanopartículas funcionalizadas com bicamadas de ácido láurico após o fenômeno de adsorção. A presença de bandas em 1591 cm^{-1}, proveniente das vibrações de estiramento do anel benzênico; em 1510 cm^{-1}, atribuída às vibrações de estiramento das ligações C=O e C=C; em 1425 cm^{-1}, conferido às absorções C–H olefínico no plano; e em 1284 cm^{-1}, referente às vibrações de estiramento fenil–O (NI *et al.*, 2008), sugerem que de fato houve a associação de curcumina nas bicamadas de ácido láurico.

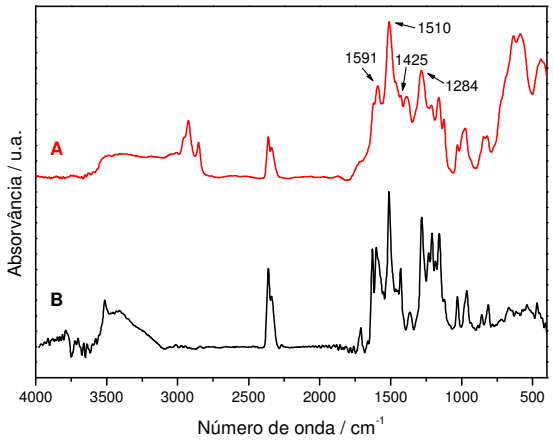


Figura 5. Espectros de DRIFTS: (A) nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com bicamadas de ácido láurico após associação de curcumina; (B) curcumina pura.

O valor do potencial zeta depende da carga superficial das partículas e do meio que as circundam. O conhecimento de seu valor e como varia é de interesse prático na estabilidade de suspensões coloidais, pois determina a interação entre as partículas (JIANG; OBERDÖRSTER; BISWAS, 2009).

O efeito do pH no potencial zeta das nanopartículas é apresentado na Figura 6, onde o gráfico mostra semelhança no comportamento das curvas de MAGN-BLL e de MAGN-BLL-CUR. Entretanto, MAGN-BLL-CUR apresentou valores de potencial zeta negativo de menor magnitude que MAGN-BLL até aproximadamente pH 3,1. Os valores de potencial zeta negativo das nanopartículas são provenientes dos grupos carboxilato do ácido láurico. À medida que o pH diminui, os grupos carboxilato são protonados, refletindo na diminuição da magnitude dos valores de potencial zeta negativo.

O potencial zeta de MAGN-BLL diminuiu em magnitude negativa à medida que o pH também diminuiu e seu ponto isoelétrico ocorreu em pH 2,7. MAGN-BLL-CUR apresentou o mesmo perfil da curva de MAGN-BLL, cujos valores de potencial zeta negativo diminuíram de magnitude à medida que o pH também diminuiu. Seu ponto isoelétrico ocorreu em pH 3,1.

Outro aspecto relevante observado nos perfis das curvas é o fato de que as nanopartículas apresentaram valores de potencial zeta que se manteram entre -32 e -39 mV em uma ampla faixa de pH (pH 6 a 10), inclusive em pH 7,4, exigido para aplicações biomédicas. Nessa faixa de pH ainda é observada a alta estabilidade coloidal que a formulação apresenta. Entre os valores de pH 6 e 10, nota-se a existência dos maiores valores de potencial zeta negativo, o que confere maior repulsão eletrostática entre as nanopartículas e impede a ocorrência do fenômeno de aglomeração destas (JIANG; OBERDÖRSTER; BISWAS, 2009).

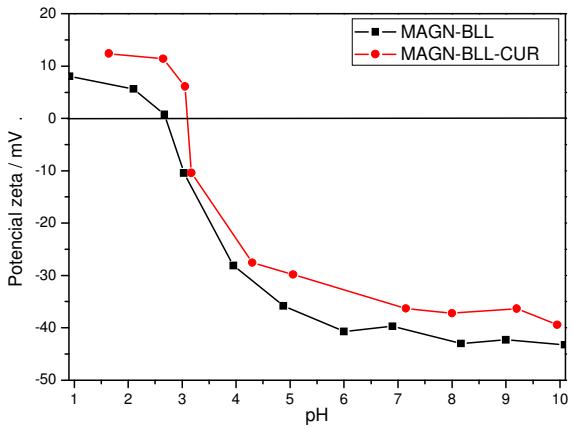


Figura 6. Curvas de potencial zeta em função do pH.

A estabilidade coloidal de uma formulação, constituída de nanopartículas funcionalizadas, em diferentes meios pode ser investigada por medidas de diâmetro hidrodinâmico (PETRI-FINK *et al.*; 2008). Em função da composição do meio em

estudo, a aglomeração das nanopartículas pode ocorrer de maneira irreversível, inviabilizando seu emprego em aplicações biomédicas.

Dessa forma, a estabilidade coloidal da formulação, em uma concentração de 100 mg de ferro/mL, foi avaliada em meio de cultura por um período de 72 horas, conforme apresentado na Figura 7. Antes de sua adição ao meio, as nanopartículas constituintes da formulação apresentaram um valor de diâmetro hidrodinâmico de 92,6 nm em meio aquoso. Quando adicionada ao meio de cultura, a estabilidade coloidal da formulação foi drasticamente alterada, apresentando o aumento significativo do diâmetro hidrodinâmico para 3520 nm e após 72 horas, para 5205 nm.

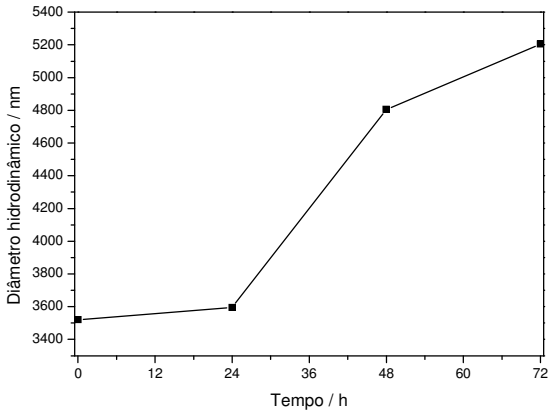


Figura 7. Curva de diâmetro hidrodinâmico em função do tempo para meio de cultura puro.

FBS ou BSA geralmente é adicionado ao meio de cultura para obter um ótimo crescimento celular. Além disso, seu efeito na estabilidade coloidal é relevante para a avaliação do potencial citotóxico de nanopartículas (ALLOUNI *et al.*, 2009). Assim, de acordo com os valores de diâmetro hidrodinâmico apresentados nas Figuras 8(A) e 8(B), observa-se que, em meio de cultura enriquecido com FBS e com BSA, a estabilidade coloidal da formulação aumentou quando comparada com a formulação em meio de cultura puro.

Na Figura 8(A), onde são apresentadas as curvas da formulação em meio de cultura com diferentes concentrações de FBS, nota-se que não há relação entre o aumento da concentração de FBS no meio e a diminuição dos valores de diâmetro hidrodinâmico, ao contrário do que é observado em outros sistemas (ALLOUNI *et al.*, 2009).

Nas menores concentrações de FBS no meio (0,5 e 1,0%), observou-se um aumento gradual do diâmetro hidrodinâmico com o tempo e obteve-se os maiores

valores de diâmetro hidrodinâmico dentre todas as amostras, que variaram entre 294 e 664 nm. Os valores de diâmetro hidrodinâmico das amostras com concentração de FBS entre 5,0 e 20,0% praticamente se mantiveram constantes, apresentando uma pequena variação de 33 nm.

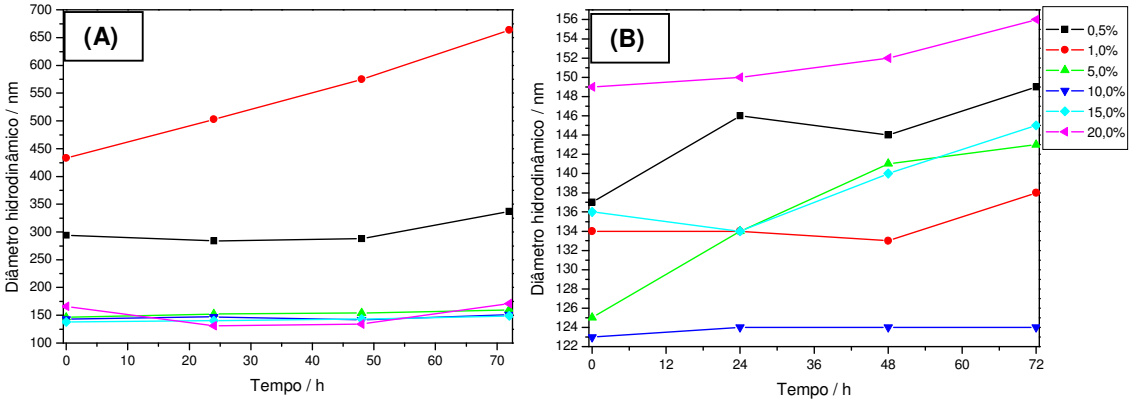


Figura 8. (A) Curvas de diâmetro hidrodinâmico em função do tempo para diferentes concentrações de FBS em meio de cultura. (B) Curvas de diâmetro hidrodinâmico em função do tempo para diferentes concentrações de BSA em meio de cultura.

Nas curvas da formulação em meio de cultura com diferentes concentrações de BSA, apresentadas na Figura 8(B), observa-se a não relação entre o aumento de concentração de BSA no meio e a diminuição dos valores de diâmetro hidrodinâmico. As amostras não apresentaram um aumento significativo nos valores de diâmetro hidrodinâmico com o tempo como observado para as amostras com FBS.

Por outro lado, os valores de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas em meio de cultura com BSA foram significativamente menores do que os valores encontrados para as nanopartículas em meio de cultura com FBS. Além disso, os valores de diâmetro hidrodinâmico tiveram uma menor variação para todas as concentrações quando comparados com os valores encontrados para as amostras com FBS. Enquanto que, para as amostras com FBS encontrou-se uma variação de 526 nm, para as amostras com BSA a variação foi de apenas 33 nm.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que foi possível realizar a adsorção de curcumina em bicamadas de ácido dodecanóico funcionalizado em

nanopartículas de magnetita, produzindo-se assim, uma nova formulação aquosa para a curcumina.

O estudo de variação do potencial zeta com o pH mostrou que MAGN-BLL e MAGN-BLL-CUR se comportaram de forma semelhante na faixa de pH estudada. Na faixa de pH 6 a 10, a formulação apresenta altos valores de potencial zeta negativo e alta estabilidade coloidal.

O estudo de estabilidade coloidal das nanopartículas que constituem a formulação apontou que os valores de diâmetro hidrodinâmico diminuem significativamente quando se adiciona FBS ou BSA no meio de cultura, refletindo na maior estabilidade das nanopartículas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXIOU, C.; ARNOLD, W.; HULIN, P.; KLEIN, R. J.; RENZ, H.; PARAK, F.G.; BERGEMANN, C.; LÜBBE, A. S. Magnetic mitoxantrone nanoparticle detection by histology, X-ray and MRI after magnetic tumor targeting. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 225, p. 187-193, 2001.

ALLOUNI, Z. E.; CIMPAN, M. R.; HØL, P. J.; SKODVN, T.; GJERDET, N. R. Agglomeration and sedimentation of TiO_2 nanoparticles in cell culture medium. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, p. 83-87, 2009.

BISHT, S.; FELDMANN, G.; SONI, S.; RAVI, R.; KARIKAR, C.; MAITRA, A.; MAITRA, A. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (“nanocurcumin“): a novel strategy for human cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 5, 2007.

CARNEIRO, M. L. B. **Alterações morfológicas e estruturais induzidas por um componente do açafrão, *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), em células de melanoma humano em cultura**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

CHAUDHURI, S. K.; LACK, J. G.; COATES, J. D. Biogenic magnetite formation through anaerobic biooxidation of Fe(II). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2844-2848, 2001.

CULLITY, B. D. **Elements of X-ray diffraction**. 2. ed. Canada: Addison-Wesley, 1978.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; FRANSON, M. A. H. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19. ed. Washington: APHA, 1995.

FREITAS, E. R. L.; SOARES, P. R. O.; SANTOS, R. P.; SANTOS, R. L.; SILVA, J. R.; PORFIRIO, E. P.; BÁO, S. N.; LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C.; GUILLO, L. A. *In vitro* biological activities of anionic γ-Fe_2O_3 nanoparticles on human melanoma cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, p. 1-7, 2008.

GUPTA, A. K.; WELLS, S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. **IEEE Transactions on Nanobioscience**, v. 3, n. 1, p. 66-73, 2004.

HANESSIAN, S.; GRZYB, J. A.; CENGELLI, F.; JUILLERAT-JEANNERET, L. Synthesis of chemically functionalized superparamagnetic nanoparticles as delivery vectors for chemotherapeutic drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 2921-2931, 2008.

ITO, A.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 1-11, 2005.

JAIN, T. K.; MORALES, M. A.; SAHOO, S. K.; LESLIE-PELECKY, D. L.; LABHASETWAR, V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. **Molecular Pharmaceutics**, v. 2, n. 3, p. 194-205, 2005.

JIANG, J.; OBERDÖRSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, p. 77-89, 2009.

KHALAFALLA, S. E.; REIMERS, G. W. Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. MAG-16, n. 2, p. 178-183, 1980.

KUO, M.; HUANG, T.; LIN, J. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1317, p. 95-100, 1996.

MAHESHWARI, R. K.; SINGH, A. K.; GADDIPATI, J.; SRIMAL, R. C. Multiple biological activities of curcumin: a short review. **Life Sciences**, v. 78, p. 2081-2087, 2006.

MAITI, K.; MUKHERJEE, K.; GANTAIT, A.; SAHA, B. P.; MUKHERJEE, P. K. Curcumin-phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 330, p. 155-163, 2007.

MILLAN, A.; PALACIO, F.; FALQUI, A.; SNOECK, E.; SERIN, V.; BHATTACHARJEE, A.; KSENOFONTOV, V.; GÜTLICH, P.; GILBERT, I. Maghemite polymer nanocomposites with modulated magnetic properties. **Acta Materialia**, v. 55, p. 2201-2209, 2007.

NI, Z.; XING, F.; WANG, P.; CAO, G. Synthesis, characterization and release of curcumin-intercalated Mg–Al-layered double hydroxides. **Applied Clay Science**, v. 40, p. 72-80, 2008.

PETRI-FINK, A.; STEITZ, B.; FINKA, A.; SALAKLANG, J.; HOFMANN, H. Effect of cell media on polymer coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPPIONs): colloidal stability, cytotoxicity, and cellular uptake studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 129-137, 2008.

PORTET, D.; DENIZOT, B.; RUMP, E.; LEJEUNE, J.; JALLET, P. Nonpolymeric coatings of iron oxide colloids for biological use as magnetic resonance imaging contrast agents. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 238, p. 37-42, 2001.

RUDGE, S.; PETERSON, C.; VESSELY, C.; KODA, J.; STEVENS, S.; CATTERALL, L. Adsorption and desorption of chemotherapeutic drugs from a magnetically targeted carrier (MTC). **Journal of Controlled Release**, v. 74, p. 335-340, 2001.

SANDUR, S. K.; ICHIKAWA, H.; PANDEY, M. K.; KUNNUMAKKARA, A. B.; SUNG, B.; SETHI, G.; AGGARWAL, B. B. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 568-580, 2007.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: the story so far. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1955-1968, 2005.

SINGH, R.; CHANDRA, R.; BOSE, M.; LUTHRA, P. M. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. **Current Science**, v. 83, n. 6, p. 737-740, 2002.

WANG, Z.; DESMOULIN, S.; BANERJEE, S.; KONG, D.; LI, Y.; DERANIYAGALA, R. L.; ABBRUZZESE, J.; SARKAR, F. H. Synergistic effects of multiple natural products in pancreatic cancer cells. **Life Sciences**, v. 83, p. 293-300, 2008.

WILHELM, C.; GAZEAU, F.; ROGER, J.; PONS, J. N.; BACRI, J. -C. Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: kinetic analyses of membrane adsorption and subsequent internalization. **Langmuir**, v. 18, p. 8148-8155, 2002.

YU, L. Q.; ZHENG, L. J.; YANG, J. X. Study of preparation and properties on magnetization and stability for ferromagnetic fluids. **Materials Chemistry and Physics**, v. 66, p. 6-9, 2000.

Estudo da presença de mastócitos e vasos sanguíneos em polpas humanas inflamadas de dentes permanentes

Monique Gonzaga Silva Valente; Fernanda Freire Maia; Ana Helena Gonçalves de Alencar; Carlos Estrela; Kely Firmino Bruno; Aline Carvalho Batista.
Faculdade de Odontologia/UFG
E-mail: moniquegonzaga@hotmail.com; drkelybruno@bol.com.br.

Palavras-chave: mastócitos; vasos sanguíneos, polpas humanas, inflamação.

Introdução:

A polpa dentária constitui de um tecido conjuntivo frouxo especializado, de origem mesenquimática, circundado por paredes de dentina, que ocupa a câmara pulpar e o canal radicular (Costa et al., 2009). Abriga células inflamatórias e imunológicas, responsáveis pelos mecanismos de defesa desse tecido contra proteínas estranhas ou antigênicas (Jontell et al., 1998; Bergenholtz, 1990), porém sua característica anatômica coloca em situação delicada sua capacidade de reagir à estímulos nocivos (Costa et al., 2009).

A cárie dentária tem sido descrita como o fator etiológico mais freqüente de alteração pulpar, capaz de desencadear na polpa, reações inflamatórias e imunológicas em resposta à penetração de produtos do metabolismo microbiano (Bergenholtz, 1981, 1990; Izumi et al., 1995; Okiji et al., 1997). A resposta inicial protetora pulpar envolve a esclerose dos túbulos dentinários e o depósito de dentina terciária pelos odontoblastos (Ten Cate, 2001; Avery, 2001). Caso a agressão persista, havendo a entrada de bactérias cariogênicas ou de seus produtos tóxicos na polpa, ocorrerá uma resposta imunológica inata (resposta inflamatória) seguida por uma resposta imunológica adaptativa (resposta imunológica) (Abbas et al. 2003; Jontell et al., 1998; Freitas et al., 2007).

A resposta inflamatória consiste em um mecanismo de defesa inespecífico, imediato, que envolve fenômenos vásculo-exsudativos, com vasodilatação e aumento da permeabilidade, e proliferativos, com infiltração e proliferação de células inflamatórias, dentre elas, mastócitos, macrófagos e neutrófilos (Abbas et al., 2003;

Izumi et al., 1995; Bergenholtz, 1990). Os mastócitos são células residentes no tecido conjuntivo, localizados principalmente próximos de vasos sangüíneos e feixes nervosos, e apresentam grânulos citoplasmáticos contendo várias substâncias biologicamente ativas (Holzer, 1988; Jontell et al., 1998; Freitas et al., 2007; Rodini et al., 2004). A expressão de proteases séricas (triptase e chimase) serve para determinar o fenótipo celular dessas células em diferentes compartimentos teciduais (Irani et al., 1986; Kaminer et al., 1991). Assim, os mastócitos mucosais apresentam triptase em seus grânulos, ao passo que os mastócitos de tecido conjuntivo apresentam tanto a triptase quanto a chimase. Esses últimos constituem os tipos predominantes presentes na mucosa bucal e polpa dentária (Walsh et al., 1995).

Os mastócitos desempenham uma diversidade de funções, na degradação da matriz extracelular, na modulação das respostas inflamatória e imunológica e na angiogênese (Walsh, 2003). Esta é muito importante nos processos de inflamação e reparo, em que a proteína de membrana CD-31 representa um eficiente marcador de células endoteliais, especialmente em capilares neoformados de pequeno calibre (Woodfin et al., 2007).

Embora os mastócitos estejam presentes em todos os tecidos conjuntivos do organismo, inclusive da cavidade bucal (Farnoush, 1984; Walsh et al., 1995), alguns trabalhos relataram a ausência dessas células em polpas normais e inflamadas (Freitas et al., 2007). Fato este, que tem gerado questionamentos no âmbito científico e salientado a necessidade de novos estudos para elucidação do real papel dos mesmos na resposta inflamatória pulpar.

Objetivos:

O presente estudo tem por objetivos identificar, quantificar e avaliar a presença de mastócitos triptase$^+$ e vasos sangüíneos CD31$^+$ em polpas dentárias inflamadas; e analisar a possível associação dos mastócitos na formação desses vasos sangüíneos.

Metodologia:

Amostras

Para o presente estudo foram selecionadas 38 amostras de polpas de dentes permanentes com diagnóstico clínico de inflamação pulpar, provenientes das Disciplinas de Endodontia e Urgência da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, (Goiânia – Brasil) com aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da referida Instituição. Em um dado momento do planejamento do projeto, almejava-se incluir no estudo amostras de polpas normais, mas durante a execução percebeu-se a necessidade de diferenciação do tratamento desses tecidos, que não se fixavam em lâminas silanizadas segundo protocolo utilizado no Laboratório de Patologia da FO/UFG, inviabilizando o estudo com tais.

A média de idade dos pacientes foi de 24 anos. Os dados clínicos utilizados para realização do diagnóstico de inflamação pulpar foram: presença de sintomatologia; resposta ao teste de vitalidade pulpar; características biofísicas dos dentes (sinais que denotam a cavidade – aberta, exposição pulpar; fechada, ausência de exposição pulpar, coroa – íntegra, cariada, fraturada ou restaurada). Todos os dentes (*n=38*) selecionados apresentaram sintomatologia dolorosa, resposta positiva ao teste de vitalidade pulpar à frio, cavidade fechada e presença de cárie profunda, sendo 19 dentes anteriores superiores e 19 molares superiores, cujas polpas foram removidas de suas raízes palatinas.

Uma vez realizado o diagnóstico clínico da condição pulpar, os dentes foram indicados para tratamento do canal radicular. Sendo assim, o primeiro passo foi pulpectomia que seguiu o seguinte protocolo: anestesia, isolamento absoluto e anti-sepsia do campo operatório com solução de hipoclorito de sódio a 1%. Realizou-se a abertura coronária com broca esférica, de tamanho compatível com a câmara pulpar, em alta rotação sob refrigeração. Após a odontometria, o comprimento de trabalho foi definido na radiografia periapical em 1 mm aquém do ápice. Foi introduzida uma lima do tipo K-file (#10 / #15) de pequeno diâmetro entre a parede do canal radicular e a polpa dentária com o objetivo de abrir espaço e liberar o tecido e, em seguida, a polpa foi excisada cuidadosamente com lima do tipo Hedströem (Maillefer, Suíça). O tecido pulpar removido foi imerso em recipiente contendo formol a 10% tamponado, para posterior processamento e análise microscópica no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás.

Microscopia óptica

Todas as amostras foram fixadas em formol a 10% tamponado (pH 7.4) e incluídas em blocos de parafina. As características microscópicas foram avaliadas pela análise de um corte de 5 μm de cada amostra, rotineiramente corados com hematoxilina e eosina. Características microscópicas tais como intensidade de infiltrado inflamatório, colagenização, presença de calcificação e necrose foram analisados.

A intensidade de infiltrado inflamatório associado (ausente, leve, moderado ou intenso) foi determinada nas amostras de polpas dentárias. Foram analisados 10 campos representativos com microscopia de alta potência (x40) utilizando um retículo de integração e os espécimes mostraram: ausência de inflamação - quando a maioria dos campos (> 7) não apresentou células inflamatórias, leve inflamação - quando a maioria dos campos (> 7) demonstrou menos que 35% do espaço do retículo de integração preenchido por células inflamatórias; moderada inflamação - quando a maioria dos campos (> 7) demonstrou de 30-70% do espaço do retículo de integração preenchido por células inflamatórias e intensa inflamação - quando a maioria dos campos (> 7) demonstrou mais que 70% do espaço do retículo de integração preenchido por células inflamatórias.

A colagenização também foi caracterizada em ausente, leve, moderada e intensa, levando em consideração os mesmos critérios adotados para infiltrado inflamatório, só que tendo em vista o espaço preenchido no retículo de integração por fibras colágenas.

Imunoistoquímica

Cortes de 3 μm dos blocos incluídos em parafina rotineiramente processados foram desparafinados e desidatrados. Os cortes desparafinados foram submetidos à recuperação antigência (Tabela 1). A peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação com peróxido de hidrogênio a 3% e metanol (1:1). Mastócitos e vasos sanguíneos foram identificados pelo uso de anticorpos anti-triptase e anti-CD31, respectivamente (Tabela 1). As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários indicados na tabela 1 por 18 horas a 4ºC. Após lavagem com TBS, as lâminas foram tratadas com o sistema LSAB®+system, HRP Peroxidase Kit

(Dako, Carpinteria, CA, USA). Os cortes foram depois incubados em 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (Dako) por um período de 2 a 5 minutos. Finalmente, os cortes foram corados com hematoxilina de Mayer e cobertos com lamínula de vidro. Controles negativos foram obtidos pela ausência de anticorpos primários, os quais foram substituídos por PBS-BSA a 1% e por soro não imune de coelho (X0902, Dako) ou rato (X501-1, Dako). Controles positivos foram utilizados para verificar o protocolo seguido em cada reação e para averiguar o poder de efetividade do marcador. Para os mastócitos triptase$^+$ foram utilizados controles positivos de granuloma periapical e para vasos sanguíneos CD31$^+$ foram utilizados controles positivos de hemangioma.

Tabela 1. Anticorpos e protocolo para reação de imunoistoquímica

Anticorpo	**Diluição**	**Exposição Antigênica**	**Anticorpo secundário**
Anti-Tryptase[1] (AA1)	1:2000	Sem exposição	Kit-LSAB[1]
Anti-CD31[2] (1A10)	1:200	Tampão Citrato (pH=6.0 por 30 minutos a 95ºC)	Kit-Novolink[2]

[1] Fonte: Dako (Carpinteria, CA, USA); [2] Novocastra (New Castle, UK)

Análise quantitativa e qualitativa

O número de mastócitos triptase$^+$ foi determinado separadamente em polpas dentárias humanas usando um retículo de integração (CARL ZEISS-4740680000000-Netzmikrometer, 12.5x). Os vasos sanguíneos CD31$^+$ que mostraram lúmen vascular foram considerados, mesmo com lúmens vasculares muito pequenos (microvasos). Os mastócitos e vasos sanguíneos foram enumerados em 5-10 representativos e consecutivos campos com microscopia de alta potência (x40) e, com esse aumento, cada campo (retículo de integração) tinha uma área de 0.0961 mm². Análises descritivas foram expressas como média positiva e negativa e desvio padrão (DP) de *n* observações, por mm². Análises comparativas

dos mastócitos triptase$^+$ e dos vasos sanguíneos CD31$^+$ foram realizadas usando o teste de Wilcoxon e análises comparativas entre grupos independentes foram realizadas usando o teste de Mann-Whitney. Com o objetivo de verificar uma possível correlação entre as variáveis envolvidas (mastócitos triptase$^+$ e vasos sanguíneos CD31$^+$) foi aplicado o teste de correlação de Spearman. O valor de p menor do que 0.05 foi considerado estatisticamente significante.

Resultados:

A caracterização microscópica das amostras permitiu distinguir dois padrões de respostas distintos: polpas com moderado a intenso infiltrado inflamatório e levemente colagenizadas (Grupo 1) (Fig. 1A-C) e polpas com escasso infiltrado inflamatório e moderada a intensa colagenização (Grupo 2) (Fig. 1D-F). A maioria das amostras de pulpite mostrou calcificação (Fig.1C,F) e todos os casos mostraram vasos sanguíneos preservados (Fig. 1B,E).

Embora observados microscopicamente dois padrões de pulpites dentárias, a distribuição das características clínicas no Grupo 1 foram similares às do Grupo 2, não havendo diferenças entre os mesmos clinicamente.

Os mastócitos (Fig. 2) estiveram presentes em poucas amostras (23,6%), em pequena densidade (média de 6,6 células por mm^2) e igualmente distribuídos nos Grupos 1 e 2. Em relação a densidade de vasos sanguíneos CD31$^+$ (Fig. 3), o Grupo 1 mostrou vascularização significantemente maior que o Grupo 2 (Mann-Whitney, p=0,002), mas nenhuma correlação foi encontrada quando comparou-se a densidade de vasos sanguíneos com a de mastócitos (teste de correlação de Spearman, $p > 0,05$).

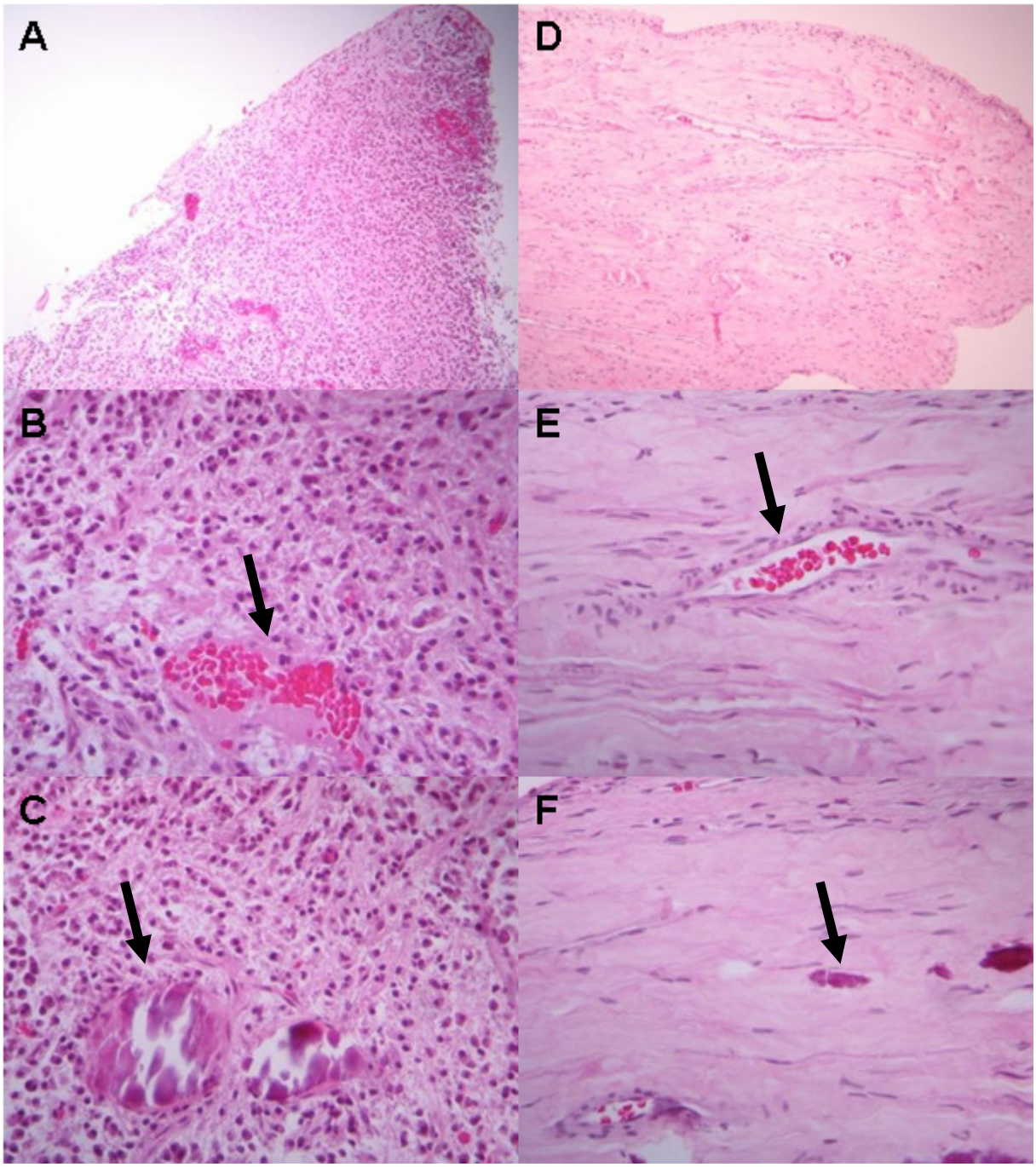


Fig.1. Polpa dentária com moderado a intenso infiltrado inflamatório e levemente colagenizada (A-C) e polpa dentária com escasso infiltrado inflamatório e intensa colagenização (D-F). Presença de vasos sanguíneos preservados (B e E - seta) e calcificações (C e F - seta). H.E. A,D, x 10; B,C,E,F, x 40.

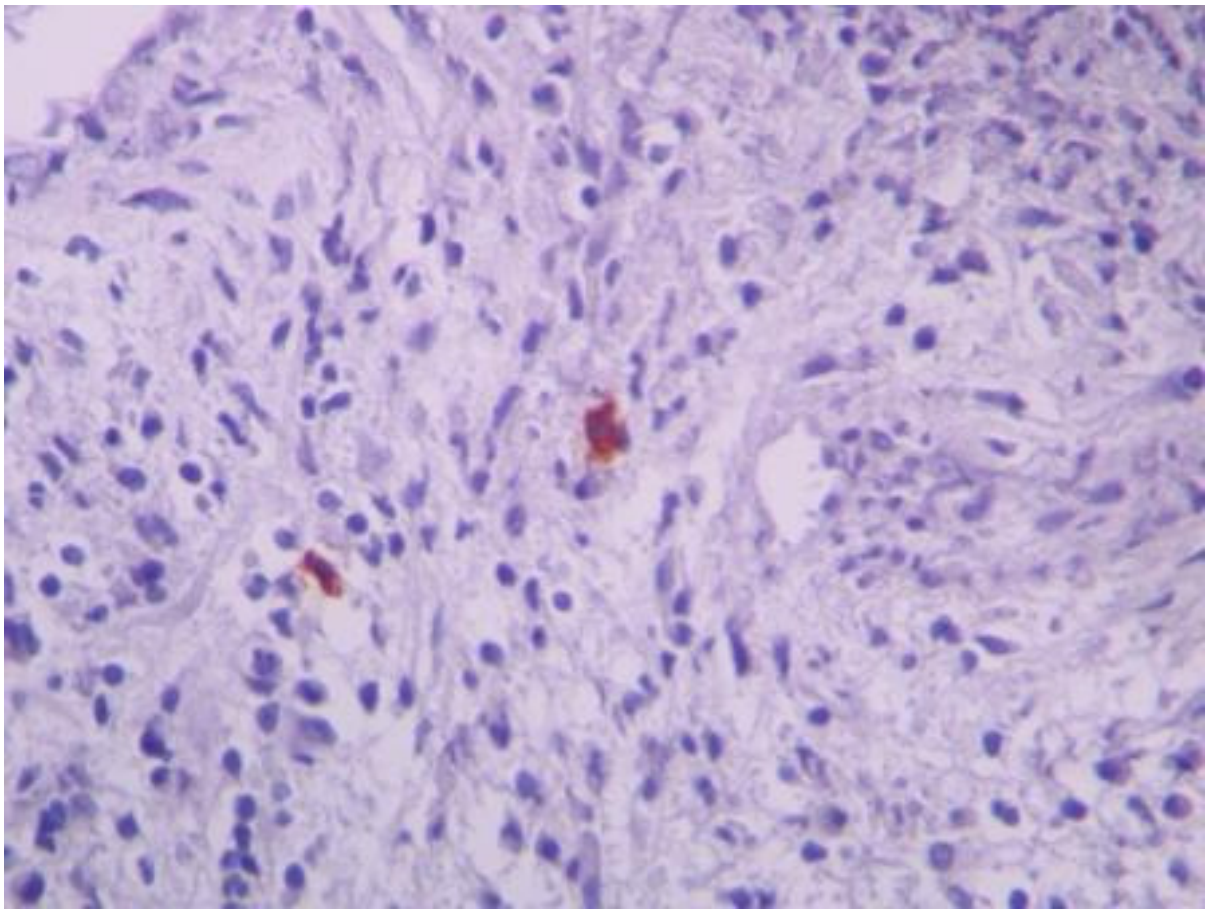


Fig.2. Mastócitos triptase^{+} distribuídos nas polpas inflamadas. Coloração em imunoistoquímica, x 40.

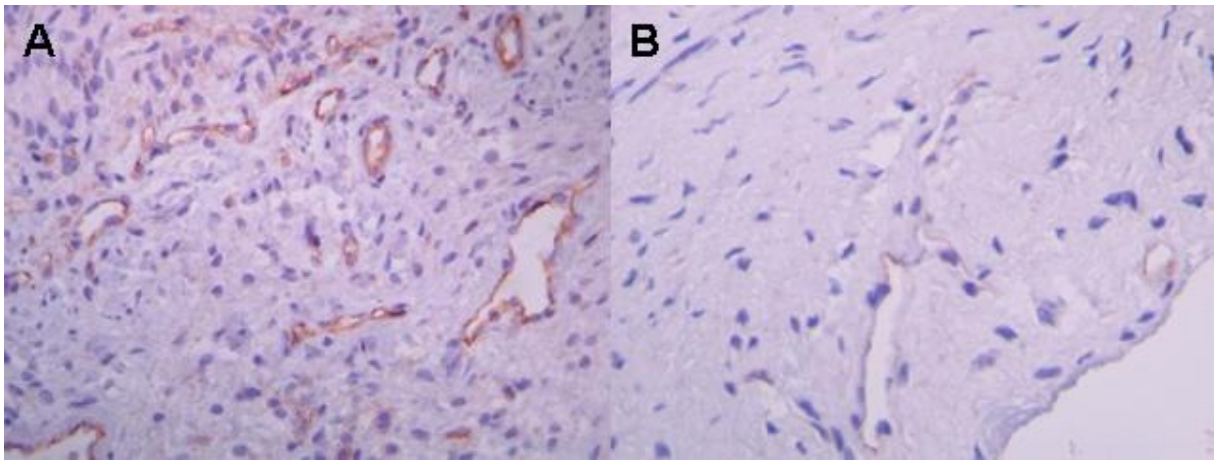


Fig.3. Vasos sanguíneos CD31^{+} distribuídos em polpa com moderado a intenso infiltrado inflamatório e levemente colagenizada (A) e em polpa dentária com escasso infiltrado inflamatório e intensa colagenização (B). Coloração em imunoistoquímica, A, B, x 40.

Discussão:

A caracterização microscópica das pulpites dentárias permitiu distinguir padrões distintos de respostas inflamatórias (moderado a intenso infiltrado inflamatório e levemente colagenizadas, e escasso infiltrado inflamatório e moderada a intensa colagenização), aspecto pouco salientado na literatura.

Apesar da observação microscópica de dois padrões de respostas distintos, estes não foram confirmados clinicamente, denotando a falta de correlação entre os eventos clínicos e histopatológicos, concordante com trabalhos prévios (Seltzer et al., 1963; Närhi, 2003). A correlação entre os sintomas e as alterações histopatológicas em pulpites dentárias é pobre e a determinação do tipo e extensão das alterações inflamatórias com base na sintomatologia é imprecisa (Närhi, 2003).

Há poucos trabalhos na literatura que discutiram o papel dos mastócitos nas pulpites dentárias (Farnoush, 1984; Zachrisson, 1971), especialmente relacionados à angiogênese. Os mastócitos desempenham uma diversidade de funções, na degradação da matriz extracelular, na modulação da resposta inflamatória imunológica e na angiogênese, que ocorre devido sua habilidade de liberar produtos específicos tais como quimases, fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator transformador do crescimento (TGF-ß), triptase, heparina, histamina, fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), várias interleucinas (IL-3, -4, -5, -6, -8, -10, -13 e –16), quimiocinas (MCP-1/CCL2, MIP-1alfa/CCL3, MIP-1beta e RANTES/CCL5) e mediadores lipídicos (Walsh, 2003).

A presença de mastócitos em polpas inflamadas, especialmente na fase crônica da inflamação, foi encontrada em elevada freqüência em alguns trabalhos (Farnoush 1984; Walsh et al. 1995), o que não foi verificado no presente estudo, em que se encontrou mastócitos presentes em poucas amostras (23,6%), em pequena densidade (média de 6,6 células por mm^2) e igualmente distribuídos nos Grupos 1 e 2.

Freitas et al. (2007) avaliaram por meio de análise de imunoistoquímica, a presença de mastócitos em polpas de dentes humanos nas seguintes situações clínicas: dentes não irrompidos, parcialmente irrompidos e sem cárie dentária, irrompidos com cárie rasa de dentina e dentes com pólipo pulpar. Verificaram que os mastócitos estavam presentes apenas nos pólipos pulpares, o que provavelmente

denota a não contribuição dessas células na resposta inflamatória inicial das patologias pulpares.

A ausência de mastócitos em polpas normais também foi verificada em trabalhos prévios (Dockrill, 1961; Photo & Antila, 1970; Zachrisson, 1971; Skogedal, 1973) bem como a presença desses em polpas inflamadas (Zachrisson, 1971; Skogedal, 1973; Farnoush, 1984; Walsh et al., 1995). Já em estudo de revisão, Hahn & Liewehr (2007) abordaram a presença dessa célula nas duas condições acima citadas.

Esta supressão do mastócito verificada no presente estudo poderia indicar um mecanismo de defesa pulpar deficiente, uma vez que essa célula imunorregulatória libera aminas vasoativas, enzimas e citocinas, como a IL-1 e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), responsáveis pela indução da E-selectina. Essa substância é necessária para rápida adesão de neutrófilos, linfócitos T, monócitos e outros leucócitos às células endoteliais, modulando as respostas inflamatória e imunológica pulpar (Walsh, 2003). Em contrapartida, a ausência de mastócitos poderia ser interpretada como uma forma de modulação da resposta inflamatória, minimizando o aumento da pressão tecidual e evitando a necrose do tecido, já que esse aumento da pressão causada pelo processo inflamatório pode comprimir os vasos sanguíneos levando à isquemia e necrose (Heyeraas & Berggreen, 1999).

Todas as amostras apresentaram vasos sanguíneos preservados, sendo maior a densidade de $CD31^{+}$ no Grupo 1. Embora observados vasos sanguíneos em maior densidade no Grupo 1, clinicamente isso não foi pode ser correlacionado, denotando a ausência de correlação na diferença de vascularização dos grupos com os achados clínicos. Esses resultados estão de acordo com trabalhos prévios (Seltzer et al., 1963; Närhi, 2003).

Como a presença de mastócitos nas pulpites dentárias do presente estudo foi considerada pequena e em baixa densidade, não foi possível correlacionar o número de mastócitos com a formação de vasos sanguíneos, uma vez que esses aumentaram independentemente da população de mastócitos. A partir do exposto, surge o questionamento de qual seria a célula indutora da angiogênese, sugerindo os macrófagos, células importantes na homeostasia tecidual e reparo do tecido após inflamação, por estimular a revascularização pela liberação do fator de crescimento

endotelial vascular (VEGF) (Polverini, 1995; Hanh & Liewehr, 2007), um potente indutor de angiogênese e permeabilidade vascular (Hanh & Liewehr, 2007).

Conclusão:

A presença de mastócitos foi observada em pequeno número e em baixa densidade. Pode-se observar ausência de correlação das alterações histopatológicas com as características clínicas, especialmente quando avaliada a sintomatologia. Além disso, não foi possível correlacionar o aumento da vascularização com o número de mastócitos.

Referências bibliográficas:

Costa CAS, Figueiredo JAP, Hebling J, Estrela C. Endodontic Science. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas; 2009.

Jontell M, et al. Immune defense mechanisms of the dental pulp. **Crit Rev Oral Bio Med**. 1998; 9:179-200.

Bergenholtz G. Pathogenic mechanisms in pulpal disease. **J Endod**. 1990;16:98-101.

Bergenholtz G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. **J Endod**. 1981;7:100-04.

Izumi et al. Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth. **Arch Oral Biol**. 1995;40:609-614.

Okiji T, et al. Structural and functional association between substance P and calcitonin gene-related peptideimmunoreactive nerves and accessory cells in the rat dental pulp. **Dent Res**. 1997;76:1818-1826.

Ten Cate AR. Complexo dentina-polpa. In: Ten Cate, A. R. **Histologia Bucal**. 5 a ed. Tradutor. Moleri, A. B. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.143-185, 2001.

Avery J. Polpa dentária. In: AVERY, J. **Fundamentos de histologia e embriologia bucal**. 2nd. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, .p.98-113, 2001

Abbas AK, Lichtiman AH, Pober JS. Immunity to tumors. In: **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia:Saunders, 2003; 382-405.

Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. Crit Rev Oral Bio Med 1998;2:179-200.

Freitas P et al. Mast cells and lymphocyte subsets in pulps from healthy and carious human teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 2007;5:96-101.

Holzer P. Local effector function of capsain-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**. 1988;24:739-68.

Rodini CO, Batista AC, Lara VS. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in the course of human periapical lesions**. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2004;97:59-63.

Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1986 Jun;83(12):4464-8.

Kaminer MS, Lavker RM, Walsh LJ, Whitaker D, Zweiman B, Murphy GF. Extracellular localization of human connective tissue mast cell granule contents. **J Invest Dermatol.** 1991 Jun;96(6):857-63.

Walsh LJ, Davis MF, Savage NW. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. **J Oral Pathol Méd**. 1995;24:266-72.

Walsh LJ. Mast cells and oral inflammation. **Crit Rev Oral Biol Med**. 2003;14:188-98.

Woodfin A, et al. PECAM-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2007;12:2514-23.

Farnoush A. Mast cells in human dental pulp. **J Endod** 1984;10:250-52.

Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. The dynamics of pulp inflammation: correlation between diagnosis data and actual histologic findings in the pulp. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1963;16:846-71.

Närhi MVO. Dentinal and pulpalpain. In: Bergenholtz G, Hørsted-Bindslev P, Reit C. Textbook of Endodontology. Oxford: Blackwell, 2003. p.43-56.

Zachrisson BU. Mast cells in human dental pulp. **Arch Oral Biol.** 1971;16:555-556.

Dockrill TE. Tissue mast cells in the oral cavity. **Aust Dent J.** 1961;6:210-214.

Photo P, Antila R. Assay of histamine in dental pulps. **Acta Odontol Scand.** 1970;28:691-699.

Skogedal O. Intracellular complex carbohydrates in the normal and inflamed dental pulp. **Scand J Dent Res.** 1973;81:558-562.

Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptative immune responses of the dental pulp. **J Endod**. 2007;33:773-81.

Heyeraas KJ, Berggreen E. Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp. **Crit Rev Oral Biol Med**. 1999; 10(3):328-36.

Nakanish T, Takahashi K, Hosokawa Y, Adachi T, Nakae H, Matsuo T. Expression of macrophage inflammatory protein 3aplha in human inflamed dental pulp tissue. **J Endod**. 2005; 31:84-7.

Brody AR et al. Interstitial pulmonary macrophages produce platelet- derived growth factor that stimulates rat lung fibroblast proliferation in vitro. **J Leukocyte Biol**. 1992;51:640-48.

Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. **Crit Rev Oral Biol**. 1995;6:230-247.

Estudo da presença de células $CD4^+$ e $CD45RO^+$ em pulpites dentárias humanas

Fernanda Freire Maia[1], Monique Gonzaga Silva Valente[1], Kely Firmino Bruno[1], Aline de Carvalho Batista[1], Carlos Estrela[1]*

[1] *Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás. Goiânia-GO, Brasil.*

e-mail: nandafmaia@hotmail.com; drkelybruno@bol.com.br.

Palavras chave: $CD4^+$, $CD45RO^+$, resposta imunológica, polpa dentária humana

INTRODUÇÃO

A polpa dentária constitui-se em um tecido conjuntivo frouxo especializado, de origem mesenquimática, composto de substância intersticial amorfa (proteoglicanas e glicoproteínas), substância intersticial fibrosa (fibras colágenas), células progenitoras, células de defesa e um rico suprimento neuro-vascular (COSTA *et al*., 2009). Dentre suas inúmeras funções, destaca-se a capacidade defensiva frente à agentes agressores (AVERY, 2001; TEN CATE, 2001; COSTA *et al*., 2009).

A cárie dentária tem sido descrita como o agente agressor mais comumente associado às doenças pulpares, devido a liberação de produtos do metabolismo microbiano na polpa, capazes de gerar respostas inflamatória e imunológica (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; JONTELL *et al*., 1998; FREITAS *et al*., 2007).

A resposta inflamatória é um mecanismo de defesa imediato e inespecífico, que gera fenômenos vásculo-exsudativos e proliferativos, com intuito de destruir o agente agressor (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; BERGENHOLTZ, 1990). Caso o mesmo não seja combatido, uma resposta imunológica pode ser desencadeada como um mecanismo de defesa mais específico, caracterizado pelo processamento, apresentação e reconhecimento antigênicos. (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; FREITAS *et al*., 2007; RODD, 2006; YU, 2007; IZUMI *et al*., 1995).

Na polpa dentária, essa resposta imunológica se inicia por meio das células apresentadoras de antígenos (APCs), normalmente células dendríticas (CDs) e

macrófagos, que expressam na sua superfície, proteínas ou peptídeos antigênicos acoplados a moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe II (MHC classe II). Esses peptídeos devem ser apresentados para linfócitos T antígeno-específicos (linfócitos T helper virgens), uma vez que os mesmos não reconhecem antígenos na forma livre ou solúvel, mas somente porções protéicas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; JONTELL *et al*., 1998).

Realizada a apresentação antigênica, os linfócitos-T helper ativados ($CD4^+$) se multiplicam clonalmente, se diferenciam em células T de memória ($CD45RO^+$) (JONTELL *et al*., 1998) e migram para o tecido pulpar através da circulação sanguínea ou linfática. A partir daí, APCs nativas passam a fagocitar e apresentar os antígenos diretamente às células T ($CD4^+$/ $CD45RO^+$), as quais estão localmente ativadas e desencadeiam a fase efetiva da resposta imunológica. De acordo com a produção de citocinas, as células T $CD4^+$/ $CD45RO^+$ estimulam tanto a ativação de macrófagos, de outras células T ($CD4^+$) e linfócitos T citolíticos ($CD8^+$) bem como a proliferação e diferenciação de linfócitos B ($CD20^+$).

Alguns estudos demonstraram que durante o processo carioso, os linfócitos B aparecem mais tardiamente do que os linfócitos T no sítio da agressão (SPEER *et al*., 1977; MASSLER, 1967; TORNECK, 1974, 1977), sugerindo o importante papel desses últimos no início da resposta imunológica pulpar (JONTELL *et al*., 1998; IZUMI *et al*., 1995). Todavia, embora esse mecanismo já tenha sido previamente descrito, a presença efetiva das células imunológicas com seus respectivos padrões de resposta permanecem indefinidos nas diferentes alterações pulpares.

OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivos identificar, quantificar e avaliar a presença das células $CD4^+$ e $CD45RO^+$ em pulpites dentárias humanas.

METODOLOGIA

Amostras

Para o presente estudo foram selecionadas 38 amostras de polpas de dentes permanentes com diagnóstico clínico de inflamação pulpar, provenientes das Disciplinas de Endodontia e Urgência da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, (Goiânia – Brasil) com aprovação pelo Comitê de Ética (número 102/207) em Pesquisa da referida Instituição. De acordo com o planejamento do atual projeto, esperava-se incluir no estudo amostras de polpas normais, porém durante a execução deste, percebeu-se a necessidade de diferenciação do tratamento desses tecidos, que não se fixavam em lâminas silanizadas segundo protocolo utilizado no Laboratório de Patologia da FO/UFG, inviabilizando o estudo com tais.

A média de idade dos pacientes foi de 24 anos. Os dados clínicos utilizados para realização do diagnóstico de inflamação pulpar foram: presença de sintomatologia; resposta ao teste de vitalidade pulpar; características biofísicas dos dentes (sinais que denotam a cavidade – aberta, exposição pulpar; fechada, ausência de exposição pulpar, coroa – íntegra, cariada, fraturada ou restaurada). Todos os dentes (*n=38*) selecionados apresentaram sintomatologia dolorosa, resposta positiva ao teste de vitalidade pulpar à frio, cavidade fechada e presença de cárie profunda, sendo 19 dentes anteriores superiores e 19 molares superiores, cujas polpas foram removidas de suas raízes palatinas.

Uma vez realizado o diagnóstico clínico da condição pulpar, os dentes foram indicados para tratamento do canal radicular. Sendo assim, o primeiro passo foi pulpectomia que seguiu o seguinte protocolo: anestesia, isolamento absoluto e anti-sepsia do campo operatório com solução de hipoclorito de sódio a 1%. Realizou-se a abertura coronária com broca esférica, de tamanho compatível com a câmara pulpar, em alta rotação sob refrigeração. Após a odontometria, o comprimento de trabalho foi definido na radiografia periapical em 1 mm aquém do ápice. Foi introduzida uma lima do tipo K-file (#10 / #15) de pequeno diâmetro entre a parede do canal radicular e a polpa dentária com o objetivo de abrir espaço e liberar o tecido e, em seguida, a polpa foi excisada cuidadosamente com lima do tipo Hedströem (Maillefer, Suíça). O tecido pulpar removido foi imerso em recipiente contendo formol

a 10% tamponado, para posterior processamento e análise microscópica no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás.

Microscopia óptica

Todas as amostras foram fixadas em formol a 10% tamponado (pH 7.4) e incluídas em blocos de parafina. As características microscópicas foram avaliadas pela análise de um corte de 5 µm de cada amostra, rotineiramente corados com hematoxilina e eosina. Características microscópicas tais como intensidade de infiltrado inflamatório, colagenização, presença de calcificação e necrose foram analisados.

A intensidade de infiltrado inflamatório (ausente, leve, moderado ou intenso) foi determinada nas amostras de polpas dentárias. Foram analisados 10 campos representativos com microscopia de alta potência (x40) utilizando um retículo de integração e os espécimes mostraram: ausência de inflamação - quando a maioria dos campos (> 7) não apresentou células inflamatórias, leve inflamação - quando a maioria dos campos (> 7) demonstrou menos que 35% do espaço do retículo de integração preenchido por células inflamatórias; moderada inflamação - quando a maioria dos campos (> 7) demonstrou de 30-70% do espaço do retículo de integração preenchido por células inflamatórias e intensa inflamação - quando a maioria dos campos (> 7) demonstrou mais que 70% do espaço do retículo de integração preenchido por células inflamatórias.

A colagenização também foi caracterizada em ausente, leve, moderada e intensa, levando em consideração os mesmos critérios adotados para infiltrado inflamatório, só que tendo em vista o espaço preenchido no retículo de integração por fibras colágenas.

Imunoistoquímica

Todos os anticorpos foram previamente submetidos a testes para padronização das reações. Para a técnica da imunoistoquímica foi utilizado o kit NovoLink (Método do polímero).

Linfócitos T helper e linfócitos T de memória foram identificadas pela utilização de anti-CD4 e anti-CD45RO respectivamente. As lâminas foram então incubadas com os anticorpos primários (Tabela 1), por 18 horas a 4 º C. Após a lavagem em TBS, os cortes foram tratados com o Sistema Novolink (Novocastra, Newcastle, Reino Unido). As secções foram então incubadas em 3,3' - Diaminobenzidina (DAB) (Dako) por 1 minuto e 3 minutos na identificação das proteínas $CD4^+$ e $CD45RO^+$ respectivamente. Finalmente, os cortes foram corados com hematoxilina de Mayer e cobertos com lamínula de vidro.

Tabela 1: Anticorpos e protocolo de reação de imunoistoquímica.

Anticorpo (clone)	**Diluição**	**Exposição antigênica**	**Anticorpo secundário**
Anti-CD4 (Clone 4b12, NCL-CD4-368, Novocastra)	1:100	EDTA (pH=8.0 por 30 minutos a 98ºC)	Kit-Novolink[1]
Anti-CD45RO (Clone UCHL1, NCL-UCHL1, Novocastra)	1:300	Citrato (pH=6.0 por 30 minutos a 95ºC)	Kit-Novolink[1]

[1] Novocastra (New Castle, UK).

Para os controles positivos e negativos foram feitos cortes contendo tonsila. O controle positivo esteve presente em todas as reações feitas. Os controles negativos foram obtidos pela omissão de anticorpos primários que foram substituídos por PBS-BSA 1% e por anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD4 humano (Novocastra).

Análise quantitativa e qualitativa

O número de células imunomarcadas $CD4^+$ e $CD45RO^+$ foi determinado separadamente nas polpas dentárias humanas, quantificado por meio de análise morfométrica, utilizando microscópio óptico contendo um retículo de integração (CARL ZEISS-4740680000000-Netzmikrometer, 12.5x). Todas as amostras foram examinadas sob aumento de 100X (objetiva) utilizando óleo de imersão, em que a área ocupada pelo retículo nesse aumento corresponde a 0,015625mm². A localização e distribuição das células $CD4^+$ e $CD45RO^+$ também foram analisadas.

Análises descritivas foram expressas como média e desvio padrão (DP) de *n* observações, por mm². Análises comparativas de populações celulares, acima citadas, foram feitas usando o teste Wilcoxon e a análise comparativa entre grupos experimentais foram feitas usando o teste não-paramétrico Mann-Whitney. Valores de p menores que 0.05 foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

A caracterização microscópica das amostras permitiu distinguir dois padrões de respostas distintos: polpas com moderado a intenso infiltrado inflamatório e levemente colagenizadas (Grupo 1) (Fig. 1A) e polpas com escasso infiltrado inflamatório e moderada a intensa colagenização (Grupo 2) (Fig. 1B).

A maioria das amostras de pulpite mostrou calcificação e todos os casos mostraram vasos sanguíneos preservados (Fig. 1A e 1B). As características microscópicas mais importantes das amostras estão descritas na Tabela 2. Embora verificados microscopicamente dois padrões distintos de pulpites, clinicamente os grupos 1 e 2 apresentaram as mesmas características.

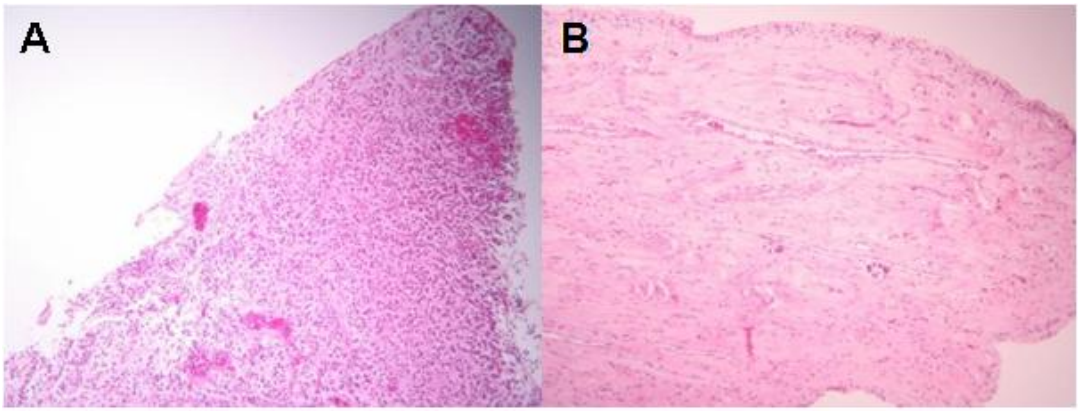


Fig.1. Polpa dentária com moderado a intenso infiltrado inflamatório e levemente colagenizada (A) e polpa dentária com escasso infiltrado inflamatório e intensa colagenização (B). Presença de vasos sanguíneos preservados e calcificações (A e B). H.E. A,B, x 10.

Tabela 2. Caracterização microscópica das amostras de polpas com inflamação pulpar (*n*=38)

Características microscópicas		Número de casos	%
Infiltrado inflamatório	Ausente	00	00
	Leve	23	60.5
	Moderado	14	36.9
	Intenso	01	2.6
Colagenização	Ausente	00	00
	Leve	12	31.6
	Moderado	21	55.2
	Intenso	05	13.2
Calcificações	Ausente	04	10.5
	Leve	16	42.1
	Moderado	11	29
	Intenso	07	18.4
Necrose	Ausente	38	100
	Presente	00	00

As células imuno-inflamatórias estiveram difusamente distribuídas por todo o tecido pulpar em todas as amostras (n = 38), com baixa densidade de linfócitos T helper $CD4^+$ (média de 5,9 células por mm²) (Fig. 2) e de linfócitos T de memória $CD45RO^+$ (média de 4,7 células por mm²) (Fig. 3). Não houve diferenças significativas entre as densidades celulares de $CD4^+$ e $CD45RO^+$ quando comparados G1 e G2 (Mann-Whitney, $p > 0.05$) (Fig. 4).

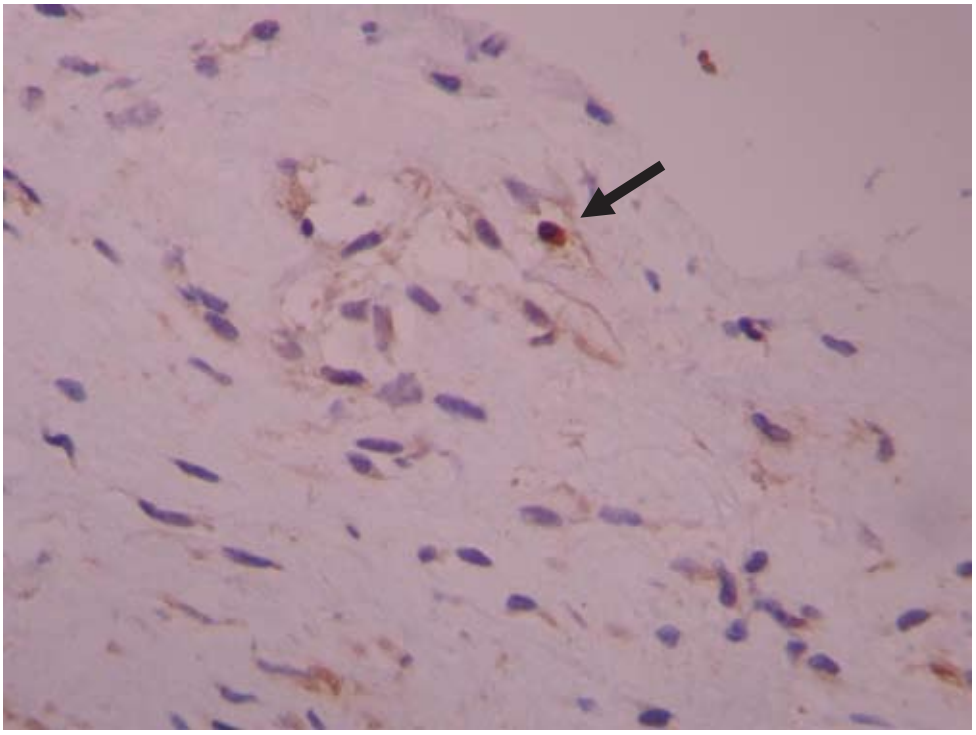


Fig.2. Célula $CD4^+$ distribuída na polpa inflamada. Coloração em imunoistoquímica, x 40.

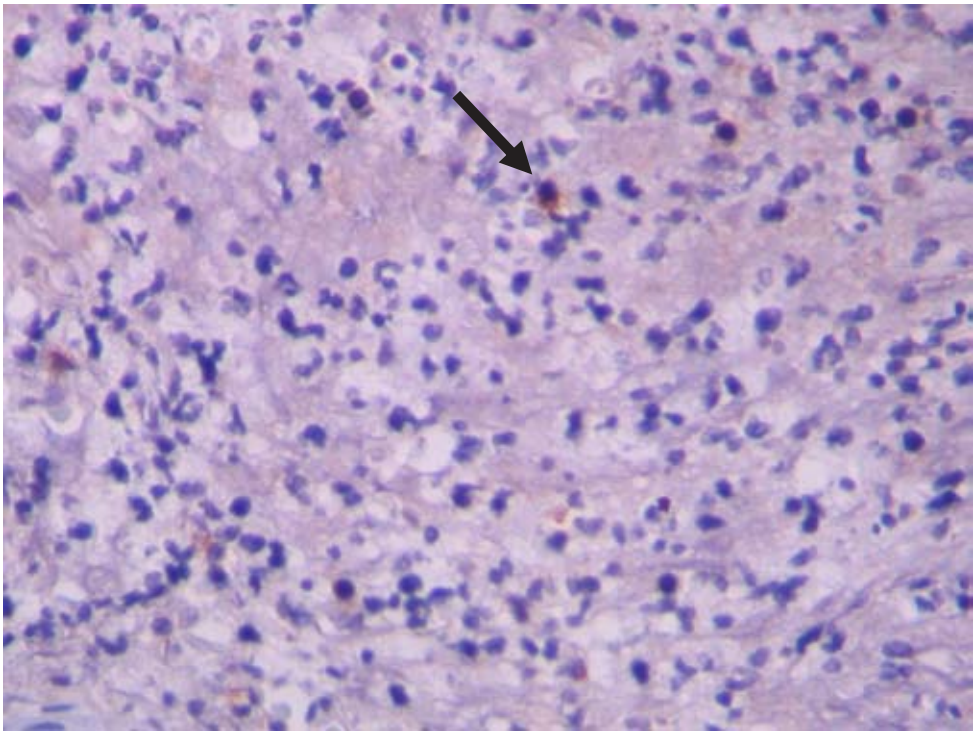


Fig.3. Célula $CD45RO^+$ distribuída na polpa inflamada. Coloração em imunoistoquímica, x 40.

Células imuno inflamatórias por mm²

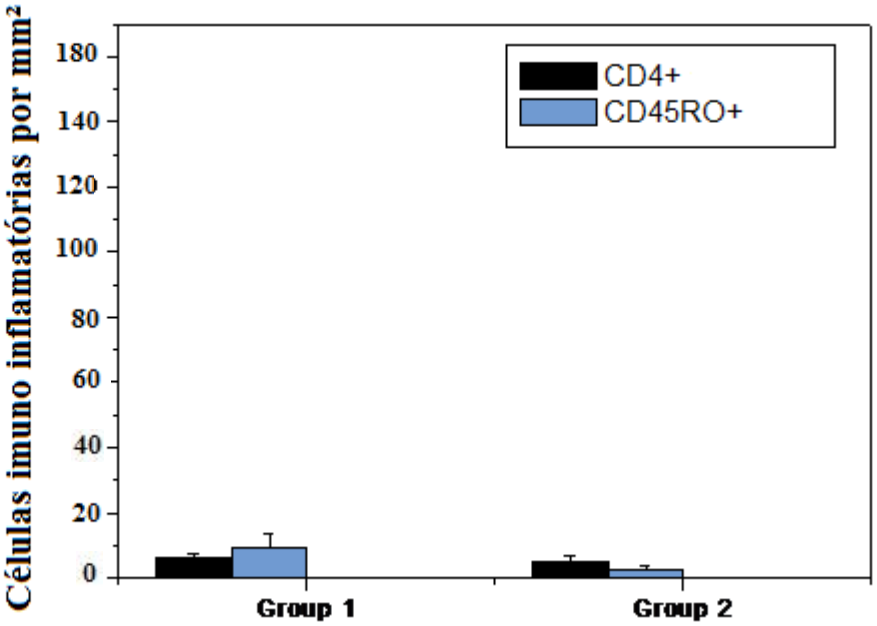


Fig. 4. Densidade das células $CD4^+$ e $CD45RO^+$ por mm^2 no G1 (pulpites com moderado a intenso infiltrado inflamatório e levemente colagenizadas) e G2 (pulpites com escasso infiltrado inflamatório e moderada a intensa colagenização). Resultados expressos como média positiva de células/mm^2. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os grupos a um nivel de significância de 0.05.

DISCUSSÃO

A caracterização microscópica das pulpites dentárias permitiu distinguir padrões distintos de respostas inflamatórias (moderado a intenso infiltrado inflamatório e levemente colagenizadas, e escasso infiltrado inflamatório e moderada a intensa colagenização), aspecto pouco salientado na literatura.

Apesar da observação microscópica de dois padrões de respostas distintos, estes não foram confirmados clinicamente, denotando a falta de correlação entre os eventos clínicos e histopatológicos, concordante com estudos prévios (SELTZER *et al.*, 1963; NÄRHI, 2003). A correlação entre os sintomas e as alterações histopatológicas em pulpites dentárias é pobre e a determinação do tipo e extensão das alterações inflamatórias com base na sintomatologia é imprecisa (NÄRHI, 2003).

No presente estudo, ambos os grupos de pulpite apresentaram células $CD4^+$ e $CD45RO^+$, porém em baixa densidade. Essa baixa densidade de $CD4^+$ pode sugerir a participação pouco efetiva dessa célula na resposta imune adaptativa, conforme observado por Freitas *et al*., (2007), que verificou a presença de linfócitos T $CD4^+$ no fenômeno inicial da resposta imune a cáries incipientes e sua pouca contribuição na resposta à pólipos pulpares.

Os linfócitos T atuam no início da resposta imune específica da polpa, após exposição à proteínas antigênicas, e o sinal provido dessas células pode provavelmente ser pré-requisito para a ativação de outras células antígeno-específicas, como os linfócitos B (JONTELL *et al*.,1998; FREITAS *et al*., 2007). À medida que o processo de cárie dentária aproxima-se da polpa, ocorre um aumento de células B. Assim, na inflamação pulpar, a imunidade celular estaria associada à cáries rasas e a imunidade humoral à cáries profundas (HAHN, LIEWEHR, 2007). Esse fato foi evidenciado no presente estudo, em que todas as amostras apresentaram cárie profunda e baixa densidade de células T, sugerindo uma resposta de caráter humoral mediada por anticorpos.

Outros estudos também confirmaram a presença de células $CD4^+$ e $CD45RO^+$ em polpas humanas de dentes com cáries leves, sugerindo uma resposta imune celular específica dessas células a um estímulo de cárie inicial (FREITAS *et al*., 2007; IZUMI *et al*., 2005; JONTELL *et al*., 1998; GIARDINO *et al*., 2004). Contudo, poucos trabalhos relataram a presença das mesmas em polpas inflamadas e em pequena densidade (IZUMI *et al*., 2005; JONTELL *et al*, 1998), o que é concordante com os dados do nosso estudo

Izumi *et al*. (2005) afirmou que a célula $CD45RO^+$ está mais presente em polpas humanas normais ou inflamadas do que a célula $CD4^+$, todavia no presente estudo essa diferença não foi verificada, uma vez que ambas estiveram presentes, sem distinção significativa. Ainda, em relação aos grupos de pulpite analisados, não houve diferenças significativas na quantidade de células $CD4^+$ e $CD45RO^+$ quando comparados os grupos 1 e 2.

É fato que muita informação ainda falta na nossa compreensão de como o sistema imune do complexo dentina/polpa se comunica com o sistema de defesa do

organismo e como a polpa age frente a agressão externa. Ainda há limitações na literatura em relação a essa área de mecanismos moleculares que regulam a resposta celular. Futuras investigações são necessárias para assegurar como controlar as atividades bacterianas ocultadas nos túbulos dentinários e possibilitar uma possível recuperação pulpar.

CONCLUSÕES

Frente a análise Clínica não observou-se distinção entre os dois grupos de pulpite (moderado a intenso infiltrado inflamatório e levemente colagenizadas e com escasso infiltrado inflamatório e moderada a intensa colagenização, respectivamente). Na avaliação microscópica verificou-se dois padrões diferentes de pulpite. As células da resposta imune, $CD4^+$ e $CD45RO^+$, estiveram presentes em ambos os grupos, apesar de estarem em pouca quantidade. Não houve diferenças significativas entre as densidades celulares de $CD4^+$ e $CD45RO^+$ quando comparados os grupos 1 e 2, indicando que mesmo os linfócitos T helper e T de memória estarem presentes na polpa, estão em pequena quantidade e não tem uma participação significativa na defesa da polpa dentária após a entrada do antígeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS. **Imunologia celular e molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000.

AVERY J. Polpa dentária. In: AVERY, J. **Fundamentos de histologia e embriologia bucal**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.98-113. 2001.

BERGENHOLTZ G. Pathogenic mechanisms in pulpal disease. **J Endod**; 16:98-101. 1990.

ESTRELA C. **Ciência Endodôntica**. 1 ed. São Paulo: Artes Médicas; 2004.

FREITAS P, NOVARETTI CP, RODINI CO, BATISTA AC, LARA VS. Mast cells and lymphocyte subsets in pulps from healthy and carious human teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**; 103:e95–102. 2007.

GIARDINO L, SAVOLDI, E, PONTIERI F, BERUTTI, E. Russel bodies in dental pulp of permanent human teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**; 98: 760-4. 2004.

HAHN CL, LIEWEHR FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. **J Endod**; 33:773–81. 2007.

IZUMI T, *et al.* Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-cariuos teeth. **Arch Oral Biol**; 40:609-614. 1995.

JONTELL M, *et al.* Immune defense mechanisms of the dental pulp. **Crit Rev Oral Bio Med**. 1998;:9:179-200.

MASSLER M. Pulpal reactions to dental caries. **Int Dent J**. 1967;17:441-460.

NÄRHI MVO. Dentinal and pulpal pain. In: Bergenholtz G, Hørsted-Bindslev P, Reit C. **Textbook of endodontology**. Oxford: Blackwell Munksgaard. p. 43–56. 2003.

RODD HD, BOISSONADE FM. Immunocytochemical investigation of immune cells within human primary and permanent tooth pulp. **Int J Paediatr Dent**;16(1):2-9. 2006 Jan.

SELTZER S, BENDER IB, ZIONTZ M. The dynamics of pulp inflammation: Correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**; 16:969–77. 1963.

TEN CATE AR. Complexo dentina-polpa. In: Ten Cate AR. **Histologia Bucal**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

TORNECK CD. Changes in the fine structure of the dental pulp in caries pulpits. **J Oral Pathol**; 3:71-82. 1974.

TORNECK CD. Changes in the fine structure of the dental pulp subsequent to carious exposure. **J Oral Pathol**; 6:82-95. 1977.

YU C, ABBOTT PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. **Aust Dent J**; 52 (1 Suppl):S4-16. 2007 mar.

Investigação da atividade citotóxica e indutora de apoptose da grandisina sobre a linhagem leucêmica HL-60

Isabel Crhistyna Teles de Carvalho[a], Polyana Lopes Benfica[a], Marcelo de Sousa Vieira[a], Marize Campos Valadares[a*], [a]Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74605-220, Brasil

E-mail: mcvbozinis@gmail.com

Palavras-chaves: Lignanas, Grandisina, HL-60, Citotoxicidade Celular

1.0 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública emergencial em todo o mundo, sendo uma das principais causas de morte no Brasil e no Mundo. Mais de 11 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer a cada ano, sendo a causa de aproximadamente 7 milhões de mortes por ano (12,5% de mortes no mundo inteiro), causando, então, grande impacto nos índices de mortalidade mundial. No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 novos casos de câncer. (BRASIL, 2007).

Apesar do enorme esforço de cientistas em todo o mundo na busca de terapias mais eficientes para o tratamento do câncer, a terapêutica antineoplásica ainda é modesta e, portanto, ainda carece de grandes investimentos do setor público (PARVEEN, SAHOO, 2008). Neste cenário, o Ministério da Saúde do Brasil já identificou que a Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em fármacos antineoplásicos são prioritários para a realidade da saúde pública brasileira e para a soberania nacional.

O uso extensivo de lignanas na medicina tradicional, fez desta classe de Produtos Naturais um importante alvo para estudo do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, dentre eles os antitumorais (GORDALIZA et al., 2000; 2001; 2004; SALEEM et al, 2005; SRIVASTAVA et al., 2005). As lignanas são compostos interessantes uma vez que possuem uma grande variedade de ações biológicas que ainda não foram totalmente elucidadas

(SALEEM, et al, 2005). Este espectro de atividades tem sido continuamente expandido por meio de descobertas e modificações nas lignanas ou ainda, pela triagem de novas atividades biológicas de lignanas já conhecidas (SRIVASTAVA et al., 2005).

As lignanas são originadas como metabólitos secundários em inúmeras espécies amplamente distribuídas pelo reino vegetal (ROW, 1978; AYRES and LOIKE, 1990; MOLINARI et al., 2002; CASTRO et al., 2003; 2004). Estes fitoconstituintes podem ser isolados de mais de 60 famílias de plantas, de diferentes partes da raiz, rizoma, madeira, tronco, folhas, frutos, sementes e em alguns casos do exudato e resinas (ROW, 1978; AYRES and LOIKE, 1990, GORDALIZA et al., 2000). Atualmente as lignanas são alvos de diferentes linhas de pesquisa, como a que estuda a inibição da transcriptase reversa e atividade anti-HIV (EICH et al., 1996; LIU et al., 1997; HARA et al., 1997; GORDALIZA et al., 2004), da atividade antifúngica (ZACCHHINO et al., 1997), da atividade anti-reumática (RANTAPPA-DAHLQUVIST et al., 1994; LERNDAL and SVENSSON, 2000), da atividade anti-psoríase, anti-malárica (LEANDER and ROSEN, 1988), anti-leishmania (BARATA et al, 2000), mas o que mais desperta o interesse científico é o estudo da atividade anti-viral e da citotoxicidade dessas lignanas (BEDOWS and HATFIELD, 1982; AYRES and LOIKE, 1990).

A espécie botânica *Virola surinamensis*, pertence à família Myristicaceae. São árvores que crescem freqüentemente em várzeas na Amazônia (RODRIGUES, 1980). Conhecida popularmente como ucuúba branca ou ucuúba de igapó, tem a resina extraída de sua casca e utilizada na medicina popular no tratamento de erisipela, o chá de suas folhas é empregado no tratamento de cólicas e dispepsia (LOPES et al., 1999; 2004). As neolignanas virolina e surinamensina, extraídas de suas folhas, apresentam ação contra a penetração de cercarias de *Schistosoma mansoni* (LOPES et at., 1999), sendo que a surinamensina também apresenta atividade contra a forma promastigota de *Leishmania donovani* (BARATA et al., 2000). Os fitoconstituintes veraguensina e grandisina são extraídas de seus brotos e apresentam potente ação contra a forma tripomastigota de *Trypanossoma cruzi* (LOPES et al., 1998). Estudos preliminares do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a grandisina possui importante atividade citotóxica sobre a

linhagem leucêmica K-562, indutora de apoptose e atividade antiangiogênica in vivo.

Diante dos dados da literatura e resultados preliminares sobre a atividade biológica da grandisina, neste trabalho investigamos o potencial citotóxico, indutor de apoptose e modulador de caspase da grandisina sobre células leucêmicas.

2.0 OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivos: a) avaliar o potencial citotóxico da grandisina sobre a linhagem leucêmica HL-60; b) Investigar o potencial indutor de apoptose por meio de marcação com anexina V; c) investigar a atividade moduladora de caspases.

3.0 METODOLOGIA

3.1 Grandisina

A grandisina isolada da *Virola surinamensis* foi fornecida pelo Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, do Laboratório de Produtos Naturais, do Instituto de Química da USP-São Paulo.

3.2 Linhagem celular

Utilizou-se a linhagem HL-60 e K562 do "America Type Culture Collection", Rockville, Maryland, USA. Tais células foram mantidas em cultura em meio RPMI-1640 (Sigma™, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab™) e 1% de glutamina, eritromicina e estreptomicina (Sigma) em estufa com 5% de CO_2 a uma temperatura constante de 37^0C. A incubação in vitro destas células em presença de várias concentrações da droga em estudo foi realizada utilizando 3 métodos específicos de investigação de viabilidade celular: método da redução do tetrazolium (avalia atividade mitocondrial), o azul de tripano (avalia integridade de membrana) e o vermelho neutro (avalia atividade lisossomal).

3.3 Método de viabilidade por Azul de Tripano

Após período de incubação com a grandisina (24 e 48 horas), a suspensão celular foi diluída (1:10) em solução de Azul de Tripan, e foi realizada a leitura. O princípio do método baseia-se na entrada do corante nas células não viáveis (que são as mortas).

3.4 Método de redução do tetrazolium (MTT)

Após o período de incubação com a grandisina (24 e 48 horas), a solução de MTT (Kit – Boehringer Mannheim) foi adicionada e a placa de cultura foi incubada por mais 4 horas. Logo após, adicionou-se a solução solubilizante do MTT e efetuou-se a leitura em ELISA a 570 nm.

3.5 Método de incorporação do vermelho neutro

Após o período de incubação com a grandisina (24 e 48 horas), a solução de vermelho neutro foi adicionada e a placa de cultura foi incubada por mais 4 horas. Logo após, a placa foi vertida e lavada com PBS, e, então, adicionou-se solução de ácido acético a 1% e etanol a 50% para fixação das células e remoção de excedente do corante. A leitura foi realizada em ELISA a 540 nm.

3.6 Marcação com anexina V

As células tumorais são tratadas com diferentes concentrações da substancia teste, sendo lavadas duas vezes com PBS 0,05 $mol.L^{-1}$ e imediatamente incubadas com anexina V e iodeto de propídio preparados em tampão HEPES, pH 7,4, segundo as especificações do fabricante (Boehringer-Mannheim). A apoptose pode, então, ser avaliada por citometria de fluxo

3.7 Atividade das caspases-3, -6 e -9

A avaliação da atividade das caspases é realizada usando kit colorimétrico (R & D System) de acordo com as instruções do fabricante, após a incubação das células com a grandisina por 72h.

3.8 Análise estatística

Os resultados da citotoxicidade foram transformados em porcentagem em relação ao controle e a CI_{50} (concentração que produz 50% de efeito inibitório nos parâmetros avaliados) foi graficamente obtida da curva de dose-resposta. Também foi calculado o coeficiente de linearidade (r^2) de cada curva.

4.0 RESULTADOS

Os resultados da avaliação do potencial citotóxico da grandisina estão apresentados em figuras e Tabelas. A figura e tabela 1 mostram a viabilidade celular pelo método de coloração com Azul de Tripano em 24 e 48 horas de incubação *in – vitro* das células HL-60 com a grandisina.

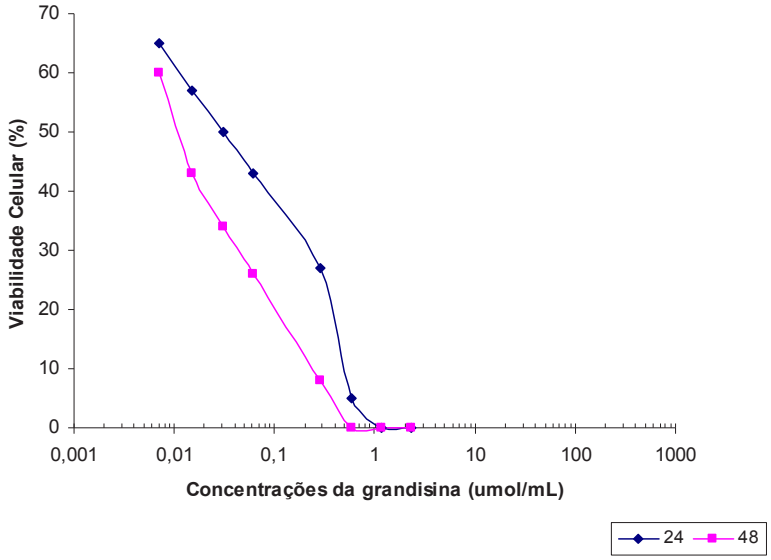


Figura 1: Efeito citotóxico de diferentes concentrações da grandisina em escala logarítmica na base 10 pelo método de coloração com Azul de Tripano: 24 e 48 horas.

	Viabilidade	Celular (%)
Concentrações da grandisina	24 h	48 h
0,018 µmol/mL	65	60
0,036 µmol/mL	57	43
0,072 µmol/mL	50	34
0,144 µmol/mL	43	26
0,289 µmol/mL	27	8
0,578 µmol/mL	5	0
1,156 µmol/mL	0	0

2,31 µmol/mL	0	0

Tabela 1: Efeito citotóxico de diferentes concentrações da grandisina pelo método de Azul de Tripano: 24 e 48 horas.

A partir da análise dos resultados da figura 1 observa-se que há uma queda da viabilidade celular de forma concentração-dependente. A concentração inibitória que mata provavelmente 50% das células (CI_{50}) foi determinada através das equações da reta e foi de 0,058 µmol/mL e 0,011 µmol/mL para 24 e 48 horas respectivamente. Estes dados revelam o potencial citotóxico da grandisina. O coeficiente de linearidade (r^2) das curvas foi de 0,9546 e 0,9197, para 24 e 48 horas respectivamente, o que nos permite confirmar a relação de dose-dependência entre a concentração da grandisina e a viabilidade celular.

A figura 2, tabela 2, mostram a viabilidade celular pelo método de redução do tetrazolium (MTT) em 24 e 48 horas de incubação *in – vitro* das células HL-60 com a grandisina.

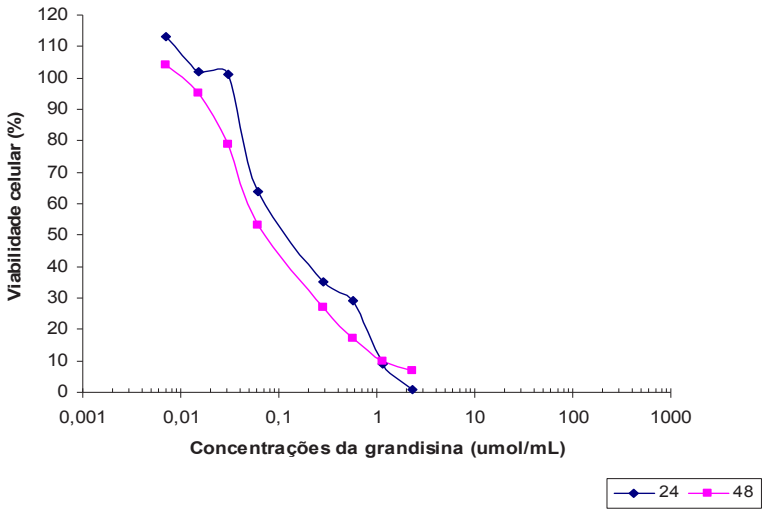


Figura 2: Efeito citotóxico de diferentes concentrações da grandisina em escala logarítmica na base 10 pelo método de redução do tetrazolium (MTT): 24 e 48 horas.

	Viabilidade	Celular (%)
Concentrações da grandisina	24 h	48 h
0,018 µmol/mL	113	104
0,036 µmol/mL	102	95
0,072 µmol/mL	101	79

0,144 µmol/mL	64	53
0,289 µmol/mL	35	27
0,578 µmol/mL	29	17
1,156 µmol/mL	9	10
2,31 µmol/mL	0,71	7

Tabela 2: Efeito citotóxico de diferentes concentrações da grandisina pelo método de redução do tetrazolium (MTT): 24 e 48 horas.

A partir da análise dos resultados da figura e tabela 2 observa-se que também há uma queda da viabilidade celular de forma concentração-dependente. A CI_{50} foi de 0,265 µmol/mL e 0,195 µmol/mL para 24 e 48 horas respectivamente. O r^2 foi de 0,9596 e 0,9503 para 24 e 48 horas respectivamente.

A figura e tabela 3 mostram a viabilidade celular pelo método de incorporação do Vermelho Neutro em 24 e 48 horas de incubação *in – vitro* das células HL-60 com a grandisina.

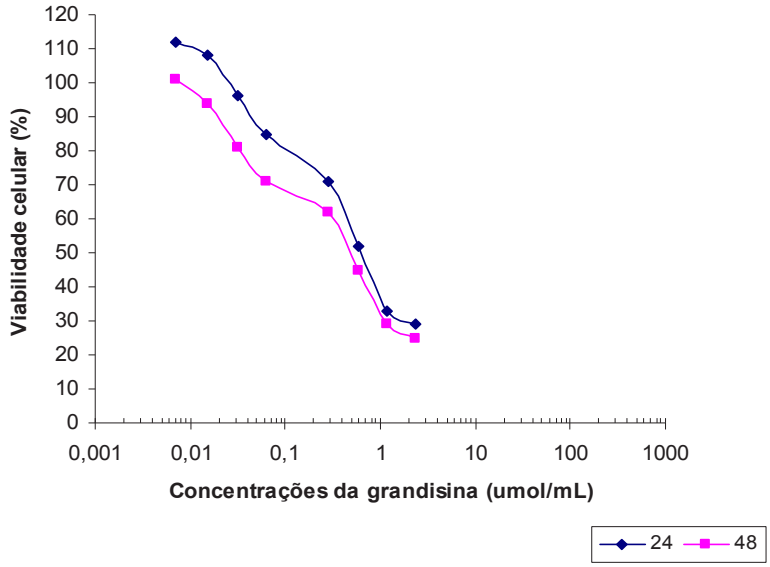


Figura 3: Efeito citotóxico de diferentes concentrações da grandisina em escala logarítmica na base 10 pelo método de incorporação do Vermelho Neutro: 24 e 48 horas.

	Viabilidade	Celular (%)
Concentrações da grandisina	24 h	48 h
0,018 µmol/mL	112	101
0,036 µmol/mL	108	94
0,072 µmol/mL	96	81

0,144 µmol/mL	85	71
0,289 µmol/mL	71	62
0,578 µmol/mL	52	45
1,156 µmol/mL	33	29
2,31 µmol/mL	29	25

Tabela 3: Efeito citotóxico de diferentes concentrações da grandisina pelo método de incorporação do Vermelho Neutro: 24 e 48 horas.

A partir da análise dos resultados da figura 3 e tabela 3 observa-se que também há uma queda da viabilidade celular de forma concentração-dependente. O CI_{50} foi de 0,697 µmol/mL e 0,455 µmol/mL para 24 e 48 horas respectivamente. O r^2 foi de 0,9770 e 0,9879 para 24 e 48 horas respectivamente.

Para melhor visualização e comparação das CI_{50} e r^2 dos diversos testes utilizados, os valores foram agrupados, e se encontram na tabela 4.

	CI_{50} (24 h)	CI_{50} (48 h)	r^2 (24 h)	r^2 (48 h)
Azul de Tripano	0,058	0,011	0,9546	0,9197
MTT	0,265	0,195	0,9596	0,9503
Vemelho Neutro	0,697	0,455	0,9770	0,9879

Tabela 4: Comparação das concentrações inibitórias que matam provavelmente 50% das células (CI_{50}) e os coeficientes de linearidade (r^2) para 24 e 48 horas dos diversos testes utilizados.

Ao analisar a tabela 4, percebemos que o teste por Azul de Tripano apresentou as menores CI_{50}, ou seja, a grandisina apresentou-se mais tóxica neste teste. Isto ocorre porque o teste avalia a integridade de membrana, através da contagem das células viaveis (células vivas), ou seja, por não se tratar de um método colorimétrico, os resultados se apresentam mais factíveis. Os testes por MTT e Vermelho Neutro (testes colorimétricos), apresentaram maiores CI_{50}, e isto acontece devido a interferentes relacionados à metodologia, explicados posteriormente. Os r^2 são razoavelmente equivalentes entre os testes e, portanto, não interferem no resultado. Vale resaltar que, por se tratar de um teste que avalia citotoxicidade, é compreensível que a curva não se apresente altamente linear (com r^2 mais próximo a 1,0).

Inicialmente o projeto previa a realização do estudo dos mecanismos indutores da apoptose da grandisina sob a linhagem leucêmica HL-60, porém devido a problemas de contaminação microbiana os teste não foram realizados com esta linhagem. No entanto, estudos realizados pelo nosso grupo com a participação da aluna com outra linhagem leucêmica, a K-562, demonstraram que o tratamento com grandisina induz a aumento da externalização da anexina V, um indicativo de morte celular via mecanismos apoptoticos. Ademais, verificamos o aumento da atividade das caspases 6,8 e 9 em células K562 tratadas com grandisina (0,036 mol/L * 10-3) por 24 horas.

5.0 DISCUSSÃO

Os resultados para avaliação da citotoxicidade da grandisina pelo método de coloração com o Azul de Tripano mostraram-se bastante satisfatórios e factíveis. Este teste demonstrou grande potencial citotóxico da grandisina frente à linhagem celular HL-60. O ponto positivo do teste, é que a citotoxicidade é avaliada a partir da contagem de células viáveis nas diversas concentrações da grandisina em comparação ao controle, permitindo então a ausência de interferentes que ocorrem em reações colorimétricas, por exemplo. O ponto negativo é que, a amostra utilizada para a contagem, pode não representar adequadamente a totalidade da reação. Por isso é importante a realização de sexplicata em cada concentração, a adequada homogeinização das amostras antes de se realizar a contagem, a repetição da contagem com outra amosta caso se queira confirmar algum resultado, entre outras, a fim de se obter resultados mais confiáveis.

Os resultados para avaliação da citotoxicidade da grandisina pelo método de MTT e Vermelho Neutro também se mostraram bastante satisfatórios. Vale ressaltar também que, por se tratarem de testes que avaliam atividade enzimática (mitocondrial e lisossomal respectivamente), podem subestimar a toxicidade de determinadas substâncias. Como exemplo, podemos citar a conversão enzimática que o MTT sofre em células viáveis, podendo ser inibido por compostos inibidores enzimáticos, fazendo com que a droga utilizada pareça menos tóxica do que realmente é (SMEE et al. 2002). Outro fator a ser considerado, é que, por serem métodos colorimétricos, estes testes também podem sofrer interferência de compostos naturalmente

coloridos, o que demonstra a necessidade da realização de mais de um método para avaliação da citotoxicidade.

Neste estudo observou-se que a grandisina possui potencial citotóxico de forma dependente das concentrações utilizadas nos testes. Além disto, estudos *a posteriori* demonstraram que a atividade citotóxica da grandisina é mediada por mecanismos apoptóticos. Resultados preliminares sugerem que a morte celular induzida pela grandisina ocorre por mecanismos envolvendo a ativação das caspases 6,8 e 9.

6.0 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitiram concluir que a grandisina possui atividade citotóxica concentração e tempo dependentes sobre as células HL-60 pelas técnicas de coloração com Azul de Tripano, redução do Tetrazolium (MTT) e Vermelho Neutro. Os mecanismos de morte celular envolvem a ativação de caspases.

7.0 REFERÊNCIAS

AYRES, D.C., LOIKE, J.D. **Cambridge University Press**, Cambridge, 1990.

BARATA, L.E., SANTOS, L.S., FERRI, P.H., PHILLIPSON, J.D., PAINE, A., CROFT, S.L. **Phytochemistry**, 55, 589-95, 2000.

BEDOWS, E., HATFIELD, G.M., **J. Nat. Prod.** 45, 725-729, 1982.

BRASIL. **Instituto Nacional do Câncer**, Estimativa da incidência de câncer para 2008 e 2009 no Brasil e nas cinco regiões. Disponível em: **<http://www.inca.gov.br/conteudo >**. Acesso em 10.jul.2009.

CASTRO, A., DEL CORRAL, J.M., GORDALIZA, M., GRANDE, C., GOMEZ-ZURITA, A., GARCIA-GRAVALOS, D., SAN FELICIANO, A., **Eur. J. Med. Chem.**, 38, 65-74, 2003.

CASTRO, M.A., DEL CORRAL, J.M., GORDALIZA, M., GARCIA, P.A., GOMEZ-ZURITA, M.A., GARCIA-GRAVALOS, M.D., DE LA IGLESIA-VICENTE, J., GAJATE, C., AN, F., MOLLINEDO, F., SAN FELICIANO, A. **J. Med. Chem.** 26, 1214-22, 2004.

EICH, E., PERTZ, H., KALOGA, M., SCHUTZ, J., FESEM, M.R., MAZUMDER, A., POMMIER, Y. **J. Med. Chem.** 39, 86-95, 1996.

GORDALIZA, M., CASTRO, M.A., DEL CORRAL, J.M., FELICIANO, A.S., **Curr. Pharm. Des.** 18, 1811-39, 2000.

GORDALIZA, M., GARCIA, P.A., DEL CORRAL, J.M., CASTRO, M.A., GOMEZ-ZURITA, M.A. **Toxicon** 15, 441-59, 2004.

GORDALIZA, M., DEL CORRAL, J.M., ANGELES, C.M., GARCIA, P.A., SAN FELICIANO, A. **Fármaco** 56, 297-304, 2001.

HARA, H., FUJIHASHI, T., SAKATA, T., KAJI, A., KAJI, H., **Aids Res. Hum. Retroviruses** 13, 695-705, 1997.

LEANDER, K., ROSEN, B., **US patent** 4, 788-216, 1988.

LERNDAL, T., SVENSSON, B. **Rheumatology** (Oxford) 39, 316-320, 2000.

LIU, K.C.S.C., LEE, S.S., LIN, M.T., CHANG, C.W., LIU, C.L., LIN, J.Y., HSU, F.I., REN, S., LIEN, E.J., **Med. Chem. Res.** 7, 168-179, 1997.

LOPES, N.P., CHICARO, P., KATO, M.J., ALBUQUERQUE, S., YOSHIDA, M. **Planta Méd.** 64, 667-668, 1998.

LOPES, N.P., KATO, M.J., ANDRADE, E.H., MAIA, J.G., YOSHIDA, M., PLANCHART, A.R., KATZIN, A.M. **J. Ethnopharmacol.** 67, 313-9, 1999.

LOPES, N.P., KATO, M. J., ANDRADE, E.H., MAIA, J.G.S., YOSHIDA, M., PLANCHART, A.R., MAZIER, C., JAUEN, M., SARI, M.A., BUISSON, D. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 14, 5423-5426, 2004.

MOLINARI, A., OLIVA, A., REINOSO, P., DEL CORRAL, J.M., CASTRO, M.A., GORDALIZA, M., GUPTA, M.P., SOLIS, P., SAN FELICIANO, A. **Eur. J. Med. Chem.** 2, 177-82, 2002.

PARVEEN, S., SAHOO, S.K. Polymeric nanoparticles for cancer therapy. **J. Drug Target.** 16, 108-123, 2008.

RANTAPPA-DAHLQVIST, S., LANDBERG, G., ROOS, G., NORBERG, B. **J. Reumatol.** 33, 327-331, 1994.

RODRIGUES, W.A., **Acta Amazonica** 10, 1-127, 1980.

ROW, R. **Andhra University Press**, Waltair, India, 1978.

SALLEEM, M., KIM, H.J., ALI, M.S., LEE, Y.S. **J. Nat. Prod.** 22, 696-716, 2005.

SMEE, D.F., MORRISON, A.C., BARNARD, D.L., SIDWELL, R.W. Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. **J. Virol. Meth.** 106, 71-79, 2002.

SRIVASTAVA, V., NEGI, A.S., KUMAR, J.K., GUPTA, M.M., KHANUJA, S.P. **Bioorg. Med. Chem.** 13, 5892-908, 2005.

ZACCHINO, S., RODRIGUES, G., PEZZENATI, G., ORELLANA, G. **J. Nat. Prod.** 60, 659-562, 1997.

Uma Nova Classe de Exemplos de Trajetória Central em Programação Semidefinida.*

Daniella Porto †

Goiânia, 09 de julho 2009

Resumo

Este trabalho trata de aspectos teóricos da programação semidefinida e exibe uma classe de trajetórias centrais que não convergem para o centro analítico da face ótima na ausência da estrita complementaridade.

Palavras-Chave: Trajetória Central, Diferenciabilidade da Trajetória Central, Centro Analítico.

1 Introdução

Os problemas de programação linear podem ser vistos como um caso particular dos problemas de programação semidefinida, onde vale o "teorema da dualidade forte ". Em geral o "teorema da dualidade forte"não é válido em programação semidefinida, isto é, existem problemas de programação semidefinida onde para todo par (X^*, S^*) de solução primal-dual tem-se $X^* + S^*$ positiva definida, ou seja, as soluções não são estritamente complementares. A trajetória central, como no caso de programação linear, tem importância fundamental no estudo de vários algoritmos para programação semidefinida (a saber, aqueles que em algum sentido segue a trajetória central, veja [8]). O problema de programação semidefinida é não linear nas restrições de "positividade", mesmo assim certas propriedades do comportamento limite da trajetória central associada a ele são semelhantes ao comportamento limite da trajetória central associada ao problema de programação linear, por exemplo, a trajetória central converge, veja [7], e sob a hipótese de estrita complementaridade o seu ponto limite é o centro analítico do conjunto solução,veja [7]. A demostração deste fato é uma parte fundamental do nosso trabalho. Em [6] foi dado um exemplo que mostra que a trajetória central, na ausência de estrita complementaridade, não converge para o centro analítico da face ótima, fato que não foi percebido por [5]. Vamos apresentar no final do trabalho uma classe de

*Relatório de Iniciação Científica orientado por: Orizon Pereira Ferreira.

†IME, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74001-970, BR. A autora foi financiada pelo CNPq.

exemplos de trajetória central que não convergem para o centro analítico da face ótima. Os exemplos apresentados diferem dos exemplos de [6], pois além de serem explícitos tanto a trajetórias primal, quanto a dual, não convergem para os respectivos centro analíticos dos conjuntos soluções associados. De fato, pouco se sabe sobre o comportamento da trajetória central na ausência de estrita complementaridade.

2 Resultados básicos

O conceito de matriz positiva definida e o operador traço são suficientes para definirmos os problemas da programação semidefinida (SDP). Contudo usaremos um produto interno e uma aplicação linear $\mathcal{A}$, para a qual existe uma adjunta $\mathcal{A}^*$ associada a este produto interno, para definirmos tais problemas. Os conceitos de análise tais como critérios de compacidade de conjuntos em espaços euclidianos, continuidade e diferenciabilidade ficam subentendidos e serão usados sem menção explícita. Idem para os conceitos de básicos de convexidade e álgebra linear. A terminologia é enunciada e as notações apresentadas em paralelo aos resultados preliminares que seguem nas subseções abaixo.

2.0.1 Matrizes simétricas positiva definida e semidefinida

O espaço matrizes de ordem $n \times m$ será denotado por $\mathbb{R}^{n\times m}$ e o espaço dos vetores tipo coluna, com m coordenadas, por $\mathbb{R}^m$. Para $u \in \mathbb{R}^m$ e $v \in \mathbb{R}^n$ tratamos o par (u, v) como um vetor em $\mathbb{R}^{m+n}$.

Sejam os conjuntos

$$S^n_+ = \{A \in S^n : u^T Au \geq 0, \forall u \in \mathbb{R}^n\} \quad S^n_{++} = \{A \in S^n : u^T Au > 0, \forall u \in \mathbb{R}^n\}.$$

Se $A - B \in S^n_{++}$, denotamos $A \succ B$ e se $A - B \in S^n_+$, denotamos $A \succeq B$. Dizemos que $A \in S^n$ é positiva definida se $A \succ 0$ e não negativa ou positiva semindefinida, se $A \succeq 0$. Se $M_k(A) \in \mathbb{R}^{k\times k}$ é a matriz cujos elementos de índices (i, j) são iguais aos elementos da matriz $A \in \mathbb{R}^{n\times n}$ com os mesmos índices (i, j), onde $1 \leqslant k \leqslant n$, usaremos o número real $detM_k(A)$, denominado o k-ésimo menor principal de A, para caracterizar as matrizes positivas definidas.

Proposição 2.1. *Uma matriz $A \in S^n$ é positiva semindefinida (respectivamente positiva definida) se, e somente se,*

(i) Todos os autovalores de A são não negativos (respectivamente positivos);

(ii) Todos os menores principais de A são não negativos (respectivamente positivos);

(iii) Existe $A^{\frac{1}{2}} \in S^n$ (respectivamente $A^{\frac{1}{2}} \in S^n$ não singular) tal que $A^{\frac{1}{2}}A^{\frac{1}{2}} = A$;

Proposição 2.2. *Se $A \in S^n_+$ (respectivamente $A \in S^n_{++}$) então*

(i) todos as entradas da diagonal principal a_{ii} são não negativas (respectivamente positivas).

(ii) $a_{ii}a_{jj} \geq a_{ij}^2$ *(respectivamente* $a_{ii}a_{jj} > a_{ij}^2$*),* $\forall\, i,j = 1,...,n;$

(iii) se $A \in S_+^n$ *e* $a_{ii} = 0$ *então* $a_{ij} = a_{ji} = 0, \quad \forall\, i,j = 1,...,n.$

Define-se em $\mathbb{R}^{n\times n}$ um produto interno denominado *produto interno de Frobenius* da seguinte forma:

$$\langle A, B\rangle = \mathrm{tr}(B^T A) = \sum_{i,j=1}^{n} a_{ij}b_{ij}. \tag{1}$$

O *produto interno de Frobenius* induz a seguinte norma em $\mathbb{R}^{n\times n}$

$$\|A\| = \sqrt{\sum_{i,j=1}^{n} {a_{ij}}^2} = \sqrt{\mathrm{tr}(A^T A)}.$$

Tal norma será usada para mostrar que certos conjuntos em S^n são limitados ou fechado ou ainda compactos.

Proposição 2.3. *Seja* $\sigma \in \mathbb{R}$ *o menor autovalor de* $B \in S^n$*.*

(i) Se $A \succeq 0$ *então* $\|A\| = \sqrt{\sum_{i=1}^{n} \lambda_i(A)^2}$

(ii) Se $A \succeq 0$ *e* $B \succeq 0$ *então* $\langle A, B\rangle = \sum_{i,j=1}^{n} \lambda_i(A)\lambda_i(B)$

(iii) $\langle A, B\rangle \geq 0$ *para todo* $A \succeq 0$ *se, e somente se,* $B \succeq 0$*;*

(iv) $\langle A, B\rangle > 0$ *para todo* $A \succeq 0$ *se, e somente se,* $B \succ 0$*;*

(v) Se $B \succeq 0$ *e* $A \succeq 0$ *então* $\langle A, B\rangle = 0$ *se,e somente se,* $AB = 0$*;*

(vi) Se $B \succeq 0$ *e* $A \succeq 0$ *então* $\langle A, B\rangle \geq \sigma tr(A)$*;*

(vii) Se $A \succeq 0$ *então* $tr(A) \geq \|A\|$*;*

(viii) Se $B \succ 0$ *e* $A \succeq 0$ *então* $\|A\| \leq \langle I, A\rangle \leq \frac{1}{\sigma}\ \langle A, B\rangle$*.*

2.1 Cone

Um subconjunto $\mathcal{C}$ de um espaço vetorial euclidiano é dito cone se para todo $x, y \in \mathcal{C}$ e $\lambda > 0$ tem-se $x + \lambda y \in \mathcal{C}$. Como espaços vetorias S^n e $\mathbb{R}^{n(n+1)/2}$ são identicos, isto é isomorfos, podemos falar em cones em S^n tais como S_+^n.

Proposição 2.4. *(Teorema da Separação). Seja um cone* K *fechado no espaço* $\mathbb{R}^\ell$*. Então existe um único vetor* $z \in \mathbb{R}^\ell$ *que determina um único hiperplano* $H = \{u \in \mathbb{R}^\ell : z^T u = 0\}$ *tal que* $z^T v < 0$ *para todo* $v \notin K$ *e* $z^T u \geq 0$*, sempre que* $u \in K$*.*

2.2 Diferenciabilidade de funções vetoriais

O conceito de derivada (ou conceito de diferencial como se queira chamar) que usamos é o introduzido por W.H. Young em 1908. Não é necessário considerar as generalizações desse conceito introduzidas em 1911 por M. Frechet. Dado um aberto $\Omega \subset I\!R^n$ e $f : \Omega \longrightarrow I\!R$ usarenos o símbolo $\nabla f(x)$ para denotar o vetor gradiente de f,

$$\begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x}(x) \\ \vdots \\ \frac{\partial f_1}{\partial x}(x) \end{bmatrix}$$

cujo vetor transposto $\nabla f(x)^T$ é a jacobiana associada à derivada $\nabla f : I\!R^n \longrightarrow I\!R$, ou seja, $\nabla f(x)^T$ é a matriz da aplicação linear,

$$\begin{array}{rccc} \nabla f & : & I\!R^n & \longrightarrow & I\!R \\ & : & u & \longmapsto & \nabla f(x)^T u \end{array}$$

A matriz gradiente de uma aplicação $f : I\!R^n \longrightarrow I\!R^m$, denotada por $\nabla f(x)$, é uma matriz em $R^{n\times m}$ cuja i-ésima coluna é o vetor gradiente $\nabla f_i(x)$ de f_i. Logo $\nabla f(X) = [\nabla f_1(X), ..., \nabla f_i(X), ..., \nabla f_m(X)]$ ou mais explicitamente

$$\nabla f(X) = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1}(x) & \cdots & \frac{\partial f_i}{\partial x_1}(x) & \cdots & \frac{\partial f_n}{\partial x_1}(x) \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ \frac{\partial f_1}{\partial x_j}(x) & \cdots & \frac{\partial f_i}{\partial x_j}(x) & \cdots & \frac{\partial f_n}{\partial x_j}(x) \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ \frac{\partial f_1}{\partial x_n}(x) & \cdots & \frac{\partial f_i}{\partial x_n}(x) & \cdots & \frac{\partial f_n}{\partial x_n}(x) \end{bmatrix} \tag{2}$$

A transposta de $\nabla f(x)$, dita Jacobiana de f, se denota por $\nabla^T f(x)$ ou por $Jf(X)$. Se $f : I\!R^n \longrightarrow I\!R$ então denotamos sua matriz hessiana por $\nabla^2 f$ fazendo referência ao fato dessa matriz ser a matriz jacobiana da aplicação $\nabla f : I\!R^n \longrightarrow I\!R^n$. Se a aplicação $f : \Omega \subset I\!R^{m+n} \longrightarrow I\!R$ é função de $(x, y) \in \Omega$, onde $x \in I\!R^m$ e $y \in R^n$, e $x_1, ..., x_m$ e $y_1, ..., y_n$ são as entradas dos vetores x e y respectivamente, escrevemos

$$\nabla_x f(x) = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1}(x, y) \\ \vdots \\ \frac{\partial f_1}{\partial x_n}(x, y) \end{bmatrix} \qquad \nabla_y f(x) = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial y_1}(x, y) \\ \vdots \\ \frac{\partial f_1}{\partial y_n}(x, y) \end{bmatrix} \tag{3}$$

para indicar a projeção do gradiente $\nabla f(x) \in I\!R^{m+n}$, respectivamente, no espaço $I\!R^m$ contendo o vetor x e no espaço $I\!R^n$ contendo o vetor y. Além disso, $\nabla_x^T f(x, y)$ e $\nabla_y^T f(x, y)$ são, nessa ordem, as matrizes das aplicações lineares,

$$\begin{array}{rccc} \nabla_x f & : & I\!R^m & \longrightarrow & I\!R \\ & : & u & \longmapsto & \nabla_x^T f(x, y)u \end{array} \qquad \begin{array}{rccc} \nabla_y f & : & I\!R^m & \longrightarrow & I\!R \\ & : & v & \longmapsto & \nabla_y^T f(x, y)v \end{array}$$

Para finalizar enunciamos uma proposição que generaliza essas definições.

Proposição 2.5. *Sejam* $x_1 \in \mathbb{R}^{n_1}$, $x_2 \in \mathbb{R}^{n_2}$, $x_3 \in \mathbb{R}^{n_3}$, $x = (x_1, x_2, x_3) \in \mathbb{R}^{n_1+n_2+n_3}$, $y \in R^{n_4}$ *e* $(x, y) \in \mathbb{R}^{n_1+n_2+n_3+n_4}$ *no aberto* $\Omega \subset \mathbb{R}^{n_1+n_2+n_3+n_4}$. *Se as funções*

$$\begin{array}{ccc} f_i : \Omega & \longrightarrow & \mathbb{R}^{n_i} \\ (x, y) & \longmapsto & f_i(x, y) \end{array} \qquad i = 1, 2, 3.$$

com matrizes gradientes $\nabla_{x_j} f_i(x, y) \in R^{n_j \times n_i}$, *com* $i, j = 1, 2, 3$, *são as funções coordenadas diferenciáveis da função* $f : \Omega \longrightarrow \mathbb{R}^{n_1+n_2+n_3}$ *então*

$$\nabla_x f(X) = \begin{bmatrix} \nabla_{x_1} f_1(x, y) & \nabla_{x_1} f_2(x, y) & \nabla_{x_1} f_3(x, y) \\ \nabla_{x_2} f_1(x, y) & \nabla_{x_2} f_2(x, y) & \nabla_{x_2} f_3(x, y) \\ \nabla_{x_3} f_1(x, y) & \nabla_{x_3} f_2(x, y) & \nabla_{x_3} f_3(x, y) \end{bmatrix} \tag{4}$$

e além disso, $\nabla_x f(x)$ *é não singular se, e somente se, as aplicações lineares*

$$\nabla_x f_i \quad : \quad \mathbb{R}^{n_1+n_2+n_3+n_4} \quad \longrightarrow \quad \mathbb{R}^{n_1+n_2+n_3} \qquad i = 1, 2, 3.$$

definidas por $\nabla_x f_i(u) = \nabla_x^T f(x, y)u$ *para todo* $u \in \mathbb{R}^{n_1+n_2+n_3+n_4}$ *têm núcleo trivial.*

Teorema 2.6. *(Teorema da Função Implícita). Sejam* $\Omega \times \bar{\Omega} \subset \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^m$ *um conjunto aberto e* $(x_0, y_0) \in \Omega \times \bar{\Omega}$ *, onde* $\Omega \subset \mathbb{R}^n$ *e* $\bar{\Omega} \subset \mathbb{R}^m$ *são conjuntos abertos com* $x_0 \in \Omega$ *e* $y_0 \in V$. *Suponhamos que* $F : \Omega \times \bar{\Omega} \to \mathbb{R}^m$ *dada por* $F(x, y) = (f_1(x, y), \cdots, f_m(x, y))$ *seja de classe* C^1, *que* $F(x_0, y_0) = c \in \mathbb{R}^m$ *e que a matriz*

$$F_y(x_0, y_0) = \begin{pmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial y_1}(x_0, y_0) & \cdots & \frac{\partial f_1}{\partial y_m}(x_0, y_0) \\ \vdots & & \vdots \\ \frac{\partial f_m}{\partial y_1}(x_0, y_0) & \cdots & \frac{\partial f_m}{\partial y_m}(x_0, y_0) \end{pmatrix} \in M_{m\times m}(\mathbb{R}).$$

seja inversível. Então existe um aberto $W \times Z \subset \Omega \times \bar{\Omega}$ *contendo* (x_0, y_0) *tal que* $F(x, y) = c$ *para* $(x, y) \in W \times Z$ *se, e somente se,* $y = \varphi(x)$, *onde* $\varphi : W \to Z$ *é a única função satisfazendo*

$$F\left(x, \varphi(x)\right) = c, \quad \text{para todo} \quad x \in W.$$

Além disso, φ *é de classe* C^1 *com matriz jacobiana dada por* $\varphi'(x) = -[F_y(x, y)]^{-1} F_x(x, y)$, *i. e.,*

$$\varphi'(x) = -\begin{pmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial y_1}(x, y) & \cdots & \frac{\partial f_1}{\partial y_m}(x, y) \\ \vdots & & \vdots \\ \frac{\partial f_m}{\partial y_1}(x, y) & \cdots & \frac{\partial f_m}{\partial y_m}(x, y) \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1}(x, y) & \cdots & \frac{\partial f_1}{\partial x_n}(x, y) \\ \vdots & & \vdots \\ \frac{\partial f_m}{\partial x_1}(x, y) & \cdots & \frac{\partial f_m}{\partial x_n}(x, y) \end{pmatrix} \in M_{m\times n}(\mathbb{R}).$$

Segue da expansão de Laplace que a função determinante $\det : M_{n\times n}(R) \to R$ que associa a cada matriz X seu determinante é uma função polinomial que é dada por

$$\det X = \sum_{j=1}^{n} (-1)^{i+j} x_{ij} \det X_{ij}.$$

Esta função possui derivadas parciais de primeira ordem contínuas em todos os pontos do domínio, portanto é diferenciável em todos os pontos, e estas derivadas parciais são dadas por

$$\frac{\partial \det}{\partial x_{ij}}(X) = (-1)^{i+j} \det X_{ij}, \quad i,j = 1,...,n.$$

Denote por $((-1)^{i+j} \det X_{ij})$ a matriz dos cofatores de X e por $adjX$ sua transposta. Portanto,temos que o vetor gradiente da função determinante no ponto X é

$$\nabla \det(X) = ((-1)^{i+j} \det X_{ij}),$$

ou equivalentemente

$$\nabla \det(X) = (adjX)^T.$$

Se X for uma matriz inversível, temos $adjX = (\det X)X^{-1}$ e assim segue da desigualdade acima que

$$\nabla \det(X) = \det X (X^{-1})^T. \tag{5}$$

Proposição 2.7 (Regra da Cadeia-1)**.** *Sejam $\Omega \subset I\!R^n$ e $\bar{\Omega} \subset I\!R^m$ conjuntos aberto. Sejam também $g : \Omega \to I\!R^m$ diferenciável no ponto $x_0 \in \Omega$ e $f : \bar{\Omega} \to I\!R^\ell$ diferenciável no ponto y_0, com $g(\Omega) \subset \bar{\Omega}$ e $g(x_0) = y_0$. Então a função composta $f \circ g : \Omega \to I\!R^\ell$ é diferenciável no ponto x_0, e vale*

$$D(f \circ g)(x_0)v = Df(y_0)Dg(x_0)v \quad e \quad (f \circ g)'(x_0) = f'(y_0)\, g'(x_0).$$

Proposição 2.8. *A função $\varphi : S^n_{++} \to I\!R$ definida por $\varphi(X) = \log\det(X)$ possui derivada dada por*

$$\nabla\varphi(X) = X^{-1}.$$

Demonstração. Pela regra da cadeia e (5), a diferencial da composição $\varphi = \log\det : (0, +\infty) \to I\!R$ é dada por

$$D\varphi(X)V = \frac{1}{\det(X)} D\det(X)V = \frac{1}{\det(X)} \langle \det X(X^{-1}), V\rangle, \qquad V \in S^n, \tag{6}$$

onde usamos que $(X^{-1})^T = X^{-1}$. Portanto o resultado seque da igualdade acima. □

Seja $\Omega \subset M_{n\times n}(R^n)$ um conjunto aberto. Dizemos que $F : \Omega \to M_{n\times n}(R)$ é diferenciável no ponto $X \in \Omega$ se existe uma Transformação Linear $T : M_{n\times n}(R^n) \to M_{n\times n}(R^n)$ tal que, para todo $V \in M_{n\times n}(R^n)$ com $X + V \in \Omega$, vale

$$F(X + V) = F(X) + TV + ||V||\eta(V), \qquad \lim \eta(V) = 0.$$

Lema 2.9. *Seja $F : \Omega \to M_{n\times n}(R)$ uma função diferenciável, onde $\Omega \subset M_{n\times n}(R^n)$ é um conjunto aberto. Então*

$$D(F(X)X)V = DF(X)VX + F(X)V. \tag{7}$$

Demonstração. Da definição acima é fácil ver que $D(X)V = V$. Então devemos mostrar que $\lim_{V\to 0}\eta(V) = 0$, onde

$$||V||\eta(V) = F(X+V)(X+V) - F(X)X - DF(X)VX - F(X)V, \tag{8}$$

com $X \in \Omega$ e $V \in M_{n\times n}(R)$ tais que $X + V \in \Omega$. Como F é diferenciáveis temos

$$||V||\eta_F(V) = F(X+V) - F(X) - DF(X)V, \qquad \lim \eta_F(V) = 0.$$

Substituindo a última expressão em (8) obtemos

$$||V||\eta(V) = [||V||\eta_F(V) + F(X) + DF(X)V](X+V) - F(X)X - DF(X)VX - F(X)V,$$

Após simples manipulações algébricas na igualdade acima temos que

$$||V||\eta(V) = ||V||\eta_F(V)(X+V) + DF(X)V^2,$$

ou equivalentemente

$$\eta(V) = \eta_F(V)(X+V) + DF(X)V\frac{V}{\|V\|}.$$

Como $V/\|V\|$ é limitado a igualdade acima implica $\lim_{V\to 0}\eta(V) = 0$ e o lema está provado. □

Seja $C \subset \mathbb{R}^n$ um conjunto convexo. Dizemos que $f : C \to \mathbb{R}$ é convexa se

$$f\big(\lambda x + (1-\lambda)y\big) \le \lambda f(x) + (1-\lambda)f(y), \qquad x, y \in C. \quad \lambda \in [0,1].$$

Se a desigualdade acima for estrita, dizemos que f é estritamente convexa. Dizemos que a função f é *côncava* (respectivamente, estritamente côncava) se $-f$ é uma função convexa (respectivamente, estritamente convexa).

Proposição 2.10. *Sejam C um subconjunto aberto e convexo de $\mathbb{R}^n$ e $f : C \to \mathbb{R}$ uma função duas vezes diferenciável. A função f é convexa se, e somente se, para todo $x \in C$, $v \in \mathbb{R}^n$*

$$\langle f''(x)v, v\rangle \ge 0. \tag{9}$$

Se a desigualdade (9) é estrita , então f é estritamente convexa.

Demonstração. Ver referência [4]. □

Proposição 2.11. *A função $\varphi : S^n_{++} \to I\!R$ definida por $\varphi(X) = \log\det(X)$ possui derivada segunda dada por*

$$\nabla^2\varphi(X)V = -X^{-1}VX^{-1}.$$

Como consequência, a função $-\varphi$ é estritamente convexa.

Demonstração. Agora mostremos a segunda derivada. Multiplicando ambos os lados da igualdade $\nabla\varphi(X) = X^{-1}$ por X temos

$$\nabla\varphi(X)X = I.$$

Usando Lemma 2.9 da igualdade acima que

$$\nabla^2\varphi(X)VX + \nabla\varphi(X)V = 0.$$

multiplicando ambos os lados da igualdade por X^{-1} e observando que $\nabla\varphi(X) = X^{-1}$ concluirmos a primeira parte.

Para provar a segunda parte basta mostrar que

$$-\nabla^2\varphi(X)V = X^{-1}VX^{-1} \in S^n_{++},$$

ou equivalentemente,

$$\langle\nabla^2\varphi(X)V\,,\,V\rangle < 0, \qquad \forall\, V \neq 0.$$

Como $\langle\nabla^2\varphi(X)V\,,\,V\rangle = -\langle X^{-1}VX^{-1}, V\rangle$, pela definição de produto interno e Proposição 2.1 item iii) temos

$$-\langle X^{-1}VX^{-1}, V\rangle = -\langle X^{-1/2}VX^{-1/2}, X^{-1/2}VX^{-1/2}\rangle = -\|X^{-1/2}VX^{-1/2}\| < 0.$$

Portanto $-\varphi$ é estritamente convexa. □

Lema 2.12. *Sejam C um subconjunto convexo de $\mathbb{R}^n$ e $f : C \to \mathbb{R}$ uma função convexa. As seguintes alternativas valem:*

i) *Se x^* é um mínimo local de f em C. Então x^* é mínimo global de f.*

ii) *Se $f : C \to \mathbb{R}$ é estritamente convexa, então f possui no máximo um ponto de mínimo.*

Demonstração. Ver referência [4]. □

3 O Problema de programação semidefinida

O objetivo desta seção é apresentar o *Problema Primal* da *Programação semindefinida*, *SDP*, na sua forma padrão. Apresentamos o *Problema Lagrangeano Dual* associado ao *Problema Primal* como uma definição e não como um resultado da *Dualidade Lagrangeana*. Isto facilita a abordagem diminuindo os pré-requisitos matemáticos necessários. Veremos na seção 3.3 que as condições de otimalidade exibem a relação entre o *Problema Primal* e o *Problema Dual* a saber a condição de otimalidade de Karush-Kun-Tuker para a programção semidefinida.

Sejam dados $b \in I\!R^m$ e $C \in S^n$ e $A_1, ..., A_m \in S^n$. Defina a aplicação linear $\mathcal{A} : S^n \longrightarrow I\!R^m$ por

$$\mathcal{A}X = (\langle A_1, X\rangle, ..., \langle A_m, X\rangle)^T.$$

O *problema primal da programação semidefinida* consiste em encontrar uma matriz $X \in S^n$ satisfazendo as restrições $\mathcal{A}X = b$ e $X \succeq 0$ que minimize $\langle C\,,\,X\rangle$.
Na terminologia padrão enuncia-se *problema primal* da seguinte maneira

$$(P) := \begin{cases} \min\langle C\,,\,X\rangle \\ \mathcal{A}X = b, \\ X \succeq 0. \end{cases} \tag{10}$$

Para as hipóteses dos teoremas seguintes, seguem definições associadas ao *problema primal*. Essas definições, como é usual na literatura da programção semidefinida, vêm acompanhadas de uma terminologia. Faremos referência as matrizes e vetores como pontos.

Definição 3.1. *Diz-se que o ponto $X \in S^n$ é,*

(i) ponto viável se $X \in F(P) := \{X \in S^n : \mathcal{A}X = b, X \succeq 0\}$,

(ii) ponto estritamente viável ou ponto interior se $X \in F^0(P) := \{X \in S^n : \mathcal{A}X = b, X \succ 0\}$,

(iii) ponto ótimo se $X \in F^*(P) := \{X^* \in F(P) : \langle X^*, C\rangle \leqslant \langle X, C\rangle, \forall X \in F(P)\}$.

A forma de apresentar o *Problema Primal* como em (10) tem a vantagem de ser sintética. Além disso, fica mais fácil demonstrar teoremas recorrendo às propriedades de um produto interno e de uma aplicação linear $\mathcal{A}$. Observe que o *Problema Primal* consiste em minimizar a função linear

$$\begin{array}{rccc} f & : & S^n & \longrightarrow & I\!R \\ & : & X & \longmapsto & \langle C\,,\,X\rangle, \end{array} \tag{11}$$

dita função objetivo primal, restrita ao cone fechado e convexo $F(P)$. Defina também a aplicação linear $\mathcal{A}^* : I\!R^m \longrightarrow I\!R$ por $\mathcal{A}^*y = \sum_{k=1}^m A_k y_k$. Note que

$$\langle X, \mathcal{A}^*y\rangle = \sum_{k=1}^n \langle X, y_k A_k\rangle = \sum_{k=1}^n y_k \langle X, A_k\rangle = \langle \mathcal{A}X, y\rangle,$$

e assim, $\mathcal{A}^*$ é aplicação linear adjunta de $\mathcal{A}$. Além disso, prova-se que $\mathcal{A}^*$ é única.
O *problema dual da programação semidefinida* consiste em encontrar um vetor $y \in I\!R^m$ satisfazendo as restrição $C - \mathcal{A}^*y \succeq 0$ que maximize $b^T y$. Cabe observar que o *problema dual da programação semidefinida* e o *problema primal da programação semidefinida* estão numa relação biunívoca.
Para facilitar o manejo das variáveis e conseguir uma certa simetria com *problema primal* introduzimos a matriz $S \in S^n$ como uma segunda variável do *problema dual* de modo que o mesmo consista em obter um par (y, S) satisfazendo as restrições $\mathcal{A}^*y + S = C$ e $S \succeq 0$. Esta nova variável não altera em nada a natureza do *problema dual*. Na terminologia padrão enuncia-se o*problema dual* da seguinte maneira

$$(D) := \begin{cases} \max b^T y \\ \mathcal{A}^*y + S = C, \\ S \succeq 0. \end{cases} \tag{12}$$

Em analogia ao *problema primal* segue a teminologia associada ao *problema dual*:

Definição 3.2. *Diremos que um par* $(y, S) \in I\!R^m \times S^n$ *é,*

(i) viável se $(y, S) \in F(D) := \{(y, S) \in I\!R^m \times S^n : \mathcal{A}^*y + S = C, S \succeq 0\}$,

(ii) estritamente viável se $(y, S) \in F^0(D) := \{(y, S) \in I\!R^m \times S^n : \mathcal{A}^*y + S = C, S \succ 0\}$,

(iii) ponto ou par ótimo se $(y, S) \in F^*(D) := \{(y^*, S^*) \in F(D) : b^T y \leq b^T y^*, \forall (y, S) \in F(D)\}$.

As condições de otimalidade para os problemas (P) e (D) são dadas por:

$$(CO\mu) := \begin{cases} \mathcal{A}X = b & X \succ 0 \\ \mathcal{A}^*y + S = C & S \succ 0 \\ SX = 0. & \end{cases}$$

4 Trajetória central

Nesta sessão definimos a trajetória central e apresentamos um teorema que mostra que, de fato, ela é uma curva diferenciável. Apresentamos também um resultado que caracteriza o ponto limite da trajetória central, a saber, a trajetória central converge para o centro analítico da face ótima.

A tragetória central primal-dual $\{(X(\mu), y(\mu), S(\mu)) \in S^n_{++} \times I\!R^m \times S^n_{++} : \mu > 0\}$ é a única solução do seguinte sistema

$$(CPE\mu) := \begin{cases} \mathcal{A}X = b & X \succ 0 \\ \mathcal{A}^*y + S = C & S \succ 0 \\ SX = \mu I & \mu > 0. \end{cases}$$

Chamamos de trajetória primal o conjunto $\{(X(\mu)) \in S^n_{++} : \mu > 0\}$ e de trajetória dual o seguinte conjunto $\{(y(\mu), S(\mu)) \in I\!R^m \times S^n_{++} : \mu > 0\}$.

Vamos apresentar um resultado na próxima seção, cuja prova é uma aplicação do teorema das funções implícitas, que mostra que a trajetória primal-dual é de fato uma curva diferenciável.

4.1 Diferenciabilidade da trajetória central

Abaixo temos que o sistema (CPE_μ) define uma curva diferenciável no espaço $I\!R^n \times S^n_{++} \times S^n_{++}$ chamada *trajetória central*.

Proposição 4.1. *Se* $F^o(P)$ *e* $F^o(D)$ *são não vazios então existe uma curva*

$$\begin{aligned} \Phi : R_{++} &\longrightarrow F^o(P) \times F^o(D) \\ \mu &\longmapsto (X(\mu), y(\mu), S(\mu)) \end{aligned} \tag{13}$$

continuamente diferencialvel satisfazendo o sistema CPE_μ*, isto é,*

$$\begin{cases} \mathcal{A}X(\mu) = b & X(\mu) \succ 0 \\ \mathcal{A}^* y(\mu) + S(\mu) = C & S(\mu) \succ 0 \\ S(\mu)X(\mu) = \mu I & \mu > 0. \end{cases}$$

Demonstração. Referência [3]. □

4.2 Caracterização do ponto limite da trajetória central

Esta é parte principal do trabalho. Vamos nos preparar para definir centro analítico da face ótima primal e dual e soluções estritamente complementares, após, usando o que foi feito anteriormente, notar que na presença da estrita complementaridade a solução pode ser decomposta em blocos, do mesmo modo podemos fazer na ausência da estrita complementaridade. Tudo isto é feito para que possamos chegar em um teorema que foi bastante importante em nosso trajeto, este nos fala que na presença da estrita complementaridade a trajetória central converge para o centro analítico da face ótima.

Pondo $|B|, |T|$ e $|N|$, respectivamente, como o número de elementos dos conjuntos

$$B = \{1, ..., |B|\} \quad T = \{|B| + 1, ..., |B| + |T|\} \quad N = \{|B| + |T| + 1, ..., |B| + |T| + |N|\}$$

então $\{B, T, N\}$ é uma partição do conjunto $\{1, ..., n\}$ tal que $n = |B| + |T| + |N|$. Sejam E e F elementos genéricos da partição $\{B, T, N\}$. Se definimos $(A)_{EF}$ como uma submatriz de $A \in I\!R^{n\times n}$ cujas entradas de indices ij (onde $(i, j) \in E \times F$) são exatamente as entradas de A com indices ij então $(A)_{EF} \in I\!R^{|E|\times|F|}$. Por motivos de simplicidade indicaremos $(A)_{FF}$ por A_F e $(A)_{EF}$ por A_{EF}. Convem observar que se $A \in S^n$ então $A_{FE} = A_{EF}^T$ e $A_{EE} \in S^{|E|}$. Mediante essas considerações, temos as seguintes partições em blocos,

$$A = \begin{bmatrix} A_B & A_{BT} & A_{BN} \\ A_{TB} & A_T & A_{TN} \\ A_{NB} & A_{NT} & A_N \end{bmatrix}, \quad se \ |T| > 0 \quad e \quad \begin{bmatrix} A_B & A_{BN} \\ A_{NB} & A_N \end{bmatrix}, \quad se \ |T| = 0. \tag{14}$$

Proposição 4.2. *Sejam* $(y, S) \in F(D)$ *e* $X \in F(P)$*. Se* $XS = SX$ *então* S *e* X *são simultaneamente diagonalizáveis, isto é, existem matrizes diagonais* $\Sigma, \Lambda \in I\!R^{n\times n}$ *e uma matriz ortogonal* $Q \in I\!R^{n\times n}$ *tais que*

$$X = Q\Lambda Q^T \qquad S = Q\Sigma Q^T \tag{15}$$

Proposição 4.3. *Se são viáveis os pontos* (y, S, X) *e* (y^o, S^o, X^o) *então:*

$$\langle S - S^o, X - X^o \rangle = 0. \tag{16}$$

Proposição 4.4. *Se* $F^0(P)$ *e* $F^0(D)$ *são não vazios então dado* $\bar{\mu} > 0$ *o conjunto*

$$\{(y(\mu), S(\mu), X(\mu)) : \bar{\mu} > \mu > 0\}$$

é não vazio e limitado.

Demonstração. Referência [3]. □

Portanto segue imediatamente a proposição:

Proposição 4.5. *Se $F^0(P)$ e $F^0(D)$ são não vazios então todo ponto de acumulação do conjunto $\{(y(\mu), S(\mu), X(\mu)) : \bar{\mu} > \mu > 0\}$ é solução, isto é, pertencem ao conjunto $F^*(D) \times F^*(P)$.*

Proposição 4.6. *A trajetória central converge para uma solução do problema de programação semidefinida.*

Demonstração. Referência [6]. □

De agora em diante vamos nos ocupar da caracterização do ponto limite da trajetória central. Sejam $X^* \in F^*(P)$ e $(y^*, S^*) \in F^*(D)$. Então X^* e S^* possuem diagonalização simultanea tal como em (15), isto é,

$$X^* = Q^* \Lambda^* Q^{*T} \qquad S^* = Q^* \Sigma^* Q^{*T}$$

Além disso, X^* e S^* são simultameamente particianados como em (14). E para que sejam satisfeitas as conidções de otimalidade temos apenas os blocos S_N^* e X_B^* não nulos. Assim, podemos escrever,

$$X^* = \begin{bmatrix} X_B^* & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}, \quad se \ \ |T| > 0 \quad ou \quad X^* = \begin{bmatrix} X_B^* & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix}, \quad se \ \ |T| = 0. \tag{17}$$

$$S^* = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & S_N^* \end{bmatrix}, \quad se \ \ |T| > 0 \quad ou \quad S^* = \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & S_N^* \end{bmatrix}, \quad se \ \ |T| = 0. \tag{18}$$

Seja Q_F^* a submatriz de Q^* consistindo das colunas $Q^* e_i$ com índices $i \in F \in \{B, N\}$. Pela complementaridade (maximal ou não, estrita ou não) podemos escrever

$$X = Q_B^{*T} X_B Q_B^* \qquad S = Q_N^{*T} S_N Q_N^*$$

quaisquer que sejam $X \in F^*(P)$ e $(y, S) \in F^*(D)$.

Definição 4.7. *O centro analitico de $F^*(P)$ é a única solução do problema*

$$\begin{cases} \min - \log \det(X_B) \\ X \in F^*(P) \end{cases} \tag{19}$$

analogamente o centro analítico de $F^*(D)$ é a única solução do problema

$$\begin{cases} \min - \log \det(S_N) \\ (y, S) \in F^*(D) \end{cases} \tag{20}$$

Se $|T| = 0$, isto é, $\mathcal{I} = \{0\}$ então dizemos que $(y^*, S^*) \in F^*(D)$ e $X^* \in F^*(P)$ são estritamente complementares. Para qualquer sequência $\{(y(\mu_k), S(\mu_k), X(\mu_k))\} \subset F^o(P) \times F^o(D)$ tal que $\{\mu_k\} \subset I\!R_{++}$ com ponto de acumulação $(y^*, S^*, X^*) \in F^*(D) \times F^*(P)$ é fácil ver que na presença de estrita complementaridade temos a seguinte decomposição em blocos

$$X(\mu_k) = \begin{pmatrix} X_B(\mu_k) & X_{BN}(\mu_k) \\ X_{BN}^T(\mu_k) & X_N(\mu_k) \end{pmatrix}, \quad S(\mu_k) = \begin{pmatrix} S_B(\mu_k) & S_{BN}(\mu_k) \\ S_{BN}^T(\mu_k) & S_N(\mu_k) \end{pmatrix}, \tag{21}$$

Na ausência de estrita complementaridade temos na decomposição acima o surgimento de mais um bloco, a saber, o bloco T onde a estrita complementaridade falha resultando assim na seguinte decomposição

$$X(\mu_k) = \begin{pmatrix} X_B(\mu_k) & X_{BT}(\mu_k) & X_{BN}(\mu_k) \\ X_{BT}^T(\mu_k) & X_T(\mu_k) & X_{TN}(\mu_k) \\ X_{BN}^T(\mu_k) & X_{TN}^T(\mu_k) & X_N(\mu_k) \end{pmatrix} S(\mu_k) = \begin{pmatrix} S_B(\mu_k) & S_{BT}(\mu_k) & S_{BN}(\mu_k) \\ S_{BT}^T(\mu_k) & S_T(\mu_k) & S_{TN}(\mu_k) \\ S_{BN}^T(\mu_k) & S_{TN}^T(\mu_k) & X_N(\mu_k) \end{pmatrix}, \tag{22}$$

Proposição 4.8. *Seja uma sequência de pontos μ_k cujo limite é zero. Se $X(\mu_k)$ e $S(\mu_k)$ possuem a decoposição em blocos como em (22) então,*

(i) $\lim X_{BT}(\mu_k) = 0 \quad \lim X_{BN}(\mu_k) = 0 \quad \lim X_{TN}(\mu_k) = 0 \quad \lim X_N(\mu_k) = 0$

(ii) $X_B^* = \lim X_B(\mu_k) \succ 0$ *é não singular e* $(X_B^*)^{-1} = \lim(X^{-1}(\mu_k))_B \succ 0.$

(iii) $\lim S_T(\mu_k) = \lim X_T(\mu_k) = 0$

(iv) $\lim S_B(\mu_k) = 0 \quad \lim S_{BT}(\mu_k) = 0 \quad \lim S_{BN}(\mu_k) = 0 \quad \lim S_{TN}(\mu_k) = 0.$

(v) $S_N^* = \lim S_N(\mu_k) \succ 0$ *é não singular e* $(S_N^*)^{-1} = \lim(S^{-1}(\mu_k))_N \succ 0.$

Proposição 4.9. *Suponha que os problemas (P) e (D) dados sejam estritamente viáveis. Se existe estrita complementaridade então a trajetória central converge para o centro anlítico da face ótima.*

Demonstração. Referência [3]. □

4.3 Exemplos de trajetória central

O que propomos abaixo é uma nova classe de exemplos, que na ausência da estrita complementaridade tanto a trajetória primal quando a dual não convergem para o centro analítico da face ótima. Abaixo explicitamos a trajetória primal e a dual e mostramos que elas realmente não convergem para seus respectivos centro analíticos.

Exemplo 4.10. *Sejam $n = 6$, $m = 5$, $b = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}^T$*

$$C = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \quad A_1 = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \quad A_2 = \begin{pmatrix} 0 & \alpha & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \alpha & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

$$A_3 = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \beta & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \beta & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \quad A_4 = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \quad A_5 = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$$

Então o problema primal é dado por:

$$\min \left\{ x_{66} : \begin{pmatrix} 1 & -1/2\alpha x_{22} & x_{13} & x_{14} & x_{15} & x_{16} \\ -1/2\alpha x_{22} & x_{22} & x_{23} & -1/2\beta x_{33} & x_{25} & x_{26} \\ x_{13} & x_{23} & x_{33} & x_{34} & x_{35} & -1/2x_{44} \\ x_{14} & -1/2\beta x_{33} & x_{34} & x_{44} & x_{45} & x_{46} \\ x_{15} & x_{25} & x_{35} & x_{45} & x_{55} & -1/2x_{55} \\ x_{16} & x_{26} & -1/2x_{44} & x_{46} & -1/2x_{55} & x_{66} \end{pmatrix} \succeq 0 \right\},$$

e o problema dual é dado por:

$$\max \left\{ y_1 : \begin{pmatrix} -y_1 & -y_2\alpha & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -y_2\alpha & -y_2 & 0 & -y_3\beta & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -y_3 & 0 & 0 & -y_4 \\ 0 & -y_3\beta & 0 & -y_4 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -y_5 & -y_5 \\ 0 & 0 & -y_4 & 0 & -y_5 & 1 \end{pmatrix} \succeq 0 \right\},$$

Os pontos interiores primal e dual são dados, respectivamente, por:

$$X^0 = \begin{pmatrix} 1 & -4\alpha/3 & 0 & 2^1 3^{-1/3}\alpha^{2/3}\beta^{1/3} & 0 & 0 \\ -4\alpha/3 & 8\alpha^2/3 & 0 & -2^2 3^{-1/3}\alpha^{5/3}\beta^{1/3} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 2^3 3^{-1/3}\alpha^{5/3}\beta^{4/3} & 0 & 2^1 3^{1/3}\alpha^{4/3}\beta^{2/3} & -2^1 3^{1/3}\alpha^{4/3}\beta^{2/3} \\ 2^1 3^{-1/3}\alpha^{2/3}\beta^{1/3} & -2^2 3^{-1/3}\alpha^{5/3}\beta^{1/3} & 0 & 2^2 3^{1/3}\alpha^{4/3}\beta^{2/3} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 2^1 3^{1/3}\alpha^{4/3}\beta^{2/3} & 0 & 6d & -3\alpha \\ 0 & 0 & -2^1 3^{1/3}\alpha^{4/3}\beta^{2/3} & 0 & -3\alpha & 3\alpha \end{pmatrix},$$

$$S^0 = \begin{pmatrix} 3\alpha & 2^{-1}3 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2^{-1}3^1 & 2^{-1}3^1\alpha & 0 & 2^{-2}3^{1/3}\alpha^{-2/3}\beta^{-1/3} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 2^{-2}3^{1/3}\alpha^{-2/3}\beta^{-4/3} & 0 & 0 & 2^{-1}3^{-1/3}\alpha^{-1/3}\beta^{-2/3} \\ 0 & 2^{-2}3^{1/3}\alpha^{-2/3}\beta^{-1/3} & 0 & 2^{-1}3^{-1/3}\alpha^{-1/3}\beta^{-2/3} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 3^{-1} & 3^{-1} \\ 0 & 0 & 2^{-1}3^{-1/3}\alpha^{-1/3}\beta^{-2/3} & 0 & 3^{-1} & 1 \end{pmatrix},$$

onde $\alpha > 0$ *e* $\beta \neq 0$.

Os blocos, como definido em (22)*, ao longo da trajetória central primal são dados por:*

$$X_B(\mu) = \begin{pmatrix} 1 & -4(3^{-1})\alpha \\ -4(3^{-1})\alpha & 8(3^{-1})\alpha^2 \end{pmatrix}, \; X_T(\mu) = \begin{pmatrix} 8(3^{-1/3})\mu^{1/3}\alpha^{4/3}\beta^{4/3} & 0 \\ 0 & 4(3^{1/3})\mu^{2/3}\alpha^{2/3}\beta^{2/3} \end{pmatrix}, \; X_N(\mu) = \begin{pmatrix} 6\mu & -3\mu \\ -3\mu & 3\mu \end{pmatrix},$$

$$X_{BT}(\mu) = \begin{pmatrix} 0 & 2(3^{-1/3})(\beta\alpha)^{1/3}\mu^{1/3} \\ 0 & -4(3^{-1/3})(\alpha^4\beta)^{1/3}\mu^{1/3} \end{pmatrix}, \; X_{BN}(\mu) = \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 0 \end{pmatrix}, \; X_{TN}(\mu) = \begin{pmatrix} 2(3^{1/3})(\alpha\beta)^{2/3}\mu^{2/3} & -2(3^{1/3})(\alpha\beta)^{2/3}\mu^{2/3} \\ 0 & 0 \end{pmatrix}.$$

Os blocos, como definido em (22)*, ao longo da trajetória central dual são dados por:*

$$S_B(\mu) = \begin{pmatrix} 3\mu & 2^{-1}3^1\alpha^{-1}\mu \\ 2^{-1}3^1\alpha^{-1}\mu & 2^{-1}3^1\alpha^{-2}\mu \end{pmatrix}, \; S_T(\mu) = \begin{pmatrix} 2^{-2}3^{1/3}\beta^{-4/3}\alpha^{-4/3}\mu^{2/3} & 0 \\ 0 & 2^{-1}3^{-1/3}\beta^{-2/3}\alpha^{-2/3}\mu^{1/3} \end{pmatrix}, \; S_{BN}(\mu) = \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 0 \end{pmatrix},$$

$$S_N(\mu) = \begin{pmatrix} 3^{-1} & 3^{-1} \\ 3^{-1} & 1 \end{pmatrix}, \; S_{BT}(\mu) = \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 2^{-2}3^{1/3}\beta^{-1/3}\alpha^{-4/3}\mu^{2/3} \end{pmatrix}, \; S_{TN}(\mu) = \begin{pmatrix} 0 & 2^{-1}3^{-1/3}\beta^{-2/3}\alpha^{-2/3}\mu^{1/3} \\ 0 & 0 \end{pmatrix}.$$

A velocidade de convergência dos blocos X_T e S_T a zero é igual a velocidade de convergência de

$$\mu^{1/3},$$

quando μ tende a zero, ou seja, a ordem de convergência dos blocos é $1/3$.

Para encontrar o centro analítico primal devemos minimizar a função

$$f(x_{22}) = -logdet \begin{bmatrix} 1 & -\alpha x_{22}/2 \\ -\alpha x_{22}/2 & x_{22} \end{bmatrix} = -log(x_{22} - \alpha^2 x_{22}^2/4).$$

É fácil ver que f tem um único ponto de mínimo o qual é dado por: $x_{22} = 2/\alpha^2$. Assim, o centro analítico é dado por

$$\begin{bmatrix} 1 & -1/\alpha \\ -1/\alpha & 2/\alpha^2 \end{bmatrix}.$$

Mas o bloco $X_B(\mu)$, o qual é constante ao longo da trajetória central, é igual a

$$X_B(\mu) = \begin{bmatrix} 1 & -3^{-1}4\alpha \\ -3^{-1}4\alpha & 3^{-1}8\alpha^2 \end{bmatrix}.$$

Logo, para este exemplo, a trajetória central primal não converge para o centro analítico da face ótima primal.

Agora vejamos o centro anlítico da face ótima dual. Para encontrar o centro analítico devemos minimizar a função

$$f(y_5) = -logdet \begin{bmatrix} -y_5 & -y_5 \\ -y_5 & 1 \end{bmatrix} = -log(-y_5 - y_5^2).$$

É fácil ver que f tem um único ponto de mínimo o qual é dado por: $y_5 = -1/2$. Assim, o centro analítico é dado por

$$\begin{bmatrix} 1/2 & 1/2 \\ 1/2 & 1 \end{bmatrix}.$$

Mas o bloco $S_N(\mu)$, o qual é constante ao longo da trajetória central, é igual a

$$S_N(\mu) = \begin{bmatrix} 1/3 & 1/3 \\ 1/3 & 1 \end{bmatrix}.$$

Portanto, a trajetória central dual também não converge para o centro analítico da face ótima dual.

5 Comentários Finais

Nosso propósito com este trabalho foi o de melhorar o relatório de Iniciação Científica do orientando anterior do Professor Orizon Pereira Ferreira, Elias da Costa. Foram feitas demonstrações que não haviam sido feitas e acrescentadas algumas definições e teoremas, os quais julgamos ter importância para o bom entendimento do trabalho. É importante ressaltar que, por questões de espaço, foram omitidos as demonstrações de vários resultados. A classe de exemplos de trajetória central apresentada não convergem para o centro analítico da face ótima. Nossos exemplos diferem dos exemplos de [6], pois além de serem explícitos, tanto a trajetória primal quanto a dual não convergem para os respectivos centro analíticos dos conjuntos soluções associados. Este trabalho está seguindo em paralelo com o trabalho de Mayk Joaquim dos Santos [2], que também procura outras classes de exemplos e propriedades das mesmas.

Referências

[1] J. X. da Cruz Neto, O. P. Ferreira and R. D. C. Monteiro, *Asymptotic behavior of the central path for a special class of degenerate SDP problems*, Mathematical Programming, 103, no. 3, 487-514 (2005).

[2] M. J. dos Santos, *Exemplos de Trajetória Central em Programação Semidefinida*, Relatório PIBIC/UFG, (2008), pp. 1-12.

[3] E. da Costa, *Uma classe de trajetórias centrais em programação semidefinida que não convergem para o centro analítico da face ótima na ausência da estrita complementaridade*, Relatório PIBIC/UFG, (2006).

[4] E. M. Martins, *Comportamento Limite da Trajetória Central em Programação Linear*, Dissertação de Mestrado Ciência da Computação/UFG, (2007).

[5] D. Goldfarb and K. Scheinberg, *Interior point trajectories in semidefinite programming*, SIAM Journal on Optimization, 8 (1998), pp. 871–886.

[6] M. Halická, E. de Klerk, and C. Roos, *On the convergence of the central path in semidefinite optimization*, SIAM Journal on Optimization, 12 (2002), pp. 1090–1099.

[7] Z.-Q. Luo, J. F. Sturm, and S. Zhang, *Superlinear convergence of a symmetric primal-dual path-following algorithm for semidefinite programming*, SIAM Journal on Optimization, 8 (1998), pp. 59–81.

[8] M.J. Todd, *Semidefinite optimization* in Acta Numerica 10 (2001), pp. 515–560.

Desenvolvimento e aplicação de um algoritmo para o método de Difusão de Monte Carlo

Victor Giovanni* e Ladir Cândido*

***Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, 74.001-970, Goiânia (GO), Brasil.**

Endereço eletrônico: victorgpm@hotmail.com

Palavras-Chave: Monte Carlo de Difusão, Integral de Caminho, Sistema de Poucas Partículas.

I. INTRODUÇÃO

O grupo de Física Estatística, juntamente com seus colaboradores, vem desenvolvendo e aperfeiçoando um programa que implementa o Método de Difusão de Monte Carlo (DMC) para estudar sistemas quânticos governados pela equação de Schröedinger dependente do tempo

$$i\hbar\frac{\partial\Psi}{\partial t} = \hat{H}\Psi, \tag{1}$$

onde

$$\hat{H} = \frac{-\hbar^2}{2}[\frac{1}{m_1}\nabla_1^2 + \frac{1}{m_2}\nabla_2^2 + \cdots \frac{1}{m_n}\nabla_n^2] + V(x_1, y_1, z_1; x_2, y_2, z_2; \cdots; x_n, y_n, z_n). \tag{2}$$

A solução desta equação pode ser escrita como uma superposição de estados estacionários em que a dependência do tempo é dada pelo fator de fase $exp(-iE_nt/\hbar)$ onde E_k é o nível k de energia do sistema quântico em questão. No método DMC a solução é assumida no tempo imaginário fazendo a troca $t = -i\tau$. A solução da nova equação obtida é dada pela soma de termos transientes na forma $exp(-E_n\tau/\hbar)$. O método DMC é baseado na observação de que um sistema quântico evoluindo no tempo imaginário terá energia do estado fundamental dos termos transientes que satisfará a relação $E_0 < E_k$ para $k = 1, 2, ...$ Logo, a equação em que se baseia o método DMC é dada por

$$\hbar\frac{\partial\Psi}{\partial\tau} = -\hat{H}\Psi, \tag{3}$$

onde

$$\hat{H} = \frac{-\hbar^2}{2}[\frac{1}{m_1}\nabla_1^2 + \frac{1}{m_2}\nabla_2^2 + \frac{1}{m_n}\nabla_n^2] + [V(x_1, y_1, z_1; x_2, y_2, z_2; ...; x_n, y_n, z_n) - E_0]. \tag{4}$$

O método DMC pode ser formulado de duas maneiras diferentes. A primeira é baseada na semelhança entre a equação de Schröedinger no tempo imaginário e a equação de difusão generalizada, que pode ser resolvida por meio de cálculos estocásticos como foi primeiramente sugerido por Fermi segundo às referências [1,2]. A segunda maneira vem da resolução da equação de Schröedinger dependente do tempo por meio da integral de caminho de Feynman. A integral de caminho da função de onda pode ser expressa como uma integral multidimensional que pode ser evoluída utilizando o método de Monte Carlo [3]. Algoritmos para resolver a equação de difusão obedecida pela função de onda e algorítimos para evoluir a integral de caminho representam a mesma formulação do método DMC. Devido à importância que a mecânica quântica possui, escolhemos a formulação do método DMC baseado na integral de caminho.

A. INTEGRAL DE CAMINHO

A solução da equação de Schröedinger no tempo imaginário e em uma dimensão pode ser escrita como

$$\Psi(x,\tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} K(x,\tau \mid x_0,0)\Psi(x_0,0)dx_0 \tag{5}$$

onde o propagator $K(x,\tau|x_0,0)$ é expresso em termos da integral de caminho [4], modificada pela troca $t = -i\tau$ e dada por

$$K(x,\tau \mid x_0,0) = \lim_{N\to\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} dx_1 ... \int_{-\infty}^{+\infty} dx_{N-1} (\frac{m}{2\pi\hbar\Delta\tau})^{\frac{N}{2}} \times \tag{6}$$

$$\times exp(-\frac{\Delta\tau}{\hbar}\sum_{j=1}^{N}[\frac{m}{2\Delta\tau^2}(x_j - x_{j-1})^2 + V(x_j) - E_0]).$$

Aqui $\Delta\tau = \tau/N$ é um pequeno intervalo de tempo. Assim a função de onda $\Psi(x,\tau)$ pode ser escrita na forma

$$\Psi(x,\tau) = \lim_{N\to\infty} \int_{-\infty}^{\infty} (\prod_{j=0}^{N-1} dx_j) \prod_{n=1}^{N} W(x_n) XP(x_n, x_{n-1})\Psi(x_0,0), \tag{7}$$

onde foi definido que

$$P(x_n, x_{n-1}) \equiv (\frac{m}{2\pi\hbar\Delta\tau})^{\frac{1}{2}} exp[-\frac{m(x_n - x_{n-1})^2}{2\hbar\Delta\tau}] \tag{8}$$

e

$$W(x_n) \equiv exp[-\frac{[V(x_n) - E_0]\Delta\tau}{\hbar}], \tag{9}$$

II. OBJETIVOS

Neste trabalho desejamos contribuir e aperfeiçar o programa desenvolvido no grupo de Física Estatística do $IF - UFG$ e com ele estudar alguns sistemas cujos resultados existem na literatura, como o ponto quântico de hélio, o átomo de hidrogênio, o átomo de hélio e o átomo de lítio.

III. METODOLOGIA

Com o estado inicial do sistema especificado, o método DMC obtém a energia e a função de onda de um sistema quântico no estado fundamental, por meio da simulação numérica da equação de Schröedinger no tempo imaginário. A função de onda do estado inicial $\Psi(x_{1,0}, y_{1,0}, z_{1,0}; x_{2,0}, y_{2,0}, z_{2,0}; ...; x_{n,0}, y_{n,0}, z_{n,0})$ geralmente é escolhida como uma função Delta de Dirac. Isto é feito colocando todas as partículas, chamados de caminhantes, na posição (x_0, y_0, z_0), onde deslocamentos difusivos são feitos logo após, para produzir novas posições dadas por

$$x_{1,1} = x_{1,0} + \sigma\rho_1, y_{1,1} = y_{1,0} + \sigma\rho_2, z_{1,1} = z_{1,0} + \sigma\rho_3$$

$$\vdots$$

$$x_{n,1} = x_{n,0} + \sigma\rho_{k-2}, y_{n,1} = y_{n,0} + \sigma\rho_{k-1}, z_{n,1} = z_{n,0} + \sigma\rho_k$$

por meio da geração de uma série de números randômicos ρ_a, $a = 1, 2, ..., k$, onde $\sigma = \sqrt{\hbar\Delta\tau/m}$ vem do formalismo da integral de caminho. Após os deslocamentos difusivos é iniciado o processo Vida/Morte. Ele consiste em replicar cada partícula por um número m_n que é dado por

$$m_n = min[int[W(x_n) + u], 3] \tag{10}$$

onde u representa um número randômico homogeneamente distribuído entre [0,1]. Se $m_n = 0$, a partícula é "deletada"; se $m_n = 1$, a partícula não é atingida por nenhum processo ;se

$m_n = 2$, uma nova partícula é criada e se $m_n = 3$, duas novas partículas são criadas. Estas partículas que são criadas são colocadas na mesma posição da partícula que as gerou. Será imposta a limitação de que $m_n < 4$, para não gerar instabilidade no sistema. A energia do sistema calculada logo após o primeiro processo de Vida/Morte é dada por

$$E_R^{(2)} = E_R^{(1)} + \frac{\hbar}{\Delta\tau}(1 - \frac{N_1}{N_0}) \tag{11}$$

onde

$$E_R^{(1)} = \langle V \rangle_1 \tag{12}$$

e

$$\langle V \rangle_1 = \frac{1}{N_1} \sum_{j=1}^{N_1} V(x_1^{(j)}), \tag{13}$$

N_1 sendo igual ao número de partículas do sistema após o primeiro processo de Vida/Morte e $\langle V \rangle_1$ é a média da energia potêncial. Após k processos de Vida/Morte, se a energia de referência não oscilar muito pode-se encontrar a energia do estado fundamental que será igual a

$$E_0 = \lim_{n \to k} \langle V \rangle_n, \tag{14}$$

e a função de onda do estado fundamental será igual a

$$\Psi_0(x_i) = \frac{N_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n_b} N_i^2}}, i = 1, 2, ..., nb \tag{15}$$

onde n_b é o número de intervalos em que o sistema está dividido.

A. OPTIMIZAÇÃO DA FUNÇÃO DE ONDA

Um cálculo típico de DMC para estimar a energia e outros valores esperados para uma dada função de onda pode envolver o cálculo do valor da função de onda e seu gradiente e Laplaciano em alguns milhões de pontos distribuídos no espaço de configuração. Por esses cálculos possuírem maior custo computacional, é realizado o processo chamado de opitimização da função de onda. Neste processo, é escolhida uma função a ser minimizada

com respeito a algum parâmetro da função de onda, como a energia, inicialmente sugerido por Ceperley [5]

$$E_V(\alpha) = \frac{\int \Psi_T^2(\alpha) E_L(\alpha) d\overrightarrow{R}}{\int \Psi_T^2(\alpha) d\overrightarrow{R}}, \tag{16}$$

onde Ψ_T é a função de onda tentativa que depende do parâmetro (α) e E_L é a energia local e dada por $\Psi_T^{-1}(\alpha)\hat{H}\Psi_T(\alpha)$. Uma alternativa é minimizar a variância da energia

$$\sigma^2(\alpha) = \frac{\int \Psi_T^2(\alpha)[E_L(\alpha) - E_V(\alpha)]^2 d\overrightarrow{R}}{\int \Psi_T^2(\alpha) d\overrightarrow{R}}, \tag{17}$$

que possui a vantagem de minimizar o erro estatístico. Outra alternativa é minimizar alguma combinação da variância como $\frac{\sigma^2}{E_V^2}$, que foi sugerido por Meierovich, Mushinski e Nightingale [6].

1. *CORRELATED SAMPLING*

Na prática é usado o método Correlated Sampling (amostragem correlacionada) para não ter de gerar um novo conjunto de configurações toda vez que o valor do parâmetro é mudado. Isto significa que uma configuração distribuída de acordo com $\Psi^2(\alpha_0)$ é gerado, onde α_0 é um parâmetro inicialmente escolhido, assim a variância pode ser escrita como

$$\sigma^2(\alpha) = \frac{\int \Psi_T^2(\alpha_0) w(\alpha)[E_L(\alpha) - E_V(\alpha)]^2 d\overrightarrow{R}}{\int \Psi_T^2(\alpha_0) w(\alpha) d\overrightarrow{R}}, \tag{18}$$

onde

$$E_V(\alpha) = \frac{\int \Psi_T^2(\alpha_0) w(\alpha) E_L(\alpha) d\overrightarrow{R}}{\int \Psi_T^2(\alpha_0) w(\alpha) d\overrightarrow{R}} \tag{19}$$

e a integral contém uma função peso $w(\alpha)$ dada por

$$w(\alpha) = \frac{\Psi_T^2(\alpha)}{\Psi_T^2(\alpha_0)} \tag{20}$$

A aplicação direta do Correlated Sampling pode ser ineficiente para optitimizar uma função de onda com muitos parâmetros. Neste caso optitimizar usando derivadas é mais vantajoso [7]. A derivada da energia de uma função de onda com um parâmetro $\Psi(\alpha) = \Psi_T(\overrightarrow{R}; \alpha)$ é dada por

$$\frac{\partial < H(\alpha) >}{\partial \alpha} = \frac{2\int \frac{\partial \Psi(\alpha)}{\partial \alpha} H\Psi(\alpha) d\overrightarrow{R}}{\int \Psi^2(\alpha) d\overrightarrow{R}} - \frac{2\int \Psi(\alpha) H\Psi(\alpha) d\overrightarrow{R}}{\int \Psi^2(\alpha)} \frac{\int \frac{\partial \Psi(\alpha)}{\partial \alpha} \Psi(\alpha) d\overrightarrow{R}}{\int \Psi^2(\alpha) d\overrightarrow{R}}, \tag{21}$$

multiplicando e dividindo por $\Psi^2(\alpha)$ nós obtemos

$$\frac{\partial < H(\alpha) >}{\partial \alpha} =< \frac{\partial}{\partial \alpha} ln|\Psi(\alpha)|^2 E_L(\alpha) > - < \frac{\partial}{\partial \alpha} ln|\Psi(\alpha)|^2 >< E_L(\alpha) > . \quad (22)$$

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para simular os átomos de hidrogênio, de hélio e de lítio utilizamos a função de onda proposta por Umrigar, Wilson e Wilkins [8]

$$\Psi = \sum_{n=1}^{N_{det}} (d_n D_n^{\uparrow} D_n^{\downarrow}) \prod_{i<j} exp[\frac{a_{ij} r_{ij}}{(1 + b r_{ij})}], \quad (23)$$

onde $D^{\uparrow}$ e $D^{\downarrow}$ são as determinantes de Slater [9] de spin "up" e "down" , respectivamente, r_{ij} é a distância entre os elétrons de número i e j, b é um parâmetro a ser encontrado e a é uma constante dependende do spin e dada pela condição de corte [10]. Todos os átomos simulados eram tridimensionais, simulamos o átomo de hidrogênio com 5000 caminhantes em 100 blocos e com passo de 0.0001, o átomo de hélio simulamos com 500 caminhantes em 100 blocos e com passo de 0.05 e o átomo de lítio simulamos com 500 caminhantes em 100 blocos e com passo de 0.5. As energias do estado fundamental foram, então, obtidas e estão mostradas na Tabela I.

Sistema	Energia (Este Trabalho)	Energia (Literatura)	Erro percentual
H	-0.516	-0.499[11]	3.40%
He	-2.921	-2.903[12]	0.62%
Li	-7.498	-7.478[13]	0.27%

Tabela I: Na segunda coluna estão as energias do estado fundamental (em Hartree) simuladas, na terceira os valores de referência e na quarta os erros percentuais.

Simulamos o ponto quântico de hélio, que consiste de duas partículas carregadas e confinadas por um potencial harmônico [14], com a função de onda proposta por Umrigar, Wilson e Wilkins [8], simulamos com a proposta de Francesco, Umrigar e Lipparini [15] dada por

$$\Psi(\overrightarrow{R}) = exp[\Phi(\overrightarrow{R})], \quad (24)$$

onde

$$\Phi(\overrightarrow{R}) = \sum_{i<j}^{N} \frac{1}{2} (\frac{a_{ij} r_{ij}}{1 + b(r_i) r_{ij}} + \frac{a_{ij} r_{ij}}{1 + b(r_j) r_{ij}}), \quad (25)$$

e

$$b(r) = b_0^{ij} + b_1^{ij} tan^{-1}[(r - R_c)^2/2R_c\Delta], \tag{26}$$

onde R_c é o raio efetivo do ponto quântico dado por $1.93\sqrt{N}$, b_0 e b_1 são parâmetros que dependem unicamente do spin relativo das partículas i e j. Também simulamos o ponto quântico de hélio para várias optimizações da função de onda. Os resultados estão mostrados na tabela II e III.

Opitimização	Energia do estado fundamental (Este Trabalho)
Energia	3.0014
Correlated	3.0013
Derivada	3.0002

Tabela II: Energia do estado fundamental de várias opitimizações da função de onda para o ponto quântico de hélio da equação (23).

Opitimização	Energia do estado fundamental (Este Trabalho)
Energia	3.0123
Correlated	3.0023
Derivada	3.0602

Tabela III: Energia do estado fundamental de várias opitimizações da função de onda para o ponto quântico de hélio da equação (26).

As Tabelas II e III mostram a boa concordância dos resultados das simulações com os da literatura exposto por Orion e Golam [16].

V. CONCLUSÕES

Simulamos os átomos de H, He e Li tridimensionais e verificamos a boa concordância dos resultados obtidos com os existentes na literatura. Também simulamos o ponto quântico de hélio bidimensional para várias opitimizações da função de onda e também verificamos uma boa concordância com os resultados existentes na literatura. Verificamos assim que o programa desenvolvido e aperfeiçoado pelo grupo de Física Estatística do $IF - UFG$

conseguiu, com sucesso, obter as propriedades desejadas para todos os sistemas estudados. Logo, ele está pronto para ser aplicado em sistemas originais.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] D. Cerpeley e B. Alder, Science 231, 555 [1986].

[2] M. H. Kalos and P. A. Whitlock, Monte Carlo methods (J. Wiley Sons, New York, 1986).

[3] Allen, M. P. e Tildesley D. J., Computer Simulation of Liquids (Clarendon Press. Oxford,1990).

[4] R. P. Feynman and a. R. Hibbs, Quantum mechanics and path integrals (McGraw-Hill, 1965).

[5] D. M. Ceperley, Journal of Statistical Physics 43, 815 [1986].

[6] M. Meierovich, A. Mushinkski, e M. P. Nightingale, Journal of Chemical Physics 105, 6498 [1996].

[7] H. Bueckert, S. M. Rothstein, e J. Vrbik, Journal of Chemical Physics 70, 366 [1992].

[8] C. J. Umrigar, K. G. Wilson, e J. W. Wilkins, Physical Review Letters 60, 1719 [1987].

[9] J. C. Slater, Physical Review 42, 33 [1932].

[10] Reviews of Modern Physics 73, 1 [2001].

[11] V. Popusueva, Thesis presented for the degree of candidata scientiarum, Unyversity of Oslo, 2004.

[12] A. Saleh-Jahromi e W. Moebs, European Journal of Physics, 19, 355 [1998].

[13] M. Puchalski e K. Pachucki, Physical Review A 73, 022503 [2006].

[14] D. Pfannkuche, V. Gudmundsson e P. A. Maksym, Physical Review B 47, 2244 [1992].

[15] F. Pederiva, C. J. Umrigar e E. Lipparini, Physical Review B 62, 8120 [2000].

[16] O. Ciftja e M. G. Faruk, Physical Review B 72, 205334 [2005].

IMPACTO DAS CONDIÇÕES DE SAÚDE BUCAL NA PREFERÊNCIA POR TRATAMENTOS PROTÉTICOS EM DESDENTADOS TOTAIS

Naiara de Paula Ferreira[1], Cláudio Rodrigues Leles[1]

[1] Departamento de Prevenção e Reabilitação Oral, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-Goiás, Brasil.

naiaradepaula@gmail.com

Descritores: desdentados totais, preferências protéticas, eleição/recusa de tratamentos

INTRODUÇÃO

As noções de saúde e doença são concebidas por cada indivíduo de acordo com seus próprios critérios (UNFER, SALIBA; 2000), uma vez que não é só a presença de sintomas ou limitações na função que afetam a qualidade de vida, mas sim como estes elementos são significantes para ele (LEÃO; SHEIHAM, 1995; LOCKER, 1997). Sendo assim, as preferências por tipos de tratamentos reabilitadores dependem de uma série de fatores que são bem individuais, baseados em experiências anteriores, valores pessoais e condições sócio-econômicas.

Muitos estudos já verificaram a influência do impacto das condições de saúde bucal na qualidade de vida (REISINE; BALIT, 1980; LEÃO; SHEIHAM, 1995; LOCKER, 1997; RICH; GOLDSTEIN, 2002; LELES; FREIRE, 2004), mas poucos exploram a possível relação dessa influência nas preferências de tratamento (SILVERMAN; ALTMAN, 1996; SCHOUTEN; HOOGSTRATEN; EIJKMAN, 2003) – e, mais escassos ainda, são os estudos que relacionam a influência dos impactos das condições de saúde bucal em pacientes desdentados totais.

Estudos prévios encontrados na literatura confirmaram a influência de condições de saúde bucal na determinação do tratamento a ser seguido (ESFANDIARI; ZUND, RENROD *et al.*, 2009). Uma recente revisão sistemática publica (EMANI; HEYDECKE; ROMPRÉ *et al.*, 2009) indicou que o custo e/ou o desejo por arcar financeiramente com o tratamento tem se mostrado uma variável importante quando se trata das opções de tratamento para pacientes desdentados totais. No entanto, a maioria dos estudos analisados se referem à populações de países desenvolvidos.

Existem inúmeras variáveis clinicas em pacientes desdentados totais que podem modificar sua visão de necessidade de tratamento, tais como apresentação anatômica e contato prévio com outros tipos de próteses. Além dos aspectos clínicos, dados sócio-econômicos, como renda e escolaridade e a maneira como a saúde bucal influência a qualidade de vida do indivíduo, podem influenciar a percepção e escolhas do paciente.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo é verificar a influência das condições de saúde bucal na escolha por tratamentos protéticos em pacientes desdentados totais de uma instituição pública de ensino odontológico no Brasil.

MATERIAL E MÉTODO

Após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (UFG), sob o parecer n°072/2007, foi realizado um estudo do tipo transversal em pacientes (n= 112) adultos (acima de 18 anos) totalmente desdentados que estiveram em atendimento nas clínicas de graduação e pós-graduação da Faculdade de Odontologia (FO) da UFG no período compreendido entre agosto de 2008 a junho de 2009.

Os critérios de inclusão foram a maioridade e a capacidade de entender e responder ao questionário, não existindo limite de idade, além da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A coleta de dados ocorreu por meio de entrevistas, através dos seguintes instrumentos que compõem o questionário:

- Questões de Identificação: composto por perguntas abertas e fechadas, com perguntas referentes à identificação (nome, endereço e telefone) e itens sócio-demográficos (gênero, idade, nível de escolaridade, estado civil e renda famiiar). Foi questionado a idade em que o paciente teve a primeira perda, a idade em que começou a utilizar próteses e quais tipos de próteses já fez uso.

- Instrumento contendo o *Oral Health Impact Profile for assessing edentulous subjects* (OHIP-edent) (SOUZA *et al.*, 2007), que questionou a satisfação com a prótese que usam e se conheciam todas as possibilidades protéticas para o seu caso.

Foi elaborado um banco de dados com as respostas dadas e o tratamento estatístico utilizou-se do Programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS for Windows, versão 14). Foi feita a análise descritiva por meio da análise de frequência para os dados categóricos, média e desvio-padrão para os dados numéricos. As variáveis independentes foram analisadas através de regressão logística múltipla e aos escores de OHIP, bem como aos seus domínios, foram aplicados o Teste de Mann-Whitney.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra estudada constituía-se em 112 participantes, sendo 50% do gênero feminino, com idade variando entre 33 e 79 anos (média=56,4; DP=12,3). A maioria era casada ou vivendo com companheiro (63,4%) e de baixa escolaridade, sendo que 71,4% apresenta até o ensino fundamental completo. A amostra é basicamente de indivíduos de baixa renda, com renda mensal variando entre R$180,00 e R$2000,00 (média= R$588,00; mediana=R$415,00). Quando questionados para auto-avaliarem sua condição financeira, 21,4% a considerou ruim ou muito ruim, 60,7% regular e apenas 17,9% como boa ou muito boa.

Na avaliação clínica foi observado que a média de idade dos indivíduos quando tiveram a primeira perda dentária foi de 20,6 anos (desvio padrão=5,6). Na arcada superior apenas 12,5% dos pacientes não utilizam prótese e 28,6% na arcada inferior.

Quando questionados sobre a preferência por tratamentos reabilitadores para as arcadas superior e inferior (tabela 1), a amostra se dividiu entre aqueles que optaram por reabilitação com prótese total convencional (PTC) (n=44) e prótese sobre implantes (PSI) (n=46), sendo esta dividida entre overdenture (sobredentadura) e prótese total fixa sobre implantes (tabela 2).

Tabela 1. Número de indivíduos por preferência por tratamentos reabilitadores para as arcadas superior e inferior (% entre parênteses).

	Arcada Superior f (%)	Arcada Inferior f (%)
Prótese Total convencional	59 (52,6)	46 (41,1)
Overdenture (sobredentadura)	21 (18,8)	22 (19,6)
Prótese Total fixa sobre implantes	32 (28,6)	44 (39,3)
TOTAL	112 (100)	112 (100)

Tabela 2. Número de indivíduos por preferência de tratamento Arcada Superior x Arcada Inferior.

		Tipo de Tratamento Arcada Inferior		
		Convencional	Sobre implantes	Total
Tipo de Tratamento Arcada Superior	Convencional	44	15	59
	Sobre implantes	22	51	53
	Total	46	66	112

A influência de variáveis clínicas e sócio-econômicas sobre a preferência de tratamento (variável dependente) foi analisada através de regressão logística múltipla (Tabela 3). Os resultados mostraram que a preferência por implantes foi associada à idade mais jovem (OR=0,96; IC95%=0,92-0,99), auto-avaliação financeira mais favorável (OR=2,74; IC95%=1,36-5,50) e maior impacto da condição bucal na qualidade de vida (OR=1,08; IC95%=1,01-1,14).

Tabela 3. Regressão logística múltipla da influência das variáveis independentes sobre a preferência de tratamento com prótese sobre implantes (overdenture + prótese fixa sobre implantes).

Variável	β	p	Exp β (IC95%)
Idade	-0,045	0,016	0,96 (0,92-0,99)
Auto-avaliação financeira	1,009	0,005	2,74 (1,37-5,50)
OHIP-edent	0,073	0,015	1,08 (1,01-1,14)
R^2=0,26			
Categoria de referência (O): Prótese Total COnvencional			

Os escores de OHIP foram comparados entre os grupos PTC e PSI (Tabela 4), mostrando que os escores total e dos quatro domínios foram significativamente menores no grupo PSI (p<0,05).

Tabela 4. Escore OHIP total e entre os domínios nos grupos PTC (n=44) e PSI (n=68).

Escala	Grupo	Média (DP)	Mediana (Intervalo interquartil)	p*
OHIP total	PTC	11,34 (7,42)	12,0 (14,0)	0,007
	PSI	15,63 (7,60)	14,5 (10,0)	
Domínio: Queixas em relação à mastigação	PTC	2,79 (2,18)	3,0 (4,0)	0,041
	PSI	3,69 (1,68)	3,0 (3,0)	
Domínio: Desconforto psicológico	PTC	3,27 (2,71)	3,0 (5,0)	0,032
	PSI	4,48 (3,04)	4,0 (5,0)	
Domínio: Inabilidade social	PTC	2,25 (2,90)	1,0 (4,5)	0,036
	PSI	2,86 (2,82)	2,0 (3,75)	
Domínio: Aspectos relacionados à dentadura	PTC	3,02 (2,15)	3,0 (3,0)	0,001
	PSI	4,58 (2,31)	4,0 (2,0)	

PTC – Prótese Total Convencional
PSI – Prótese sobre Implantes
* Teste de Mann-Whitney

Vários estudos avaliaram o grau de satisfação de pacientes após tratamento protético: Celebic e Knezovic-Zlataric (2003) verificaram que de maneira geral, tanto usuários de próteses totais e de próteses parciais removíveis estavam satisfeitos com suas próteses, sendo que os usuários de próteses totais estavam mais satisfeitos quanto à fonação, mastigação e retenção da prótese maxilar e os usuários de próteses parciais removíveis quanto à retenção e conforto da prótese mandibular. Outros estudos mostram que o grau de satisfação de pacientes

reabilitados com sobredentaduras (overdentures) mandibulares antagonistas de próteses totais convencionais é maior que de pacientes reabilitados apenas com próteses totais convencionais (ALLEN; MCMILLAN; WALSHAW, 2001; THOMASON et al., 2003). Quanto ao tratamento com implantes, o nível de satisfação do paciente em relação à funcionalidade e estética é considerado alto (PJETURSSON et al., 2005).

O paciente, a cada dia, deixa de ser o sujeito passivo nas tomadas de decisões de tratamentos, passando a colaborar e a dividir as decisões com o profissional de saúde. Além de desejar receber todas as informações inerentes a um tratamento, a maioria dos pacientes prefere participar da tomada de decisão do melhor tratamento para ele mesmo.

A definição de saúde pode variar de acordo com contextos sociais, culturais e políticos. Definições de saúde e qualidade de vida envolvem julgamentos pessoais e sociais (LOCKER, 1997). Respeitar as diferenças de cada indivíduo é função do profissional de saúde, tanto médico, como dentista. As atitudes e sentimentos dos pacientes desdentados são influenciados por fatores como adaptação às limitações, expectativas pessoais de saúde e aos componentes culturais e sociais no qual o indivíduo está inserido. Assim, no momento de discussão com o paciente sobre as modalidades de tratamentos protéticos, o dentista deve considerar estes aspectos, que irão influenciar na opinião do paciente.

Assim, para informar melhor e conseguir atingir as expectativas dos pacientes, é imperativo que o cirurgião-dentista conheça as crenças dos pacientes e saiba os motivos que levam um paciente a escolher ou a recusar, por exemplo, tipos de próteses dentárias, para que juntos, discutam e definam a melhor forma de tratamento para cada caso, evitando-se frustrações quando do fim dos tratamentos.

CONCLUSÕES

- Pacientes mais jovens, maiores escores do OHIP-edent e melhor condição financeira apresentam maior chance de preferência por tratamentos com implantes.
- A escolha da melhor opção de tratamento pode ter como parâmetros principais a idade do paciente, qualidade de vida e sua condição de arcar com os custos do tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, P.F.; MCMILLAN, A.S.; WALSHAW, D. A patient-based assessment of implant-stabilized and conventional complete dentures. **J Prosthet Dent**, v. 85, n. 2, p. 141-7, 2001.

CELEBIC, A.; KNEZOVIC-ZLATARIC, D. A comparison of patient's satisfaction between complete and partial removable denture wearers. **J Dent**, v. 31, n. 7, p. 445-51, 2003.

EMAMI, E.; HEYDECKE, G.; ROMPRÉ, P.H.; GRANDMONT, P.; FEINE, J.S. Impact of implant support for mandibular dentures on satisfaction, oral and general healthrelated quality of life: a meta-analysis of randomized-controlled trials. **Clin Oral Impl Res**, n. 20, p. 533-44, 2009.

ESFANDIARI, S.; LUND, J.P.; PENROD, J.R.; SAVARD, A.; THOMASON, J.M; FEINE, J.S. Implant overdentures for edentulous elders: study of patient preference. **Gerodontology**, n. 26, p. 3-10, 2009.

LEÃO, A.; SHEIHAM, A. Relation between clinical dental status and subjective impact on daily living. **J Dent Res**, v. 74, n. 7, p. 1408-13, 1995.

LELES, C.R.; FREIRE, M.C.M. A sociodental approach in prosthodontic treatment decision making. **J Appl Oral Sci**, v. 12, n. 2, p. 127-32, 2004.

LOCKER, D. Clinical correlates of changes in self-perceived oral health in older status. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 25, n. 3, p. 199-203, 1997.

PJETURSSON, B.E.; KAROUSSIS, I.; BURGIN, W.; BRAGGER, U.; LANG, N.P. Patient's satisfaction following implant therapy. A 10-year prospective cohort study. **Clin Oral Impl Res**, v. 16, n. 2, p. 185-93, 2005.

REISINE, S.T.; BAILIT, H.L. Clinical oral health status and adult perceptions of oral health. **Soc Sci Med**, v. 14A, p. 597-605, 1980.

RICH, B.; GOLDSTEIN, G.R. New paradigms in prosthodontic treatment planning. A literature review. **J Prosthet Dent**, v. 88, n. 2, p. 208-14, 2002.

SCHOUTEN, B.C.; HOOGSTRATEN, J.; EIJKMAN, M.A. Patient participation during dental consultations: the influence of patient's characteristics and dentist's behavior. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 31, n. 5, p. 368-77, 2003.

SILVERMAN, W.A.; ALTMAN, D.G. Patient's preferences and randomized trials. **Lancet**, v. 347, n. 8995, p. 171-4, 1996.

SOUZA, R.F.; PATROCINIO, L.; PERO, A.C.; MARRA, J.; COMPAGNONI, M.A. Reliability and validation of a Brazilian version of the Oral Health Impact Profile for assessing edentulous subjects. **J Oral Rehabili**, v. 34, n. 11, p. 821-6, 2007.

THOMASON, J.M.; LUND, J.P.; CHEHADE, A.; FEINE, J.S. Patient satisfaction with mandibular implant overdentures and conventional dentures 6 months after delivery. **Int J Prosthdont**, v. 16, n. 5, p. 467-73, 2003.

UNFER, B.; SALIBA, O. Avaliação do conhecimento popular e práticas cotidianas em saúde bucal. **Rev Saúde Pública**, v. 34, n. 2, p. 190-5, 2000.

AGRICULTURA FAMILIAR E IDENTIDADES SOCIAIS: as comunidades rurais no município de Catalão (GO)

Laila Maria de Sousa Naves
Graduanda do Curso de Geografia, Universidade Federal de Goiás, Campus Catalão. Núcleo de Estudos e Pesquisas Sócio-Ambientais (NEPSA) - Bolsista PIBIC/CNPq/UFG.
E-mail: Laila_naves@hotmail.com

Estevane de Paula Pontes Mendes
Professora Doutora do Curso de Geografia, Universidade Federal de Goiás, Campus Catalão. Núcleo de Estudos e Pesquisas Sócio-Ambientais (NEPSA). E-mail: iemendes@ibest.com.br

Palavras-chave: Agricultura familiar. Cultura. Identidade. Catalão (GO).

1 Introdução

A temática agricultura familiar vem sendo discutida mais intensamente no Brasil desde meados da década de 1990, em decorrência do processo de desenvolvimento do capitalismo no campo. O aumento dessas discussões é reflexo da conjugação de uma série de fatores, como as implicações decorrentes da grande concentração fundiária que se originou da organização sócio-política e econômica imposta pelos colonizadores e reforçadas por segmentos do governo comprometidos com os interesses dos grandes fazendeiros. As diferentes realidades apresentadas ao longo do território nacional, os interesses internacionais e a ação de movimentos que lutam pela redistribuição da terra também tiveram participação na retomada das discussões.

Em suma, a agricultura familiar caracteriza-se pela forte correlação entre terra, trabalho e família. Cada família é detentora da terra, dos instrumentos de trabalho e de um conjunto de técnicas tradicionais utilizadas na administração do patrimônio. A força de trabalho empregada é composta pelos próprios membros da família e, de acordo com a necessidade da unidade produtiva, por trabalhadores temporários. É importante salientar que a agricultura familiar tem um papel relevante na economia brasileira, pois ela tem a capacidade de produzir gêneros alimentícios para o mercado consumidor interno e ainda suprir as necessidades do grupo familiar.

A chegada e a consolidação do capitalismo no setor agrário brasileiro data na década de 1960, tendo como objetivo a modernização tecnológica da agricultura. Esse processo trouxe com ele uma série de transformações na vida dos agricultores familiares, que passaram a enfrentar problemas econômicos, sociais e territoriais.

Para conseguir se reproduzir nas sociedades modernas, a agricultura familiar teve que passar por uma adaptação que permitiu a ela conciliar suas tradições com a nova realidade trazida pelo capitalismo e pela modernização tecnológica do

campo. Dessa forma, não houve uma ruptura completa com o modo de vida cultivado pelas gerações anteriores, uma vez que são as tradições existentes que possibilitaram as estratégias necessárias.

As comunidades rurais do município de Catalão, Estado de Goiás, são um campo propício ao estudo e à compreensão das condições de vida do produtor familiar contemporâneo. Nelas, é possível observar um grande conjunto de manifestações culturais que exemplificam o processo de reprodução da identidade cultural das famílias rurais.

O município de Catalão, Estado de Goiás, está compreendido entre os meridianos de 47º17 e 48º 12' Long. W Grt e os paralelos 17º28' e 18º Lat. S, abrangendo uma área de 3.778,6km² (IBGE – Censo, 2007), o que corresponde a 1,11% do território goiano. A Microrregião de Catalão integra-se à Mesorregião do Sul Goiano (IBGE, 1990). Em seu contexto socioespacial, o município de Catalão possui quatro povoados: Olhos D'água, Pedra Branca, Cruzeiro dos Martírios e Cisterna, e dois distritos: Santo Antônio do Rio Verde e Pires Belo. A população está estimada em 75.623 habitantes, com 92,84% residindo na zona urbana e 7,16% na zona rural.

Esse trabalho propõe analisar o comportamento sociocultural, econômico e organizacional das comunidades rurais localizadas no município de Catalão (GO), que utilizam o território como espaço produtivo, para constituição de seu patrimônio familiar e para a estruturação de um espaço de trabalho da família. Essa pesquisa foi realizada a partir de uma revisão de literatura, utilizando-se obras que tratam das temáticas agricultura familiar, territorialidade e cultura, além de trabalhos que exploram a realidade dos produtores rurais do município de Catalão (GO).

As comunidades rurais pesquisadas localizam-se na parte noroeste e nordeste da cidade de Catalão. Na parte nordeste encontram-se as comunidades: Coqueiro (aproximadamente 15Km da sede do município), Mata Preta (aproximadamente 15Km da sede do município), Cisterna (aproximadamente 35Km da sede do município) e Ribeirão (30Km da sede do município). Já na parte nordeste estão localizadas as Comunidades: São Domingos (aproximadamente a 30km) e Cruzeiro dos Martírios (aproximadamente 90km da sede do município). A principal via de acesso a essas comunidades é a BR-050 (rodovia que liga Brasília a São Paulo).

A escolha das comunidades assentou-se, principalmente, em estudos já realizados sobre as comunidades rurais no município de Catalão (GO), como os de

Mendes (2005), Martins Silva (2008) e Venâncio (2008), cujos levantamentos detectaram um considerável número de unidades produtivas que utilizam mão-de-obra predominantemente familiar, e, ainda, a fatores como o tamanho das propriedades e a existência de estratégias de reprodução das comunidades rurais.

As unidades produtivas baseadas na agricultura familiar utilizam-se de uma série de estratégias, combinando produções agrícolas e não agrícolas e formas de trabalho não-assalariadas, o que permite uma maior aceitação dos seus produtos junto aos consumidores. Sua reprodução pode ser compreendida como um processo de valorização dos recursos disponíveis na propriedade e na sua integração com o mercado, garantindo um local de vida e trabalho onde seja possível preservar a memória e as tradições familiares.

2 Objetivos

Esse trabalho propõe analisar o comportamento sociocultural, econômico e organizacional das comunidades rurais localizadas no município de Catalão (GO), que utilizam o território como espaço produtivo, para constituição de seu patrimônio familiar e para a estruturação de um espaço de trabalho da família.

3 Metodologia

Inicialmente, foi realizada uma pesquisa a partir de uma revisão de literatura, utilizando-se obras que tratam das temáticas agricultura familiar, territorialidade e cultura, no âmbito nacional, regional e local. Em seguida, foi feito um levantamento de dados em fontes secundárias, como no Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE - Posto Catalão), na Secretaria de Planejamento e Desenvolvimento do Estado de Goiás (SEPLAN), na Secretária Municipal de Saúde e na Agência Rural Goiana (AGR), tendo como principal intuito caracterizar o município de Catalão, Estado de Goiás, e as comunidades estudadas. Além disso, foram analisados aspectos teóricos e dados empíricos de trabalhos que exploram a realidade dos produtores familiares do município de Catalão (GO) sobre algumas comunidades rurais do município onde se verifica a agricultura familiar, podendo citar Mendes (2005, 2008), Martins Silva (2008), Venâncio (2008). Além dos trabalhos de Woortmann e Woortmann (1997), Tedesco (1999) e Lamarche (1997).

Os procedimentos de pesquisa e análise da natureza socioeconômica foram realizados com base em procedimentos proposto por autores como Seabra (1997) e Luna (2004) que consistiu no levantamento de referências, o que permitiu

elaboração de fichamentos para compor um banco de dados sobre o tema da pesquisa (complicação); no estudo da correlação entre dados da mesma natureza, o que possibilitou elucidar a evolução de um conceito e destacar suas principais divergências (correlativo); na elaboração do referencial teórico básico da pesquisa, a fim de assegurar a interpretação e a elaboração dos resultados conclusivos (semântico); e, por fim, na transformação das informações obtidas durante o processo de pesquisa em gráficos e tabelas levando á interpretação simples e visual dos produtos obtidos (normativo).

4 Discussão e Resultados

4.1 A agricultura familiar e a modernização da agricultura

Dentro das unidades de produção familiar, a família assume um papel de grande importância, uma vez que ela constitui a unidade de trabalho e de exploração da propriedade. É importante dizer que as primeiras famílias a habitarem as regiões rurais do município de Catalão (GO) chegaram ao final do século XIX, favorecidas pela construção da Rede Ferroviária Federal, sendo, em sua maioria, de origem portuguesa. Essas famílias vieram com o objetivo de retirar a mata nativa para cultivar a terra e criar pequenos rebanhos, tudo em favor do sustento familiar. Segundo Mendes (2008), essas primeiras famílias eram numerosas, contendo entre sete e quatorze filhos e conseguiram, ao longo das gerações, manter muitos dos seus costumes.

Nessas famílias, o trabalho era considerado como um complemento à educação dos filhos, que costumavam enfrentar longas jornadas – em alguns casos, chegando a dez, doze horas diárias pois “o conhecimento técnico, apreendido no decorrer da formação cultural dos descendentes, é visto como essencial para assegurar a sua própria reprodução.” (MENDES, 2008, p. 150). As filhas acompanhavam as mães nos mais diversos trabalhos domésticos. As mães, como as principais responsáveis pela construção dos laços familiares, possuíam ocupações das mais diversas: buscava água nos córregos, recolhiam lenha, cultivavam hortaliças, socavam arroz no pilão, faziam polvilho, farinha de mandioca, teciam, costuravam, cozinhavam e, além de tudo, cuidavam dos filhos e dos serviços domésticos.

Os estudos de Mendes (2005) revelam que atualmente, as filhas, ainda, continuam ajudando as mães nos serviços domésticos da casa, cuidando das

criações e também da horta. Já os filhos homens, a partir dos dez anos, ajudam os pais, acompanhando-os nas atividades na propriedade, trabalhando com gado, plantio, colheita, capina e serviços de manutenção. Todavia, é importante salientar que alguns filhos de produtores costumam se empregar em outras propriedades de melhores condições financeiras e com pouca mão de obra disponível e que nem sempre essa atitude é feita com o intuito de complementar a renda familiar. Os ganhos, nesse caso, são revertidos em bens como roupas e eletroeletrônicos. Outro fator a ser destacado sobre as comunidades estudadas pela autora, é a redução considerável da composição média das famílias que passou a ser de 2 a 3 filhos.

As relações de parentesco assumem um papel importante na preservação do modo de vida do produtor familiar. Ao pesquisar as relações lógicas e simbólicas existentes entre o camponês e seu trabalho na lavoura no início dos anos de 1980 em vários municípios do Estado de Sergipe, principalmente os de Itabi e Ribeirópolis, Woortmann e Woortmann (1997, grifo nosso) discutem o fato da relação de parentesco ser mais significativa sob o ponto de vista da consideração e da obrigação do que da amizade, coleguismo e solidariedade, constituindo no que o autor chamou de “um conhecimento de sangue”.

Nesse tipo de relação, a identidade moral e social parece estar fortemente ligada ao sangue, como se essa identidade pudesse ser herdada pelos membros de uma mesma família. Assim, Tedesco (1999) coloca o parentesco como uma relação em que predomina a obrigação, o que difere fortemente da relação existente entre vizinhos, que é mais permeada pela solidariedade, surgindo de forma natural e sem cobranças. Não que, via de regra, não haja, também, a solidariedade entre parentes, mas essa apresenta-se de maneira mais acentuada nas relações de vizinhança.

As práticas tradicionais de trabalho têm uma forte relação com a solidariedade entre parentes e vizinhos. Para executar trabalhos que exigem mais mão-de-obra do que dispõe a unidade produtiva, era comum que os produtores familiares realizassem o mutirão, uma atividade muito comum no meio rural. O mutirão ocorre quando um morador encontra-se com serviço atrasado e convocam parentes e vizinhos para ajudá-lo, oferece um almoço e, frequentemente, realiza algum tipo de festividade ao final do dia. Esse tipo de atividade, embora seja hoje pouco utilizada, já foi uma forma comum de trabalho, consistindo na solidariedade entre amigos, vizinhos e parentes. Os serviços vão desde os trabalhos com o plantio, a capina, a colheita até atividades como fiar e tecer, ocorrendo geralmente aos sábados. Há

também a traição, que é realizada de surpresa por amigos, parentes e vizinhos quando o produtor não está em condições de realizar a convocação (CANDIDO, 1998).

O mutirão e a traição ocorrem com bem menos freqüência atualmente. Segundo Martins Silva (2008), embora essas práticas já tenham sido comuns na comunidade Cruzeiro dos Martírios, contando com a participação de cerca de 20 a 30 pessoas, hoje a traição e o mutirão inexistem nessa comunidade. Entretanto, elas ainda são praticadas, mas com pouca expressão, nas comunidades Mata Preta, Morro Agudo/Cisterna, Ribeirão, Custódia e São Domingos. Em especial, na comunidade São Domingos, Venâncio (2008) constatou que a traição, que em tempos passados chegava a reunir até 100 pessoas, hoje, nas raras vezes que ela ocorre, limita-se à participação de 10 e 15 pessoas.

Os produtores familiares têm atuado ao longo da história de Goiás, exercendo forte influência no modo de vida nas comunidades rurais do município de Catalão (GO). São marcantes na caracterização dessas famílias fatores como família, trabalho e tradições, que têm contribuído como um todo para a reprodução, ao longo das gerações, do modo de vida das famílias de produtores do município de Catalão.

A agricultura familiar apresenta especificidades locais e regionais que asseguram sua reprodução na sociedade contemporânea. Dessa maneira, as condições de vida e de trabalho do agricultor familiar brasileiro agravaram-se a partir da década de 1970, quando houve a expansão da fronteira agrícola e o início da modernização e industrialização do setor rural.

Mendes (2005) ao conceituar a agricultura familiar elenca algumas características das unidades produtivas desse seguimento, sendo: a) centralização dos meios de produção; b) os proprietários asseguram diretamente a gestão e o trabalho; c) é dada ênfase na diversificação da produção de gêneros alimentícios e na multiplicidade de atividades; d) a produção é voltada tanto para o auto-consumo quanto para o mercado consumidor; e) há uma valorização dos recursos naturais e culturais; f) o trabalho assalariado complementar é utilizado somente quando necessário; g) os rendimentos são frutos da associação das receitas geradas por atividades agrícolas e não-agrícolas; h) as estratégias de reprodução são imediatamente subordinadas às condições externas; i) a área total menor ou igual a quatro módulos fiscais de terra, que são quantificados de acordo com a legislação em vigor, ou no máximo seis módulos, quanto se trata de pecuária familiar.

Pesquisando sobre a agricultura familiar em diversos pontos do mundo, a saber França, Canadá, Brasil, Tunísia e Polônia, Lamarche (1997) observou que em algumas economias a produção familiar é a ponta de lança do desenvolvimento agrícola, sendo reconhecida como a única forma social de produção que é capaz de satisfazer as necessidades da sociedade como um todo. O autor ressalta, também, que em outras economias a produção familiar permaneceu fundamentalmente arcaica, baseando-se essencialmente na economia de subsistência, o que a faz ser ignorada ou até mesmo excluída das políticas agrícolas e agrárias.

As unidades produtivas brasileiras, baseadas no trabalho familiar, encontram-se subordinadas a uma estrutura concentrada da propriedade e dos mercados, fazendo com que elas enfrentem graves problemas. Mendes (2005) procurou analisar o surgimento e o desenvolvimento dos pequenos produtores rurais na sociedade brasileira e suas possibilidades de reprodução na conjuntura atual, ela mostra, em seu trabalho, que as transformações dos processos produtivos, iniciada na década de 1960, resultaram na expansão do capitalismo no campo. Esse processo agravou as condições de vida desses produtores.

Novas formas de trabalho e de apropriação dos meios de produção foram estabelecidas no campo, gerando condições de desigualdade, já que o processo de consolidação do capitalismo no setor rural gerou uma aliança entre ciência e negócios, sendo crescente a necessidade de capital. O financiamento rural foi um poderoso instrumento de modernização da agricultura, ao possibilitar a incorporação de maquinaria e insumos ao processo produtivo. Com o processo de modernização da agricultura em curso, as linhas de crédito foram direcionadas para as grandes explorações, tendo em vista que as pequenas propriedades não seriam capazes de absolver os recursos tecnológicos e demais insumos agrícolas que surgiram desse processo (MENDES, 2005). Isso fez com que o agricultor familiar ficasse às margens das políticas de investimento do governo.

Os sistemas de crédito, embora tenham representado um importante papel no processo de modernização do campo brasileiro, provocaram um aumento das desigualdades entre os pequenos e grandes produtores, pois os pequenos não puderam usufruir dos financiamentos existentes. Para Mendes (2005), a combinação de fatores como aspectos culturais, formação educacional, questões climáticas e manifestações de pragas e doenças fazem com que a agricultura seja um negócio de alto risco, quando gerenciado por produtores pouco capitalizados.

É possível verificar que as transformações do espaço agrário advindas da modernização da agricultura agravaram as condições de inserção no mercado e de reprodução do agricultor familiar. O Brasil adotou um modelo de modernização que se mostrou conservador e excludente, que pouco fez pelo agricultor familiar e favoreceu a agricultura empresarial moderna.

4.2 Efeitos da modernização da agricultura no modo de vida do agricultor familiar de Catalão (GO)

Os efeitos da modernização do campo na realidade do agricultor familiar só foram sentidos de forma mais acentuada em Catalão (GO) a partir da década de 1980, com a expansão da fronteira agrícola, que resultou na popularização do cultivo da soja na região pelos grandes produtores. As paisagens desse município, que eram compostas pela vegetação nativa e por áreas de criação extensiva de gado, foram, pouco a pouco, desaparecendo, dando lugar a carvoeiras que se instalaram rapidamente, resultando no desmatamento de grandes porções de mata nativa. Lavouras nunca antes vistas nessa região começaram a aparecer. Pastagens naturais cederam lugar a novas variedades de gramíneas (brachiaria dictyoneura) graminosa, entre outras, possibilitando maior produtividade na criação de gado. Com o intuito de corrigir o pH do solo do Cerrado, camadas de calcário foram aplicadas.

Em Catalão (GO), a modernização tecnológica foi mais acentuada nas regiões de topografia plana, que eram antes utilizadas como áreas de criação extensiva de gado. Essas regiões apresentavam um baixo valor imobiliário, devido, em grande, parte, à acidez do solo.

A pesquisa de Mendes (2005) indica que a expansão da fronteira agrícola esteve condicionada a investimentos em pesquisas e a atividades agropecuárias que oferecessem informações sobre a viabilidade técnica para a exploração do Cerrado. Para tanto, foram aplicadas diversas técnicas de cultivo e a criação de linhas de crédito rurais destinadas à aquisição de tecnologias agrárias, destinadas à compra de maquinários, desmatamentos, adequação do pH às práticas de cultivo, compra e custeio de insumos modernos. Dessa foram, a maioria dos proprietários, mesmo possuindo terras, não dispunham capital para investir tampouco conhecimentos tecnológicos para aumentar a produtividade, levando à subutilização das propriedades.

Com a chegada de migrantes à região rural de Catalão (GO), sobretudo de sulistas e paulistas, houve uma demanda por terras, e na ocasião muitos produtores venderam suas propriedades (ou partes delas), o que se mostrou, na época, um bom negócio. Com efeito, Mendes (2005) aponta que entre os anos de 1980 e 1996 houve no município de Catalão (GO) uma expressiva diminuição estimada em 21% no número de propriedades rurais de até 100ha e de 13% das propriedades entre 100ha e 1000ha. Em contrapartida, observou-se nesse mesmo período um aumento de 12% das áreas com extensões superiores a 1000ha.

Esse processo de redistribuição de terras, marcado pela alta concentração fundiária, mudou não somente a monetarização das relações de trabalho, mas trouxe, também, profundas mudanças na composição do núcleo familiar dos pequenos produtores. Observou-se a expulsão do trabalhador rural e/ou o impedimento da continuidade da profissão paterna, ou seja, a migração de parte da família (MENDES, 2005). Entre os mais jovens integrantes das famílias que permaneceram no campo, muitos têm migrado para a cidade, em busca de oportunidade de melhores rendimentos, condições de trabalho e lazer. Aqueles que preferem não deixar a propriedade costumam dividir seu tempo entre o trabalho no campo e os estudos na cidade, provocando modificações nas tradicionais relações de trabalho.

Mesmo com as modificações do núcleo familiar e com as dificuldades advindas com a modernização do campo, o agricultor familiar tem adotado estratégias que possibilitam sua permanência no campo e dele tirar seu sustento. Recebem o nome de Estratégias Familiares o conjunto de técnicas que o pequeno produtor se utiliza para se manter no campo. Para Brumer et al. (1993),

> as estratégias familiares são respostas dadas por cada família a fim de assegurar ao mesmo tempo a sua própria reprodução e a de sua exploração. Poder-se-ia dizer, simplificando, que o grande desafio dos agricultores brasileiros consiste em garantir um espaço aos numerosos 'herdeiros', um lugar de trabalho (muitas vezes a própria exploração familiar), sem que isso se torne técnica e economicamente inviável. (BRUMER et al., 1993, p. 205, grifo do autor).

Assim, entende-se que os produtores familiares estão conscientes das dificuldades encontradas para se manterem no campo e dos grandes desafios que seus filhos e netos enfrentarão para fazer da terra a fonte de sustento. Wanderley (2001), que realizou um estudo sobre as raízes do campesinato no Brasil e sua influência sobre a agricultura familiar moderna, destaca que os produtores utilizam-

se da experiência e dos recursos que têm disponíveis como “armas” para enfrentarem os novos desafios que surgem, o que significa que todo o trabalho é feito a partir de um conjunto de técnicas tradicionais de trabalho e produção.

Para Mendes (2005), há de se esperar que o conjunto de conhecimentos práticos e não formais seja de grande importância para determinar tais estratégias. Uma das estratégias adotadas é a diversificação da produção. De acordo com a autora, a diversificação da produção, tanto para o mercado quanto para o autoconsumo, ameniza o problema da irregularidade dos mercados e dos baixos preços pagos pelos produtos agrícolas. A preocupação desses produtores com a instabilidade do mercado justifica-se quando é feito um comparativo com o valor dos insumos, que geralmente são cotados em dólar. Há também por parte desses produtores a consciência de que a produção excessiva de um determinado produto pode vir a saturar o mercado.

Os fatores apresentados permitem concluir que os produtores familiares do município de Catalão (GO) não ficaram isentos das dificuldades que acompanharam o processo de modernização tecnológica do campo. As transformações do setor agrário ocorridas na segunda metade do século XX trouxeram profundas mudanças nas relações de trabalho, família e produção, trazendo diversos prejuízos para os pequenos produtores. Nesse sentido a concepção e adoção de estratégias de produção baseadas principalmente na diversificação da produção é o que tem garantido a esse seguimento permanecer na propriedade e reproduzir seu modo de vida.

5 Cultura e território: festas de roça e preservação da identidade cultural

O entendimento da identidade cultural de um povo pode ser obtido por meio da análise do território em que ocupam. O território pode ser definido como um espaço geográfico e político, um local onde seus atores realizam seus projetos de vida, correspondendo a uma materialização da existência humana. Elementos da natureza e relações entre pessoas, como cultura, política e economia são elementos que compõem a organização da configuração territorial.

A relação entre o território e o homem do campo foi estudada por Almeida (2008), que buscou em sua pesquisa investigar as paisagens e identidades territoriais, ou seja, a etnoterritorialidade do sertanejo no sertão brasileiro, enfatizando os biomas da Caatinga e do Cerrado. Para a autora, “[...] o território é, antes de tudo, uma convivialidade, uma espécie de relação social, política e

simbólica que liga o homem à sua terra e, simultaneamente, estabelece sua identidade cultural." (ALMEIDA, 2008, p. 58). Dessa forma, cultura e território estabelecem uma relação intrínseca.

Embora os aspectos culturais dos produtores rurais de Catalão (GO) possam ser estudados com base em fatores como as relações familiares e as formas de trabalho, destacam-se as tradições religiosas como principais objetos de estudo dessas comunidades do município.

Andrade (2008), ao pesquisar aspectos da religiosidade na comunidade rural Tenda do Moreno, no município de Uberlândia (MG), diz que a análise da maneira como a religiosidade influi no cotidiano dos moradores do meio rural é de grande importância, visto que eles estabelecem uma espécie de código de conduta, permeado pela idéia da obrigação para com a religião. Castells (2006) também faz menção à religião, afirmando que ela, assim como a História, a Geografia, a Biologia e todas as memórias coletivas e fantasias, forma a base para a construção de uma identidade.

Essa influência da religião no modo de vida do produtor familiar é também observada nas comunidades rurais do município de Catalão (GO), onde as festas de roça estão entre as mais conhecidas manifestações culturais e de religiosidade. De maneira geral, as festas são consideradas como uma forma de romper com a rotina, após muito tempo de trabalho. Essas festividades constituem também um elemento de sociabilidade entre as famílias e vizinhos e, conforme afirma Candido (1999), são os meios usados pelos produtores para agradecer aos santos pela fartura alcançada no ano.

As festas de roça no município de Catalão (GO) são geralmente organizadas pelos próprios moradores. Suas origens costumam estar associadas à devoção de algum morador, que iniciava rezas de terços em louvor a um santo em nome de alguma graça alcançada. Inicialmente, a participação era de poucas pessoas, com o passar do tempo o número de participantes aumentou gradativamente, de tal maneira que foi necessário encontrar locais mais apropriados para essa atividade, o que resultou na construção de capelas. As festas de roça constituem, além do caráter religioso, uma manifestação social, uma forma de reunir e rever parentes e amigos das regiões circunvizinhas.

O ciclo de festas é mais concentrado entre os meses de maio e agosto e são homenageados santos como São Sebastião, São João, Nossa Senhora da Abadia,

dentre outros (MENDES, 2005). Hoje, é comum que essas festas também incluam a dança, o terço cantado e o preparo de comidas típicas da região, que muitas vezes são servidas, gratuitamente aos participantes, como ocorre na comunidade São Domingos no município de Catalão (GO) (VENÂNCIO, 2008). Das festas realizadas nas comunidades rurais do município de Catalão (GO), as mais conhecidas são a Novena de São Sebastião, a Encomenda das Almas (realizada há mais de cem anos) e a Festa da Fogueira de São João.

A Festa da Fogueira de São João é realizada no dia 24 de junho nas comunidades Ribeirão e Cruzeiro dos Martírios. Essa festa costuma reunir entre oitenta e cem pessoas e as famílias que a organizam esforçam-se para dar continuidade a essa tradição (MENDES, 2008; MARTINS SILVA, 2008). São realizadas orações católicas, o acendimento da fogueira, o levantamento da bandeira e os Batismos, momento mais importante da festa.

Outra importante festa é a Novena de São Sebastião. As comunidades São Domingos e Cruzeiro dos Martírios têm São Sebastião como padroeiro. Segundo Venâncio (2008), a crença popular considera esse santo o protetor contra a peste, a fome e a guerra, e dessa maneira, os agricultores confiam a ele toda a sua produção. De acordo com Martins Silva (2008), essa festa é realizada na comunidade Cruzeiro dos Martírios anualmente, entre os dias 17 e 20 de janeiro, diferentemente do que ocorre na comunidade São Domingos, onde, conforme Venâncio (2008), não há uma data estabelecida para a sua realização, ocorrendo todo ano entre os meses de maio e agosto, numa data que seja a mais apropriada ao festeiro. Atualmente, essa festa recebe centenas de participantes por dia, em 2007 houve uma participação estimada de 400 a 500 pessoas (VENÂNCIO, 2008).

Outra festa muito conhecida na região de Catalão (GO) é a Encomenda das Almas, realizada na comunidade Mata Preta há mais de cem anos, acontece nos três últimos dias da Semana Santa, entre as 20h e 01h (Mendes, 2008). De acordo com Morais Filho (1979), pesquisador de festas e tradições populares brasileiras, essa festa é uma tradição trazida pelos portugueses e remonta ao pensamento do homem da Idade Média européia. Seus participantes cobrem-se de branco, deixando apenas os olhos e a boca descobertos, e saem em procissão fazendo orações em favor dos que habitam o purgatório, para que elas ganhem a salvação e não assombrem os vivos. É vetada a participação de mulheres e crianças, assim como é proibido a qualquer morador abrir portas ou janelas para ver o ritual. De

acordo com a pesquisa de Mendes (2008), diz-se que os antigos encomendadores de almas da região da Mata Preta contam que as pessoas que abriam as portas, para ver e/ou acompanhar os rezadores, viam almas vestidas de branco acompanhando a procissão, fazendo com que os curiosos voltassem assustados para suas casas.

Atualmente, nas organizações de tais festas, a parte religiosa tem ficado a cargo de um pequeno grupo, os moradores mais velhos, que organiza as missas e a reza dos terços, enquanto a maioria dos participantes, vinda da cidade de Catalão (GO) ou de cidades vizinhas, comparecem somente pela festa em si (VENÂNCIO, 2008).

Embora, atualmente, haja muitos objetos e práticas do meio urbano presentes nas comunidades, as festas religiosas resgatam muitas características que fazem parte da identidade da população rural, o que Candiotto (2008) define como ruralidade, podendo ser interpretadas como uma reação às mudanças impostas, uma forma de manter suas tradições. Desse modo, o espaço de vivência do homem do campo incorpora toda a história de várias gerações com seus valores e modos de vida.

Mesmo que no município de Catalão ocorram festas antigas, como a centenária Encomenda das Almas, que preservam a identidade cultural dos produtores familiares, nem todas as tradições se mantiveram. Na comunidade São Domingos, estudada por Venâncio (2008), há o caso da festa em louvor à Nossa Senhora da Abadia, que foi extinta há cerca de quarenta anos por não encontrar pessoas dispostas organizá-la.

Os produtores das comunidades rurais de Catalão (GO) possuem uma riqueza cultural, com tradições festivas, devoção aos Santos (predomínio da religião católica), valorizando a família e os costumes do lugar, um modo de vida preservado através de gerações.

6 Considerações finais

As unidades de produção familiar passaram a enfrentar diversos problemas com a consolidação do capitalismo no campo através da modernização tecnológica da agricultura. Mesmo cumprindo um papel importante dentro da economia brasileira, por ser capaz de produzir tanto para a família quanto para o mercado, esse seguimento tem passado por sérias dificuldades, que derivam da falta de

investimentos por parte do Estado. No Brasil, a modernização ocorreu de forma a favorecer os grandes produtores que atuam na agricultura empresarial moderna, por eles possuírem maiores condições de absolver os insumos e recursos tecnológicos, necessários a uma grande produção, capaz de atender aos interesses dos mercados internos e externos.

É devido a uma série de estratégias de produção, que combinam técnicas tradicionais de produção e de trabalho assalariado com não assalariado, que os produtores rurais têm sido capazes de se adequar à nova realidade imposta pelo capitalismo e continuarem a gerir suas propriedades.

Os produtores familiares que habitam as comunidades rurais de Catalão (GO) também sofreram com os efeitos do processo de modernização da agricultura. Atualmente, há exemplos de produtores que conseguiriam se manter no campo através da adoção de estratégias produtivas, como a valorização de produtos típicos e a diversificação da produção, muitos, entretanto, viram seus ganhos diminuírem consideravelmente, sendo obrigados a arrendar ou vender suas propriedades aos agricultores empresariais e colocarem fim a um modo de vida cultivado há diversas gerações.

A luta para fazer da terra um meio capaz de suprir as necessidades básicas da família e a sua integração no mercado não é a única preocupação das famílias dos produtores. Como suas estratégias produtivas se baseiam em um conjunto de conhecimentos técnicos tradicionais, que se adequam a uma nova realidade, a busca por valorizar a cultura e a memória da família assume um papel de grande importância na vida desses produtores. Nesse contexto, ações como a realização de festas de caráter religioso não é apenas um momento de fé e de diversão. É em atividades como essas que o produtor reage contra o processo de urbanização do campo, valorizando as tradições e a memória das gerações anteriores. É uma das principais formas de se conservar sua identidade cultural.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. G.; CHAVEIRO, E. F.; BRAGA, H. C. (Org.). **Geografia e cultura**: os lugares da vida e a vida dos lugares. Goiânia: Vieira, 2008. 313 p.

ANDRADE, R. B. de. Práticas sócio-culturais e religiosas: elementos constituintes do lugar. In: ALMEIDA, M. G.; CHAVEIRO, E. F.; BRAGA, H. C. (Org.). **Geografia e cultura**: a vida dos lugares e os lugares da vida. Goiânia: Vieira, 2008. p. 166-203.

BRUMER, A. et al. A exploração familiar no Brasil. In: LAMARCHE, H. (Coord.). **Agricultura familiar**. Tradução Ângela M. M. Tigiwa. Campinas: UNICAMP, 1993. p. 179-234, (Coleção Repertórios).

CANDIDO. A. **Os parceiros do Rio Bonito**: estudo sobre o caipira paulista e a transformação dos seus meios de vida. 8. ed. São Paulo: Duas Cidades, 1998. 284 p.

CANDIOTTO, L. Z. P.; CORRÊA, W. K. Ruralidades, urbanidades e a tecnicização do rural no contexto do debate cidade-campo. **Campo-território**: revista de geografia agrária, Uberlândia, v.3, n. 5, p. 214-242, fev., 2008.

CASTELLS, M. **O poder da identidade**. Tradução de Klauss Brandini Gerhardt. 5. ed. São Paulo: Paz e Terra, 2006. 530 p. (A era da informação: economia, sociedade e cultura; v. 2.)

LUNA, S. V. **Planejamento de pesquisa**: uma introdução. São Paulo: EDUC, 2005. 108 p. (Série Trilhas).

LAMARCHE, H. (Coord.). **Agricultura familiar**: comparação internacional. Tradução de Ângela M. N. Tijiwa. Campinas: Unicamp, 1993. v. 1. (Coleção Repertórios).

MARTINS SILVA, J. **A agricultura familiar em Goiás**: a comunidade Cruzeiro dos Martírios no município de Catalão. 2008. 83 f. Trabalho Final de Curso (Graduação em Geografia) - Campus Catalão, Universidade Federal de Goiás, Catalão, 2008.

MENDES, E. de P. P. **A produção rural familiar em Goiás**: as comunidades rurais no município de Catalão. 2005. 294 f. Tese (Doutorado em Geografia – Desenvolvimento Regional e Planejamento Ambiental) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2005.

MENDES, E. de P. P. Identidades sociais e suas representações territoriais: as comunidades rurais no Município de Catalão (GO). In: ALMEIDA, M. G.; CHAVEIRO, E. F.; BRAGA, H. C. (Org.). **Geografia e cultura**: a vida dos lugares e os lugares da vida. Goiânia: Vieira, 2008. p. 137-165.

MORAIS FILHO, Alexandre José de Melo. **Festas e tradições populares do Brasil**. Belo Horizonte; São Paulo: Itatiaia: Universidade de São Paulo, 1979. 312 p.-. (Coleção Reconquista do Brasil, v.55).

SEABRA, G. F. **Fundamentos e perspectivas da geografia**. João Pessoa: UFPB, 1997. 106 p.

SPOSITO, Eliseu Savério. A questão do método e a crítica do conhecimento. In: ___. **Geografia e filosofia**: contribuição para o ensino do pensamento geográfico. São Paulo: Unesp, 2004. p. 23-72.

TEDESCO, J. C. (Org.). **Agricultura familiar**: realidades e perspectivas. 3. ed. Passo Fundo: UPF, 2001. 405 p.

VENÂNCIO, M. **Território de esperança**: tramas territoriais da agricultura familiar na comunidade rural São Domingos em Catalão (GO). 2008. 178 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Instituto de Geografia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

WANDERLEY, M. N. B. Raizes históricas do campensinato brasileiro. In: TEDESCO, J. C. (Org.). **Agricultura familiar**: realidades e perspectivas. 3. ed. Passo Fundo: UPF, 2001. p. 21-55.

WOORTMANN, E. F.; WOORTMANN, K. **O Trabalho da Terra**: a lógica simbólica da lavoura camponesa. Brasília: EDUnB, 1997.192 p.

Estudo da atividade antioxidante do extrato bruto e da fração alcaloídica da casca do *Aspidosperma subincanum* Mart. (Guatambu)

Aline Souto de Paiva[a], Clévia Ferreira Duarte Garrote[a*]
[a]Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, CEP 74605220, Brasil.
*email: clevia@farmacia.ufg.br
Palavras-chave: Antioxidante, Aspidosperma subincanum, alcalóides.

1 INTRODUÇÃO

A partir do início dos anos 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais tem sido restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como pela comprovação de diversos outros efeitos adversos como: aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático (Degáspari, 2004)

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células (Bianchi, 1999). Um radical livre tem como definição qualquer átomo, grupo de átomos ou moléculas com um elétron nao pareado ocupando uma órbita extrema como o ânion supeóxido (O2-), radical hidroxil (OH), e oxido nitrico (NO), por exemplo. Entretanto ainda existe outros compostos igualmente reativos que nao possuem um elétron desemparelhado na ultima camada que incluem o peroxido de hidrogeno (H2O2), o anion nitroxila (NO-), o peroxinitrito (OONO-). Porém classificando de uma forma mais ampla, tanto um grupo quanto o outro podem ser classificados como espécies reativas.

Quando acontece um desbalanço entre a quantidade produzida de espécies reativas de oxigênio e a remoção desses pelos sistemas antioxidantes, se tem então um estressse oxidativo, causando danos moleculares às estruturas celulares com consequente alteração funcional e prejuízo das funçoes vitais. Esses danos podem ser observados em diversos tecidos e orgãos tais como fígado, músculo e tecido adiposo, vascular e cerebral (Mourão, 2008).

Acredita-se que as doenças degenerativas crônicas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose, complicações da *Diabetes mellitus*, o envelhecimento precoce e outras estejam relacionadas com o estresse oxidativo.(Vicentino, 2007)

O uso de plantas medicinais sob várias formas de preparação (chá, abafado, garrafada, etc.) é costume bastante arraigado em várias camadas da população brasileira. Tal hábito parte do pressuposto de que as plantas utilizadas, além de possuírem atividade terapêutica, são desprovidas de efeitos tóxicos (Carlini et al, 1988). Este aspecto é importante se considerarmos que o conhecimento sobre plantas medicinais é de domínio popular e, em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, ele contém um forte componente social e cultural pois estas plantas, muitas vezes, representam o único recurso terapêutico de muitas comunidades (Amorozo, 1988).

Apesar da crescente importância dos fitoterápicos relativamente, poucos estudos foram realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança.(Alves, 2007).

Em Goiás o uso de plantas medicinais é bastante comum e o cerrado é muito rico em espécies medicinais, que se devidamente utilizadas podem trazer benefícios enormes, sobretudo às populações mais carentes, devido ao seu baixo valor monetário (Lino, 2007).

As espécies do gênero Aspidosperma apresentam grande importância tanto do ponto de vista econômico como científico, pois além de serem fornecedoras de madeira nobre, com larga aplicação na carpintaria a maioria das espécies deste gênero são objetos de extensas investigações na busca de novas substâncias com atividades biológicas (Oliveira, 2009)

Entre esses estudos podemos citar: atividade do extrato alcaloídico de *Aspidosperma ramiflorum* contra formas promastigostas de *Leishmania amazonensis* maior do que em relação a *L. brasiliensis* (Tanaka, 2006*),* atividade *in vitro* do extrato alcaloídico contra bactérias gram-positivas *(Tanaka et al, 2007) e a*tividade antifúngica dos alcalóides da mesma espécie (Souza, 2006), atividade antifúngica contra *Clasdosporium herbarum do* extrato etanólico do caule de *A. polineuro.* (Ferreira, 2003)

Quanto à espécie *Aspidosperma subincanum* Mart. alguns estudos farmacognósticos e de atividade farmacológica e toxicológica foram realizados

dentre eles o de Souza *et al* (2005) que indicou a presença de alcalóides na espécie *Aspidosperma subincanum* Mart. Seguiu-se então um estudo para o isolamento desses alcalóides feito por Lino *et al*, 2006.

Estudos preliminares feitos por Lino *et al* (2006) sugerem atividade antihiplerglicemiante do extrato bruto e da fração alcaloídica em extrato n-butanólico do *Aspidosperma subicanum* Mart. com provável ação intra-pancreática.

Goloni *et. al* (2005) em estudo sobre a toxicidade aguda da espécie *Aspidosperma subincanum* Mart. caracterizou-o como praticamente atóxico.

No entanto a espécie carece de outros estudos dado o seu potencial terapêutico, demonstrado pelo teor encontrado de alcalóides (Lino, 2007) e pela presença de outros metabólitos secundários. Uma destas atividades que pode ser investigada é a atividade antioxidante onde se usa metodologias diferentes, dentre elas a que emprega o DPPH (1,1-difenil 2-picrilhidrazil).

2 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo a avaliação do potencial farmacológico, em relação aos efeitos do extrato bruto e da fração alcaloídica isolada da casca do caule do guatambu, quanto à capacidade de combate aos radicais livres *in vitro.*

3 METODOLOGIA

3. 1 Coleta e preparação do material

O material botânico foi colhido na região de Goiânia/GO em agosto de 2004. As amostras foram identificadas e classificadas, pela professora Dra. Irani Fernandes Pereira Campos (ICB/UFG), como sendo *Aspidosperma subincanum* Mart., seguindo suas descrições botânicas. Uma amostra foi depositada no herbário da UFG, sob o número UFG 21.147 Após a classificação, o material botânico, foi seco a temperatura ambiente, protegidas do sol e da umidade.

As amostras das cascas foram moídas em moinho de facas. O pó resultante foi armazenado em sacos de polietileno e devidamente identificados com o nome da planta, número da amostra e o nome dos pesquisadores.

3.2 Preparação do extrato e isolamento dos alcalóides

3.2.1 Preparação do extrato do *Aspidosperma subincanum* Mart.

Pesou-se 100g da amostra (casca moída a pó fino), a qual foi misturada a 300ml de metanol em um béquer de 1000mL. A mistura foi mantida com agitação por 2 horas a 300rpm em agitador mecânico e posterior repouso de aproximadamente 24 horas. Logo após, a mistura foi filtrada pelo processo de filtração simples, utilizando-se papel de filtro qualitativo. O filtrado (metanol + compostos extraídos) foi transferido para um balão de fundo redondo de 500mL. Este balão foi acoplado ao rotaevaporador, permanecendo em banho-maria não ultrapassando a temperatura de 50°C, para total evaporação do metanol. Este procedimento foi repedido duas vezes com o resíduo proveniente da filtração.

O extrato obtido foi devidamente rotulado, identificado e guardado em local escuro e livre de umidade. Repetiu-se esse procedimento várias vezes para obtenção de uma quantidade grande de extrato. O peso médio do extrato obtido após a finalização do processo de extração foi de 12g.

3.2.2 Obtenção da fração alcaloídica

O extrato bruto metanólico obtido como descrito anteriormente, foi suspenso com 250ml de Metanol a 90% e extraído com 250ml de Hexano, por três vezes, através de um funil de separação de 1000ml. A fase metanólica foi separada da fase com hexânica e esta foi descartada. A fase metanólica foi adicionada a um balão de fundo redondo e acoplado a um rotaevaporador não ultrapassando a temperatura de 50°C e o metanol evaporado. Logo após, o extrato metanólico foi suspenso em solução de 250 ml de NaCl a 1M e lavado três vezes com 250ml de acetato de etila, em um funil de separação de 1000ml. A camada aquosa foi separada da camada com Acetato de etila. Na fase com Acetato de etila foi adicionado sulfato de sódio para total extração da água e deixado em repouso por pelo menos 1 hora. A fase de acetato de etila

foi filtrada (filtração simples) em um balão de fundo redondo de 500ml. Após isso o filtrado obtido foi levado ao rotaevaporador não ultrapassando a temperatura de 40°C. A fase aquosa foi lavada com 250ml de n-butanol por 3 vezes e separado em um funil de separação de 1000ml. Após a separação adicionou-se à fase n-butanólica sulfato de sódio e essa mistura foi deixada em repouso por 1 hora, filtrada e adicionada a um balão de fundo redondo de 500ml que foi acoplada ao rotaevaporador, evaporando a secura (Kobayashi, 2002). Nessa fase, obteve-se 3,13g em média de extrato.

O extrato seco foi tratado com solução de ácido clorídrico 0,1N em uma relação 0,15 mL/mg. A mistura foi colocada no banho de ultra-som por 5 minutos e em seguida extraída com acetato de etila, sendo o volume de acetato de etila utilizado igual ao do ácido clorídrico (3 vezes). A fração aquosa foi alcalinizada com hidróxido de amônio até pH 9-10 e extraída com o mesmo volume de acetato de etila (4 vezes), gerando uma fração orgânica enriquecida em alcalóides. A fração foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada, evaporada à pressão reduzida e pesada. A média final dos extratos purificados obtidos foi de 1,12g.

3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH.

A atividade antioxidante foi mensurada através da capacidade de extratos metanólicos de descorar soluções diluídas do radical o 1,1-difenil 2-picrilhidrazil (DPPH·). O ensaio fundamenta-se na propriedade do DPPH apresentar, quando colocado em presença de substâncias seqüestradoras de radicais livres, uma descoloração estequiométrica. O grau de descoloração indica a capacidade sequestradora de radical livre.

Preparou-se uma solução-mãe de cada amostra (extrato bruto e fração alcaloídica) de 1mg/mL em etanol, de onde foram preparadas diluições de 500, 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6; 7,8; 3,9; 1,95; 0,975 e 0,48µg/mL.

Adicionou-se 1 mL da solução de DPPH 0,3 mM é adicionada a 2,5 mL de cada concentração das amostras testadas. O branco foi feito adicionando-se 1 mL de etanol a cada concentração das amostras. O controle negativo foi preparado com 1 mL de DPPH e 2,5 mL de etanol. Como controle positivo utilizou-se o ácido ascórbico nas diluições 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6; 7,8;

3,9; 1,95; 0,975 e 0,48µg/mL . Os tubos de reação foram mantidos em repouso por 30 minutos.

Procedeu-se então a leitura das amostras em espectrofotômetro de UV no comprimento de 517nm. Com as absorbâncias obtidas fez-se o cálculo da atividade antioxidante através da fórmula:

$$AA\% = 100 - \{[(ABS_A - ABS_B) \times 100] / ABS_C\}$$

Onde: AA% = Atividade antioxidante percentual;

ABS_A = Absorbância da amostra (Extrato + DPPH);

ABS_B = Absorbância do branco da amostra (Extrato + Etanol);

ABS_C = Absorbância do controle (DPPH + Etanol).

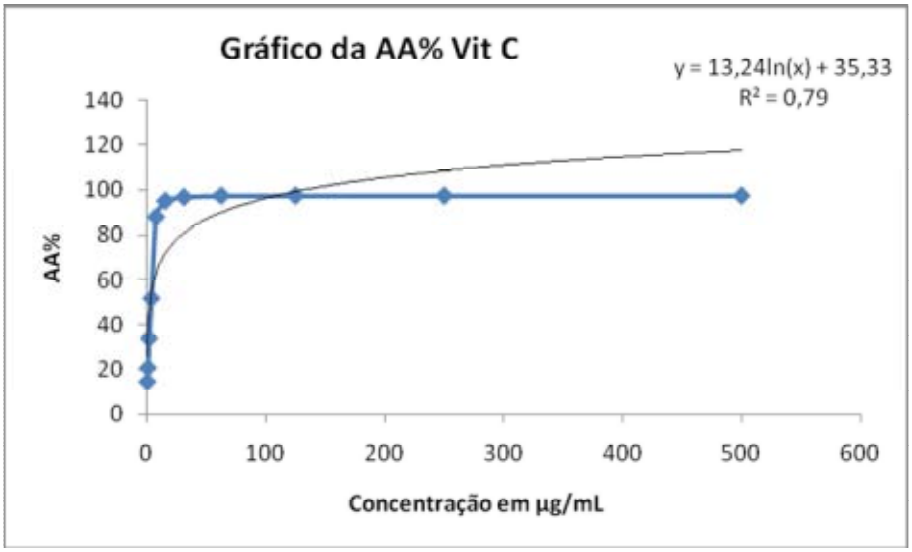
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Atividade antioxidante do ácido ascórbico.

Concentrações	Abs Branco	Abs Amostra	AA%
500µg/mL	0	0,028	97,23866
250µg/mL	0	0,028	97,23866
125µg/mL	0	0,028	97,23866
62,5µg/mL	0	0,028	97,23866
31,25µg/mL	0	0,034	96,64694
15,6µg/mL	0	0,051	94,97041
7,8µg/mL	0	0,123	87,86982
3,9µg/mL	0	0,49	51,67653
1,95µg/mL	0	0,672	33,72781
0,975µg/mL	0	0,805	20,61144
0,48µg/mL	0	0,868	14,39842
CE_{50}			3,02

CE50 configura o valor necessário para produzir metade (50%) de um efeito máximo estimado em 100% para as amostras testadas.

Gráfico 1. Gráfico da atividade antioxidante do ácido ascórbico.

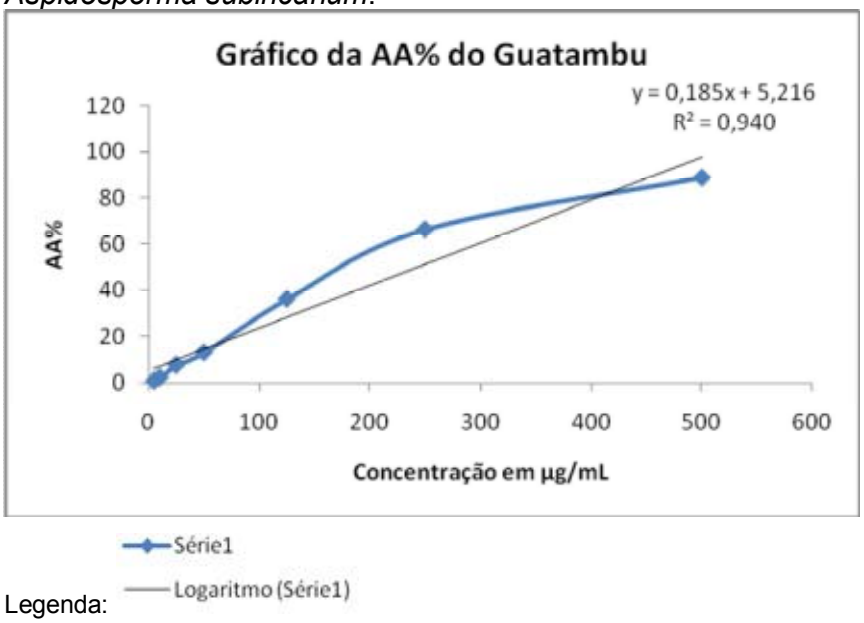


Legenda:

Tabela 2. Atividade antioxidante de diferentes concentrações do extrato bruto do *Aspidosperma subincanum*.

Concentrações	Abs branco	Abs Amostra	AA%
500µg/mL	0,002	0,081	88,73039
250µg/mL	0,001	0,235	66,61912
125µg/mL	0	0,447	36,23395
50µg/mL	0	0,61	12,98146
25µg/mL	0	0,648	7,560628
10µg/mL	0	0,685	2,282454
5µg/mL	0	0,695	0,85592
CE_{50}			241µg/mL

Gráfico 2. Gráfico da atividade antioxidante do extrato bruto do *Aspidosperma subincanum*.

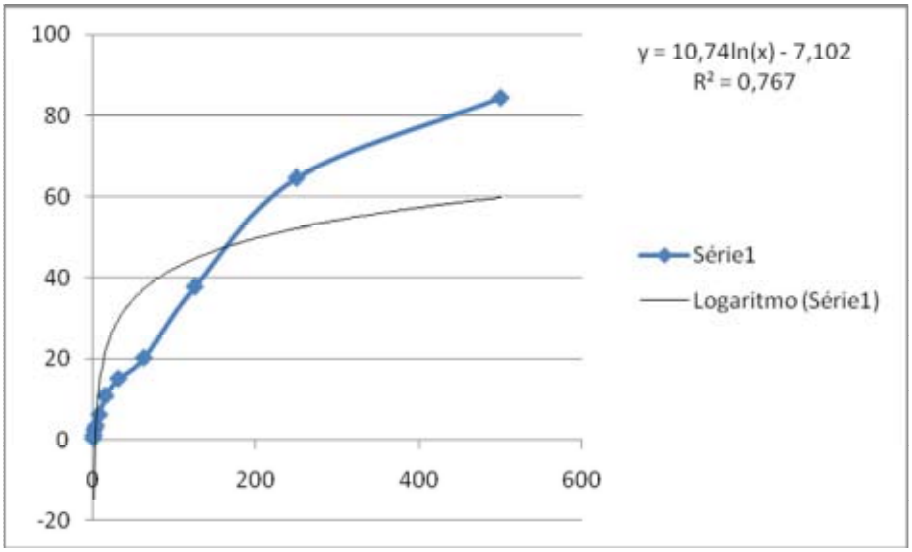


Legenda:

Tabela 3. Atividade antioxidante de diferentes concentrações da fração alcaloídica do *Aspidosperma subincanum.*

Concentrações	Abs Branco	Abs Amostra	AA%
500µg/mL	0,017	0,173	84,22649
250µg/mL	0,011	0,362	64,50961
125µg/mL	0,007	0,622	37,81598
62,5µg/mL	0,007	0,796	20,22245
31,25µg/mL	0,007	0,847	15,06572
15,6µg/mL	0,006	0,888	10,81901
7,8µg/mL	0,004	0,932	6,167846
3,9µg/mL	0,003	0,958	3,437816
1,95µg/mL	0,002	0,967	2,426694
0,95µg/mL	0,002	0,98	1,112235
0,48µg/mL	0,002	0,988	0,303337
CE_{50}			203,63

Gráfico 3. Gráfico da atividade antioxidante da fração alcaoídica do *Aspidosperma subincanum*.



A análise dos resultados da atividade antioxidante considera como valor de referência a CE_{50} do ácido ascórbico (2,03µg/mL) para comparar a atividade das amostras testadas. Foi escolhido o ácido ascórbico porque ele possui alta atividade antioxidante. O extrato bruto possui uma CE_{50} igual a 241µg/mL e a fração de alcalóides uma CE_{50} igual a 203,63µg/mL.

5 CONCLUSÃO

Esse é o primeiro estudo que relata a atividade antioxidante do gênero *Aspidosperma subincanum.* O extrato bruto e a fração de alcalóides da casca do caule do *Aspidosperma subincanum* apresentaram um valor de CE_{50}, muito abaixo do valor de referência do ácido ascórbico demonstrando atividade antioxidante muito baixa pelo método do DPPH, porém sugere-se estudos posteriores com outros métodos de avaliação dessa atividade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, N.M.; Estudo farmacológico e da toxicidade experimental (aguda e subaguda) do extrato etanólico da casca do guatambu (*Aspidosperma subincanum* Mart.) **Revista brasileira de toxicologia**, v. 20. p. 100-100, 2007

AMOROZO, M. C. M. ; GELY, A L.. Uso de plantas medicinais por cablocos do Baixo Amazonas. Barcarena, Pa, Brasil. Bol. Museu Paraense Emílio Goeldi, Ser. Bot., vol 4, nº 1, pg. 47 - 131, 1988.

BIANCHI, M.L.P. & ANTUNES, L.M.G. - Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Nutrição**., 112: 123-30, 1999

CARLINI, E. A , MACAUBAS, C. I. P.; OLIVEIRA, M. G. M.; BARBOSA, V. P.. Toxicologia pré - clínica da Espinheira - Santa (*Maytenus ilicifolia*). In Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* e outras) CEME, Brasília, 1988.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. ; SANTOS, R. J. Atividade Antioxidante de Extrato de Fruto de Aroeira (Schinus terebenthifolius Raddi). **Sistema Eletrônico de Revistas da UFPR.** Paraná, 2004.

FERREIRA, D.T. et al. Avaliação da atividade antifúngica dos extratos etanólicos de raiz, caule e folhas de *Aspidosperma polyneuron.* In: ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, 11., 2003. Pelotas.
GOLONI, Raquel ; CUNHA, Luiz Carlos . Estudo da toxicidade aguda do Aspidosperma subincanum Martius. In: XIV Semana Científica Farmacêutica - conpeex, 2005, Goiânia. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Goiânia, 2005. v. 2. **Resumos**...Pelotas, 2003.

LINO, Roberta Campos ; SOUZA, Leonardo Gomes ; BARASUOL, Rúbia ; PEREIRA, E. R. T. ; GARROTE, Clévia Ferreira Duarte . Avaliação dos efeitos hipoglicemiantes dos alcalóides isolados da casca de Aspidosperma subincanum Mart., em camundongos. In: III Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão III CONPEEX, 2006, Goiânia. III Compeex. Goiânia : UFG Virtual, 2006. v. III.

LINO, Roberta Campos ; SOUZA, Leonardo Gomes ; BARASUOL, Rúbia ; GOLONI, R. ; VIEIRA, M. S. ; GARROTE, Clévia Ferreira Duarte . Avaliação do efeito hipocolesterolemiante e antihipercolesterolemiante do extrato etanólico do Aspidosperma subincanum Mart. em ratos. In: IV Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG IV CONPEEX, 2007, Goiânia. IV Conpeex. Goiânia: UFG virtual, 2007. v. IV

LINO, Roberta Campos ; BARASUOL, Rúbia ; SOUZA, Leonardo Gomes ; GARROTE, Clévia Ferreira Duarte . Estudo Farmacognóstico das folhas de Aspidosperma subincanum Mart.e doseamento dos possíveis alcalóides presentes na folha e dos presentes nas cascas do caule desta espécie.. In: IV Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG IV CONPEEX, 2007, Goiânia. IV Conpeex. Goiânia : UFG Virtual, 2007. v. IV.

MOURÃO, L. R. M. B.; Efeito antioxidante do ácido indol-3-acético sobre fígado de camundongos submetidos à hepatocarcinogênese induzida. **Biblioteca digital de teses e dissertações da USP**. São Paulo, 2008.

OLIVEIRA, V.B.; FREITAS, M.S.M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I.J.C Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero Aspidosperma (Apocynaceae): uma revisão. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.11, n.1, p.92-99,2009.

SOUZA, Leonardo Gomes ; LINO, Roberta Campos ; GARROTE, Clévia Ferreira Duarte . Estudo farmacognóstico de Aspidosperma subincanum Mart. apocynaceae. In: II CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO - II CONPEEX, 2005, Goiânia. II Compeex. Goiânia : UFG - Virtual, 2005. v. II.

SOUZA, A.C.M.; HASIMOTO, L.K.; , SILVA, M.R.R.; OLIVEIRA, C.M.A.; et al Propriedades antifúngicas dos alcalóides de *Aspidosperma ramiflorum.* In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Química. 29.,2006. Águas de Lindóia. **Resumo**…São Paulo, 2006.

TANAKA, J.C.A. et al. Antibacterial activity of índole alkaloids from Aspidosperma ramiflorum. **BrazilianJournal of Medical and Biological Research**,v.39, p.387-91, 2006.

TANAKA, J.C.A. et al. Antileishmanial activity of índole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**,v.16, n.6, p.377-80, 2007.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S.; Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos

tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v.17 n.3 João Pessoa, 2007.

ANÁLISE DESCRITIVA E GEORREFERENCIADA DO CÂNCER DE MAMA ENTRE OS ANOS DE 1998 E 2002 NA CIDADE DE GOIÂNIA

Ruffo de Freitas Júnior[1], Nilceana Maya Aires Freitas[2], Victor Domingos Lisita Rosa[3], Raquel Oliveira dos Santos[3]

[1] Programa de Mastologia do Hospital das Clínicas da UFG; [2] Serviço de Radioterapia do Hospital Araújo Jorge; [3] Faculdade de Medicina da UFG

Email: victor_lisita@yahoo.com.br

Palavras Chaves: câncer de mama, georreferenciamento, extensão tumoral

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença de extrema importância para a saúde publica mundial por ser a neoplasia de maior incidência na população feminina, responsável por cerca de 20% de todos os casos de câncer no mundo, além disso, representa a maior causa de mortalidade por câncer entre mulheres[1]. Foi estimado para o ano de 2008, o diagnostico de 49.400 novos casos de câncer de mama no país, com taxa bruta de 50,71 casos por 100.000 mulheres[2].

Na cidade de Goiânia apresenta aumento de incidência nas ultimas décadas em todas as faixas etárias e ainda, de forma mais intensa, entre as mulheres de 50 a 59 anos chegando a quase 300% entre os anos de 1988 e 2003[3].

Paralelamente à elevação da incidência desta neoplasia, observamos o aumento do diagnóstico de carcinomas em estádios iniciais e a redução dos casos avançados, mudando os paradigmas da epidemiologia brasileira sendo que atualmente apenas 10% dos casos são diagnosticados em fases tardias[4].

Essa inversão dos tumores avançados com diagnóstico cada vez mais precoce do câncer de mama é explicada em grande parte pelo acesso das mulheres à informação, através de campanhas de conscientização sobre a

realização do auto-exame da glândula mamária e do exame clínico e principalmente do rastreamento mamográfico desta neoplasia[5].

As mudanças do perfil epidemiológico do câncer de mama são resultantes do incremento de novos programas de rastreamento e diagnóstico precoce no último século, melhoria nas técnicas cirúrgicas, refinamento na radioterapia e inovações medicamentosas da quimioterapia, hormonioterapia e terapias alvo dirigidas[6].

A mortalidade, embora ainda se apresentando elevada em países latino-americanos, mostra tendências de redução em locais onde existem programas eficientes de rastreamento[7,8]. Dessa forma, medidas de detecção precoce são instrumentos disponíveis de modificação da evolução do câncer de mama, aumentando a sobrevida e qualidade de vida das mulheres acometidas

Apesar de estar bem estabelecido que o diagnóstico precoce e um tratamento adequado interfiram diretamente na melhoria do prognóstico desta neoplasia, em nosso meio, ainda são poucos os dados disponíveis sobre a real situação do problema, dificultando o acesso aos resultados dos programas de rastreamento e, principalmente, impossibilitando que os recursos financeiros e humanos sejam adequadamente distribuídos de acordo com as necessidades peculiares de cada região e de cada faixa etária.

A influência do meio ambiente sobre a saúde humana é uma preocupação antiga, diversos estudos destacam a influência ambiental como fator determinante para ocorrência de eventos de saúde ou doença[9].

Em relação ao câncer de mama a influência ambiental fica evidente quando se nota o aumento da incidência nas ultimas décadas devido a mudança no estilo de vida das mulheres e a maior exposição hormonal[10]. Prova desta influência é que mulheres asiáticas, que apresentam baixa incidência de câncer de mama, ao migraram para países ocidentais de alto risco assumem gradualmente o risco estimado para aquela população local[11].

Para suprir a necessidade de padronização de informações sobre as neoplasias malignas, foram criados os Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP) proporcionando comparações adequadas entre os diferentes serviços de saúde e respostas adequadas no controle e tratamento da doença.

O RCBP de Goiânia, criado em 1986, monitoriza continuamente o diagnóstico dos casos novos de câncer na cidade, permitindo a identificação do padrão de incidência e de mortalidade por câncer das mulheres goianas nos últimos anos. Torna-se importante utilizar os dados disponíveis em nossa cidade para traçar estratégias que visem a melhoria da qualidade das informações obtidas, de modo que consigamos atuar de modo efetivo e direto na nossa comunidade.

A partir destas informações foi possível realizar a análise descritiva e analítica de 15 anos do câncer de mama feminino em Goiânia e observar a mudança no perfil diagnóstico desta neoplasia. Houve um aumento substancial de detecção de casos em estádios iniciais em detrimento a uma redução dos casos avançados, sugerindo fortemente que os programas de rastreamento esporádicos utilizados até o momento, têm de alguma forma, mudado a face do câncer de mama na nossa região[5].

A análise espacial, vertente da estatística que estuda métodos científicos de coleta, descrição e interpretação de dados georreferenciados convertidos em informações úteis na tomada de decisões[12] permite explorar fenômenos geográficos a partir da localização espacial do fenômeno.

A diferenciação espacial dentro de um determinado espaço geográfico sugere diversas formas de organização infra-estrutural, oferta e localização de serviços de saúde entre outras características que influenciam na construção político-social do território. Além disso, a localização geográfica permite o planejamento de ações de promoção do processo saúde-doença.

O uso de informações georreferenciadas proporciona um novo enfoque aos estudos epidemiológicos, possibilitando a determinação da situação de saúde em uma área, identificação de fatores e grupos de risco, planejamento e programação de atividades, monitoramento e avaliação das intervenções[13,14].

A agregação espacial de uma determinada doença pode ser atribuída a fatores demográficos, socioeconômicos, ambientais ou genéticos sobrepostos geograficamente ao padrão de ocorrência observado[15]. Os fatores sócio-econômicos interferem sobremaneira no diagnóstico e prognóstico do câncer de mama, reflexo da busca tardia à assistência médica em algumas regiões do país. O diagnóstico precoce se mostra como a principal ferramenta disponível em escala populacional para combater essa neoplasia, conseguindo alterar

favoravelmente sua história natural. Além disso, influencia na redução da mortalidade e possibilitam tratamentos menos mutilantes e agressivos[16].

Os estudos de análise geoespacial em Goiânia poderão indicar se o aumento da incidência do câncer de mama apresenta comportamento uniforme nos diversos distritos sanitários do município ou então, evidenciar quais deles se apresentam com maior incidência e com diagnóstico de tumores mais avançados, indicando a necessidade de maior atenção pelos governantes e pela sociedade em geral, para que ações e recursos sejam destinados especificamente para áreas mais carentes e para as populações sob maior risco de desenvolver o câncer de mama. Assim, espera-se contribuir com um mapeamento científico do câncer de mama na cidade de Goiânia, de forma que decisões futuras poderão ser tomadas com bases sólidas de conhecimentos científicos bem estabelecidos.

2. OBJETIVOS

1. Determinar a distribuição geoespacial do câncer de mama no município de Goiânia
2. Descrever epidemiologicamente o câncer de mama entre os anos de 1998 a 2002.
3. Determinar a incidência do câncer de mama correlacionando-a com a distribuição geoespacial.

3. METODOLOGIA

Para a realização deste projeto foram utilizados os dados coletados e processados pelo Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia, entre os anos de 1998 a 2002. Os casos registrados de câncer de mama foram classificados de acordo com a sua distribuição nos seus respectivos distritos sanitários dentro da cidade de Goiânia.

Critérios de Inclusão: Casos de câncer de mama em mulheres residentes na área de 739km² que corresponde ao município de Goiânia, diagnosticada anualmente no período de 1998 a 2004.

Critérios de Exclusão: Mulheres com moradia fixa em Goiânia após o diagnóstico ou com residência fixa fora do município e casos que ocorreram viés da coleta, como registro duplo, câncer de mama em homem ou inclusão de laudos histopatológicos de doença benigna.

Coleta de dados do registro: Os coletadores do Registro visitaram anualmente cerca de 300 instituições, entre laboratórios de patologia clínica e anatomia patológica, centros de diagnóstico, consultórios médicos, hospitais públicos, privados e filantrópicos e a Divisão de Morbi-Mortalidade da Secretaria Estadual de Saúde. As informações incompletas e dúbias foram sistematicamente investigadas pelas coletoras de registro, e os dados finais foram anotados em ficha própria e arquivados no Registro. Três arquivos separados foram comparados a fim de se evitar as duplicidades. O sistema de processamento de dados do RCBP foi inicialmente desenvolvido em *Dbase III Plus* e posteriormente convertido para a linguagem Clipper versão 5.01. O RCBP de Goiânia vem atendendo a praticamente todas as recomendações da Associação Internacional dos Registros de Câncer (IACR), quanto ao registro das informações relacionadas ao câncer e ao paciente.

Definição das variáveis: As seguintes variáveis foram consideradas para análise de associação:

- Idade: em anos completos, por ocasião da doença;
- Extensão tumoral: categorizado como '*in situ*', localizado, regional, metastático;
- Tipo histológico: utilizando-se a Classificação internacional de Doenças (CID 10);
- Freqüência geoespacial: distribuição dos casos de câncer de mama nos distritos sanitários de Goiânia;
- Incidência: número de casos novos de câncer de mama diagnosticados anualmente, entre o período de 1988 e 2002, dividido pela população no ano de 2000, multiplicado pela constante (100.000).

Análise estatística: Utilizou-se o software SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences) versão 15.0 para a confecção do banco de dados e para as análises estatísticas e o Editor de Planilhas Excel® 2007 para confecção

das tabelas e gráficos. Foram realizadas análises de freqüências para todas as variáveis e análises de tendência central para determinação da média da idade.

4. RESULTADOS

Foram coletados 1.244 casos de câncer de mama diagnosticados no período de 1998 a 2002. A média de idade verificada foi de 53,4 anos, sendo que 15,6% apresentavam idade inferior a 40 anos, e 31,8% idade superior a 60 anos. 97,5% dos diagnósticos foram confirmados através de exame histopatológico, e 1,5% foram identificados pelo atestado de óbito (figura 01).

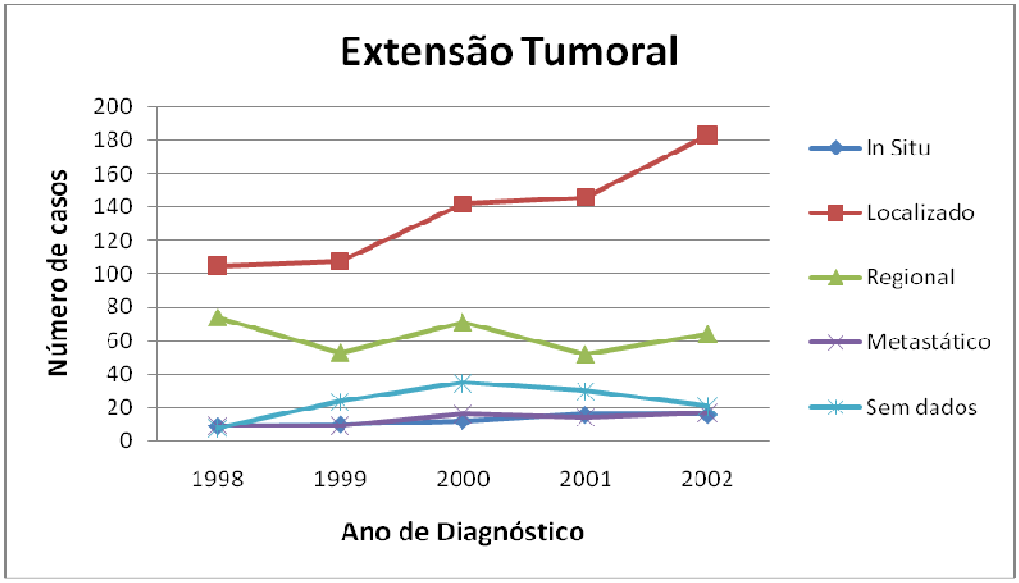
Figura 01. Frequências absoluta e relativa das variáveis idade, base do diagnóstico e extensão tumoral das pacientes com câncer de mama do município de Goiânia (1998 a 2002) (n:1244)

Variáveis		N	%
Idade	**≤40**	194	15,6
	41-59	654	52,6
	≥60	396	31,8
Base do Diagnóstico	**Histopatológico**	1214	97,5
	Citológico	3	0,25
	Clínico	7	0,56
	Imagem	1	0,08
	Atestado de óbito	19	1,5
Extensão	**In Situ**	63	5
	Localizado	684	55
	Loco-regional	314	25,2
	Metastático	65	5,2
	Sem informação	118	9,5

Quanto à extensão do tumor, evidenciou-se que 55% dos tumores eram localizados, 25,2% eram classificados como locorregionais, 5,2% das pacientes apresentavam metástase à distância no momento do diagnóstico e apenas 5% dos casos eram carcinomas 'in situ'. No presente estudo 9,5% dos casos diagnosticados não apresentavam informação quanto à extensão da lesão.

Houve um aumento de aproximadamente 11% do diagnóstico de tumores localizados (figura 02).

Figura 02. Evolução da distribuição percentual entre todos os casos de câncer de mama segundo a extensão da doença, por ano de diagnóstico.



No ano de 1998 foram registrados 205 novos casos de câncer de mama, 204 casos foram registrados no ano de 1999, 276 casos em 2000, 258 no ano de 2001 e 301 novos casos no ano de 2002, observando-se um aumento de 47% entre o primeiro e último ano analisado. No mesmo período foram georreferenciados respectivamente 196, 192, 255, 247, 295 casos de câncer de mama no município de Goiânia. (figura 03).

Figura 03. Relação entre casos de câncer de mama diagnosticados e georreferenciados no período de 1998 a 2002.

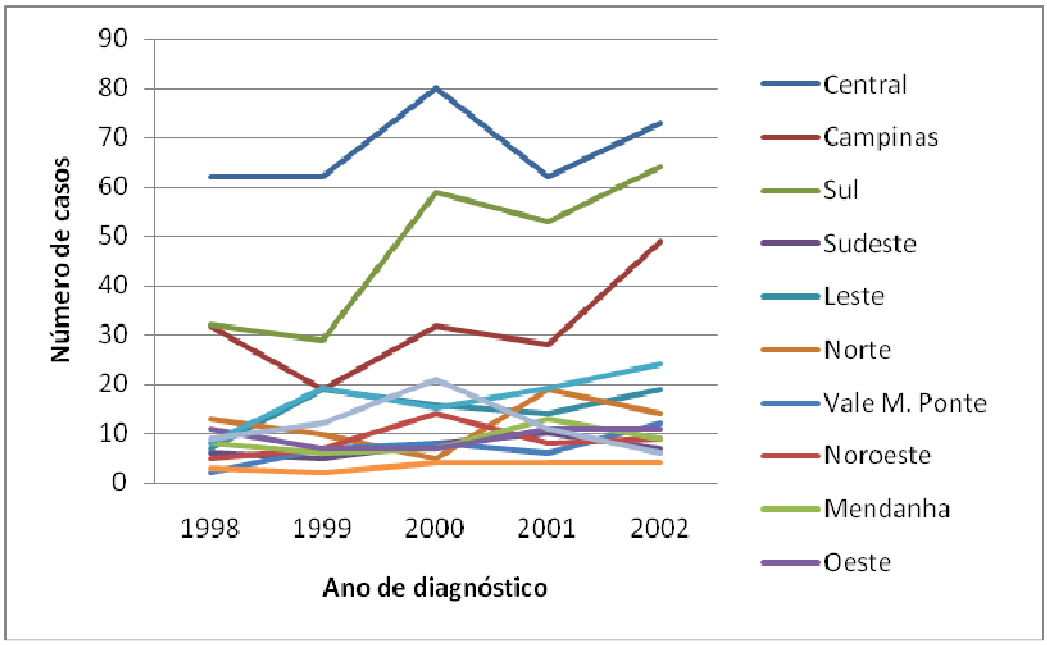
Ano	*Casos diagnosticados*	*Casos Georreferenciados*	*%*
1998	205	196	95,6
1999	204	192	94,1
2000	276	255	92,4
2001	258	247	95,7
2002	301	295	98

Utilizando-se a antiga divisão sanitária proposta pela Secretaria Municipal de Saúde, a qual contém doze distritos sanitários podemos observar que no distrito Central foram georreferenciados 339 casos (27,3%), no distrito Campinas 160 casos (12,9%), 237 casos no distrito Sul (19,1%), 36 no distrito Sudeste (2,9%), 75 no distrito Leste (6%), 61 casos no distrito Norte (42,4%), 35 no distrito Vale do Meia Ponte (2,8%), 43 casos no distrito Noroeste (3,5%), 43 no distrito Mendanha, 47 no distrito Oeste (3,5%), 92 casos no distrito Sudoeste I (7,4%), 17 no distrito Sudoeste II (1,4%) e 59 casos não foram georreferenciados (4,7%). A figura 04 mostra as frequências absoluta e relativa e a figura 05 mostra a evolução percentual dos casos de câncer de mama georreferenciados para os distritos sanitários de acordo com cada ano.

Figura 04. Frequências absoluta e relativa dos casos de câncer de mama entre os anos de 1998 e 2002 de acordo com seus respectivos distritos sanitários (n:1244).

	1998 **n(%)**	**1999** **N(%)**	**2000** **N(%)**	**2001** **N(%)**	**2002** **N(%)**
Central	62 (30,3)	62 (30,4)	80 (29)	62 (24)	73 (24,3)
Campinas	32 (15,6)	19(9,3)	32(11,6)	28 (10,8)	49 (16,3)
Sul	32 (15,6)	29 (14,2)	59(21,4)	53 (20,5)	64 (21,3)
Sudeste	6 (3)	5 (2,5)	8 (2,9)	10 (3,9)	7 (2,3)
Leste	7 (3,4)	19 (9,3)	16 (5,8)	14 (5,4)	19 (6,3)
Norte	13 (6,3)	10 (3,4)	5 (1,8)	19 (7,4)	14 (4,6)
Vale M. Ponte	2 (0,9)	7 (3,4)	8 (2,9)	6 (2,3)	12 (4)
Noroeste	5 (2,4)	7 (3,4)	14 (5)	8 (3,1)	9 (3,5)
Mendanha	8(3,9)	6 (2,9)	7 (2,5)	13 (5)	9 (3,5)
Oeste	11 (5,4)	7 (3,4)	7 (2,5)	11 (4,3)	11 (4,3)
Sudoeste I	8 (3,9)	19 (9,3)	15 (5,4)	19 (7,4)	24 (7,8)
Sudoeste II	3 (1,5)	2 (1)	4 (1,5)	4 (1,6)	4 (1,3)
Sem informação	9 (4,4)	12 (5,9)	21 (7,6)	11 (4,3)	6 (2,3)
Total	205	204	276	258	301

Figura 05. Evolução percentual da distribuição dos casos de câncer de mama por distrito sanitário do município de Goiânia entre 1998 e 2002.

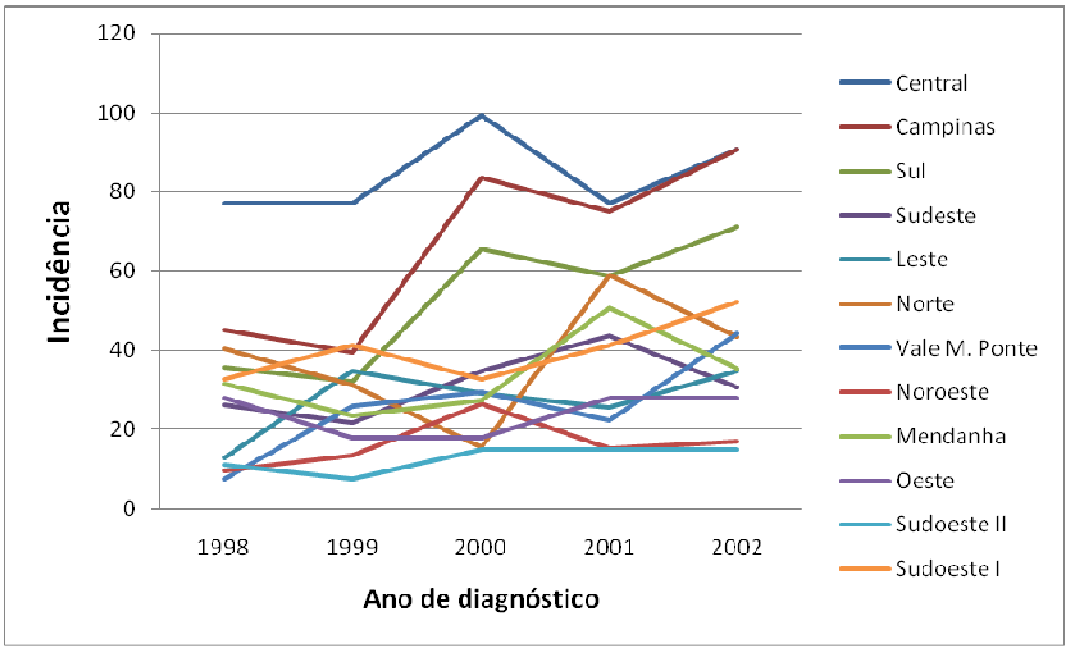


Foi realizado também o cálculo da incidência de câncer de mama utilizando-se como denominador a população feminina com residência fixa no município de Goiânia no ano de 2000, disponibilizado pela Secretaria Municipal de Planejamento, tendo como fonte o Censo Demográfico 2000 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (figura 06 e 07).

Figura 06. Incidência anual do câncer de mama na cidade de Goiânia por distrito Sanitário (nº casos/100.000)

	1998	1999	2000	2001	2002
Central	77	77	99,4	77	90,7
Campinas	45,3	39,6	83,5	75	90,6
Sul	35,6	32,2	65,6	58,9	71,2
Sudeste	26	21,7	34,8	43,5	30,4
Leste	12,8	34,8	29,3	25,6	34,8
Norte	40,3	31	15,5	58,9	43,4
Vale M. Ponte	7,4	25,8	29,5	22,1	44,2
Noroeste	9,5	13,3	26,6	15,2	17,1
Mendanha	31,3	23,4	27,3	50,8	35,2
Oeste	28	17,8	17,8	28	28
Sudoeste I	32,7	41,4	32,7	41,4	52,3
Sudoeste II	11,1	7,4	14,8	14,8	14,8

Figura 07. Evolução da incidência do câncer de mama no município de Goiânia por distrito sanitário (nº de casos/100.000 mulheres)



O efeito espacial pode ser visto nos mapas para 1998 e 2002 nas figuras abaixo.

Figura 08. Distribuição espacial da incidência do câncer de mama no ano de 1998

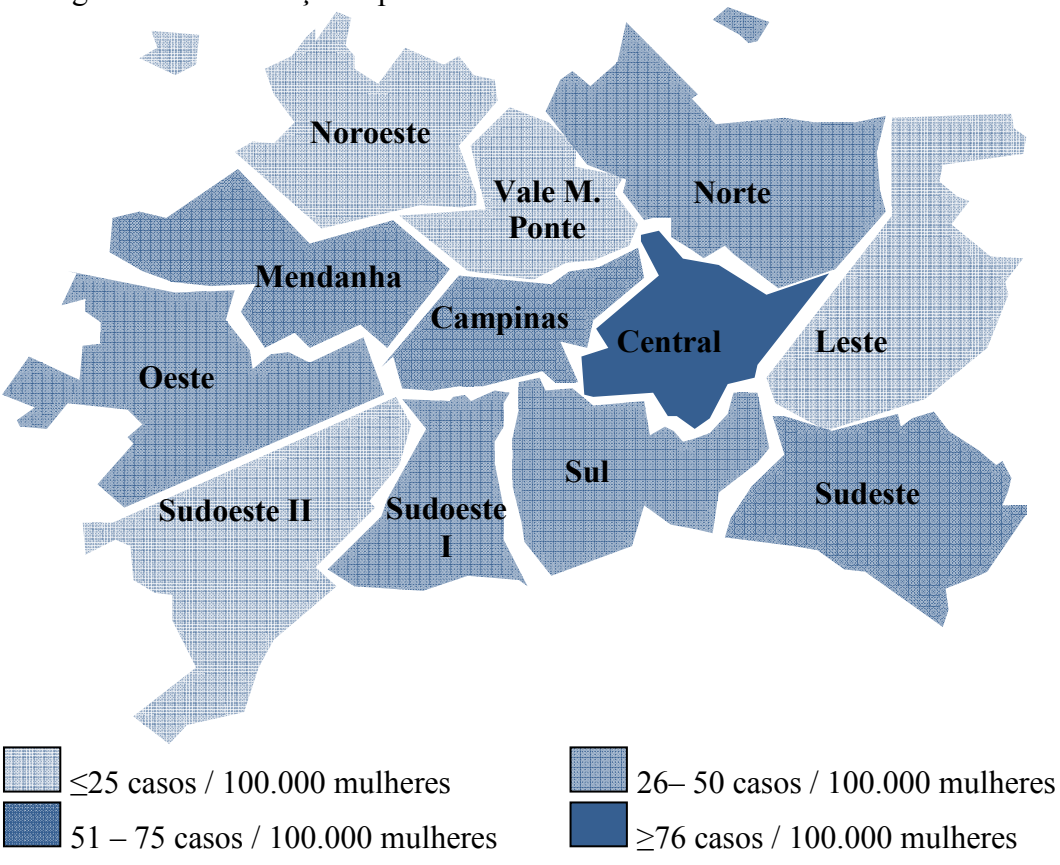
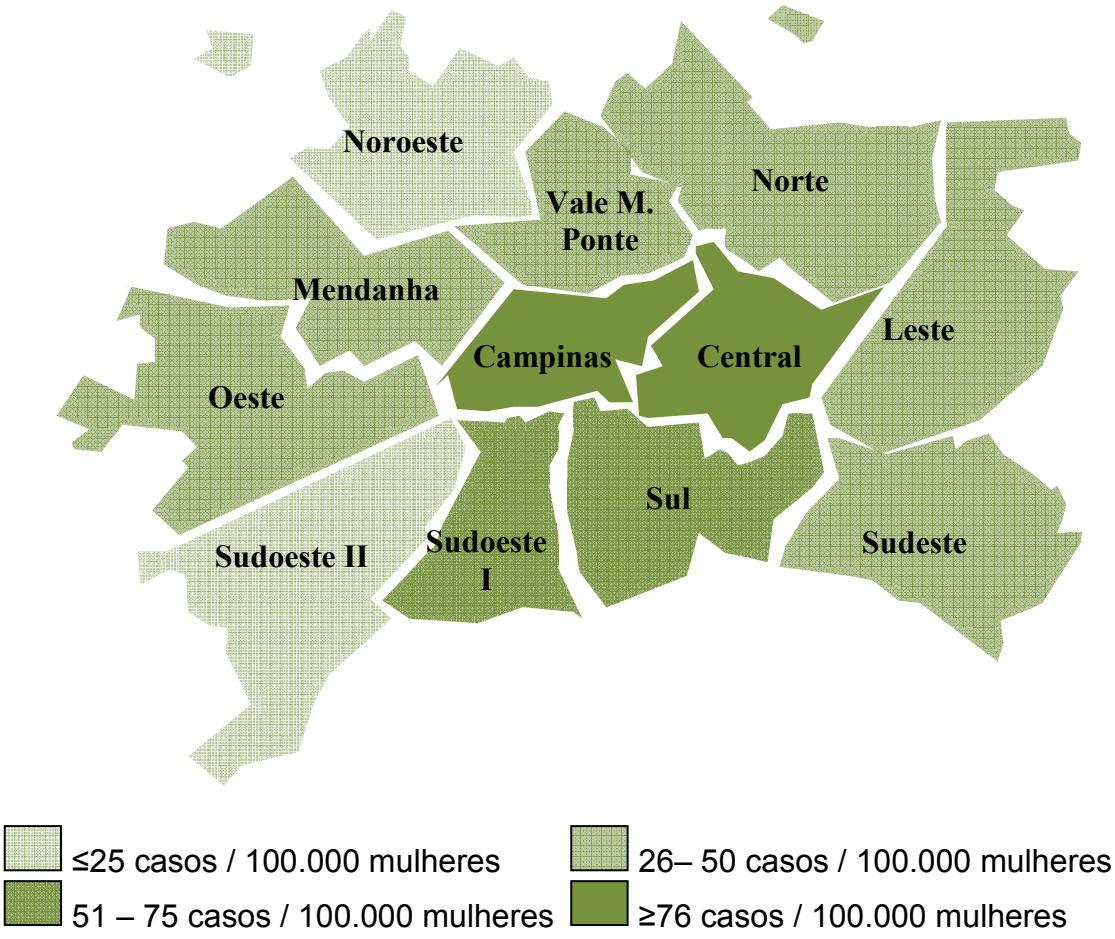


Figura 09. Distribuição espacial da incidência do câncer de mama no ano de **2002**



5. DISCUSSÃO

No presente estudo a média de idade das pacientes foi de 53,4 anos comprovando que o câncer de mama é mais frequentemente diagnosticado em mulheres acima de 50 anos de idade, reforçando a idéia de que programas de prevenção e rastreamento de câncer de mama devam ser destinados às mulheres dentro da faixa etária de risco.

A confirmação diagnóstica do câncer de mama através do exame histopatológico encontrado em mais de 97% dos casos valida e garante as informações geradas pelo nosso estudo coletadas através dos dados coletados pelo Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia.

O presente estudo corrobora com a literatura em relação ao aumento do diagnóstico em estadios cada vez mais iniciais o que influencia diretamente na sobrevida das pacientes. Mais da metade dos casos estudados encontraram-se

limitados à mama acometida (in situ ou localizado) sem invasão linfonodal ou metástase à distância. Esses dados sugerem que as ações de políticas públicas associadas às ações do setor privado têm gerado benefícios para a população possibilitando o diagnóstico precoce do câncer de mama. Porém, ao se comparar com dados de países desenvolvidos fica evidente que novas ações devam ser propostas ou ampliadas para aumentar o diagnóstico em fases ainda mais iniciais como o carcinoma *in situ*.

Com as técnicas de georreferenciamento, os dados epidemiológicos podem ser agregados ao local em que ocorreu , enriquecendo a qualidade das informações obtidas sobre o estudo, permitindo também a troca de influências com o meio. Assim, os profissionais de saúde podem intervir em áreas que possivelmente tenham uma taxa de ocorrência de eventos mórbidos maiores naquele período.

Dentre os doze distritos sanitários do município de Goiânia, o que apresentou uma maior frequência absoluta e relativa de novos casos de câncer de mama entre os anos de 1998 e 2002 foi o distrito Central, seguido do distrito Sul, Campinas e Sudoeste I. Entretanto, visto que a densidade demográfica varia conforme região é necessário observar a real situação epidemiológica do câncer de mama em Goiânia através dos cálculos de incidência por distrito.

Entretanto, mesmo apresentando uma população mais numerosa estes distritos apresentaram também uma maior incidência de câncer de mama. Tal fato pode ser explicado pelo aumento de campanhas de rastreamento oportunístico de câncer de mama no nestes distritos ou mesmo pela difusão de informações de prevenção do câncer de mama entre as mulheres desta região, ou ainda pelo maior número de profissionais da área da saúde capacitados em patologias mamárias.

A partir desta análise, pode ser observado também que embora tenha tido um aumento absoluto dos casos de câncer de mama no distrito sanitário Central, entre o primeiro e o ultimo ano estudado, houve uma redução percentual dos casos, em contrapartida ao aumento percentual nos distritos sanitários Sul e Campinas, e a pequena alteração entre os outros distritos.

Tais dados refletem na incidência do câncer de mama nestes distritos, mostrando um aumento bastante evidente da incidência principalmente nos distritos Campinas e Sul.

A proposta de mapear a incidência do câncer de mama na cidade de Goiânia através de sistema de informações georreferenciadas possibilita um melhor entendimento das tendências do comportamento epidemiológico desta neoplasia através da representação visual dos dados tabulares que no formato textual não seriam percebidas devido ao grande volume de dados a serem analisados. Assim o sistema desenvolvido por nosso grupo se torna-se uma ferramenta de extrema importância para a tomada de decisões, criação de políticas publica e planejamento estratégico.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que o câncer de mama na cidade de Goiânia foi mais frequentemente diagnostica na quinta e sexta década de vida. Além disso, conclui-se também que houve um aumento substancial dos casos de câncer de mama em estadios iniciais (localizado + in situ).

Quanto às unidades sanitárias georreferenciadas pode-se concluir que há uma maior frequência de casos de câncer de mama no distrito sanitário Central, seguido pelo Sul, Campinas e Sudoeste I. Além disso, a partir dos dados geoprocessados, conclui-se que estes mesmos distritos apresentam maior incidência de câncer de mama comparado a outros distritos, seja por maior capacitação de profissionais para firmarem diagnóstico cada vez mais precoce de câncer de mama e com isso aumentando o número de casos novos, seja pelas campanhas de rastreamento oportunístico, seja pela maior difusão de orientações sobre prevenção entre as mulheres residentes nestas áreas, ou ainda, por maior exposição à fatores ambientais e sócio-econômicos determinantes na gênese deste tumor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PARKIN D. Global cancer statistics in the year 2000. Lancet Oncol 2001; 2: 533-43
2. INCA (Instituto Nacional de Câncer). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2008

3. DERSHAW DD. Mammographic screening of the high-risk woman. Am J Surg 2000; 80: 288-9
4. FREITAS-JÚNIOR R, FREITAS NM, CURADO MP, et al. Variations in breast cancer incidence per decade of life (Goiânia, GO, Brazil): 16-year analysis. Cancer Causes Control. 2008;19(7):681-7
5. MARTINS E, FREITAS-JUNIOR R, FREITAS NM. Câncer de mama em Goiânia: análise descritiva de base populacional de 15 anos. Rev Bras Ginecol Obstet *in press*
6. ARLY BREAST CANCER TRIALISTS. COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. Lancet, 2005; 365: 1687-717.
7. BARRATT A, HOWARD K, IRWIG L, SALKELD G, HOUSSAMI N. Model of outcomes of screening mammography: information to support informed choices. Br Med J, 2005; 330: 936-41.
8. PAULINELLI RR, FREITAS-JÚNIOR R, CURADO MP, SOUZA AA. A situação do câncer de mama em Goiás, no Brasil e no mundo: tendências atuais para a incidência e a mortalidade. Rev Bras Saúde Matern Infant. 2003; 3: 1724
9. MEDRONHO RA, PEREZ MA. Distribuição das doenças no espaço e no tempo. In: MEDRONHO RA, CARVALHO DM, BLOCH KV, LUIZ RR, WERNECK GL. *Epidemiologia*. São Paulo: Atheneu; 2004: 57-71
10. ABELOFF MD, WOLFF AC, WOOD WC, MCCORMICK B. Cancer of the breast. In: ABELOFF MD, ARMITAGE JO, NIEDERHUBER JE, KASTAN MB, McKENNA WG. Clinical Oncology.3a ed., Elsevier, Philadelphia, 2004: 2369- 70.
11. ZIEGLER RG, HOOVER RN, PIKE MC, ET AL. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. J Natl Cancer Inst, 1993; 85: 1819 - 27.
12. ASSUNÇÃO, R, M. Estatística Espacial com Aplicações em Epidemiologia, Economia e Sociologia. São Carlos: Associação Brasileira de Estatística, 2001
13. BAVIA, M. E. O controle das doenças: Trilhando os caminhos das geotecnologias. In: CHAVES, J.M.; ROCHA, W.J.S. Geotecnologias: Trilhando novos caminhos nas geociências. Sociedade Brasileira de Geotecnologia SBG- Núcleo BA/SE, 2006: 85-98.
14. LAGROTTA, M.T.F; SILVA, W.C.; SOUZA-SANTOS, R. Identification of key areas for *Aedes aegypti* control through geoprocessing in Nova Iguaçu, Rio de Janeiro State, Brazil. Cad Saúde Pública. 2008; 24(1)
15. MARSHALL, R. J. A review of methods for the statistical analysis of spatial pattems of disease. Joumal of the Royal Statistical Society. 1991; 154: 421-41
16. SCLOWITZ, M.L.; MENEZES, A.M.B.; GIGANTE, D.P.; TESSARO, S.C. Condutas na prevenção secundária do câncer de mama e fatores associados. Rev Saúde Pública, 2005; 39(3): 340-9

Avaliação de diferentes métodos utilizados na obtenção de nanocarreadores e sua influência nas características físico-químicas e eficiência de encapsulação dos nanossistemas.

Lívia Palmerston Mendes[a], Fabrícia Saba Ferreira[a], Eliana Martins Lima[a]
[a]*Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74000-000, Brasil*
E-mail: emlima@farmacia.ufg.br

Palavras-chave: lipossomas, micelas poliméricas, paclitaxel.

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma área da ciência destinada ao desenvolvimento, construção e utilização de estruturas funcionais na escala nanométrica, na qual as características fundamentais dos materiais podem ser controladas sem que haja mudança na sua composição química. (PARK *et al*, 2008). A liberação controlada de fármacos em um sítio de ação específico a uma faixa terapêutica e posologia ótimas tem sido a maior meta no desenvolvimento dessas estruturas (SOPPIMATH *et al*, 2001).

Lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, ficando as primeiras no compartimento aquoso e as outras inseridas ou adsorvidas na membrana. (BATISTA *et al*, 2007). As vantagens da utilização de lipossomas incluem: proteção do fármaco contra degradação, direcionamento a um sítio específico e diminuição da toxicidade e dos efeitos colaterais (SOPPIMATH *et al*, 2001). A estrutura, o tamanho (que pode variar entre 20nm a 10 μm) e a composição química fornecem aos lipossomas propriedades que podem ser úteis em várias aplicações. Essas características podem ser controladas pelos diferentes métodos de preparação. Como podem ser compostos de substâncias completamente naturais, são não-tóxicos, biodegradáveis e não imunogênicos (LASIC, 1995).

Embora os lipossomas sejam considerados potenciais transportadores de diferentes fármacos, resultados efetivos tornam-se dependentes de problemas inerentes aos lipossomas como, baixa eficiência de encapsulação, rápida liberação de fármacos solúveis em água na presença de componentes sanguíneos e baixa

estabilidade durante o armazenamento. Por outro lado, nanopartículas poliméricas biodegradáveis podem oferecer vantagens sobre os lipossomas (SOPPIMATH *et al,* 2001).

Copolímeros bloco são macromoléculas de conformação linear e/ou radial de dois ou mais diferentes blocos de uma variação de composição de monômeros (RIESS, 2003). Através de uma auto-organização desses copolímeros bloco em ambiente aquoso, micelas poliméricas podem ser formadas. Os blocos hidrofóbicos do copolímero formam o núcleo da micela, enquanto os blocos hidrofílicos formam a camada externa, gerando estruturas nanométricas. No núcleo hidrofóbico podem ser incorporados e armazenados fármacos pouco solúveis em água e a região externa hidrofílica biocompatível protege o núcleo e estabiliza a interface entre o mesmo e o meio externo (ALLEN *et al*, 1999; SHIN *et al,* 2009). A morfologia dessas micelas é principalmente determinada por um equilíbrio entre os segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos do copolímero bloco. Quando a porção hidrofóbica do copolímero bloco varia entre 42 e 50%, há uma forte tendência a formação de micelas tubulares; acima de 50% podem existir tanto micelas tubulares quanto cilíndricas (AHMED e DISCHER, 2004).

Dentre as vantagens desses sistemas, além da fácil incorporação de fármacos hidrofóbicos no interior das micelas, também há o fato de possuírem tamanho apropriado, que permitem a elas escapar da excreção renal ao mesmo tempo em que conseguem extravasar e acumular nos tumores. Outro aspecto interessante é que quando a camada externa é formada por PEO (polioxietileno), elas são capazes de circular no sangue por períodos de tempo mais longos sem serem reconhecidas e eliminadas (HUSSEINI e PITT, 2008).

Paclitaxel é um triterpeno poliidroxilado extraído de *Taxus bevifolia,* uma árvore do Pacífico e foi isolado pela primeira vez em 1971, por Wall e colaboradores nos Estados Unidos. Um grande problema na extração do paclitaxel é que a espécie *Taxus brevifolia* demora cerca de 100 a 200 anos para atingir a maturidade e encontra-se em extinção. Para contornar esse problema, desenvolveu-se um método de semi-síntese para obter o paclitaxel em poucas etapas (SOUZA, 2004). Ele é um agente quimioterápico efetivo contra carcinomas de mama, ovário, pulmão e bexiga. O mecanismo da atividade antitumoral envolve a inibição do crescimento celular por estabilização de microtúbulos formados através da ligação não covalente

com tubulinas, impedindo a despolarização necessária a replicação celular, bloqueando assim, o processo de divisão celular (FENG *et al,* 2007).

Sua formulação usual utiliza Cremofor EL (óleo polietoxilado) e etanol (1:1) como veículo. A quantidade necessária de Cremofor para veicular as doses requeridas de paclitaxel é significativamente alta. Entretanto, vários efeitos colaterais estão relacionados a esse veículo, como nefrotoxicidade, neurotoxicidade e reações de hipersensibilidade. O principal objetivo do desenvolvimento de novas formulações para o paclitaxel visa eliminar esses problemas. Como estratégias para alcançar esses objetivos, formulações como uso de co-solventes, emulsificação, micelização, formação de lipossomas e inclusão em ciclodextrinas vêm sendo testadas (SINGLA *et al,* 2002).

2 OBJETIVO

Os objetivos desse trabalho foram comparar a performance de diferentes métodos utilizados no desenvolvimento de nanossistemas contendo paclitaxel, promover a caracterização físico-química e avaliar a citotoxicidade desses nanossistemas.

2.1 Objetivos específicos

- Obter vesículas lipídicas e micelas tubulares contendo paclitaxel;
- Determinar a eficiência de encapsulação do paclitaxel nos lipossomas e nas micelas tubulares;
- Efetuar a caracterização físico-química dos nanossistemas obtidos;

3 METODOLOGIA

3.1 Preparo dos nanossistemas

3.1.1 Preparação dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados empregando-se o método de hidratação do filme lipídico. Para a preparação utilizou-se fosfatidilcolina na concentração de 20mM.

Solução de fosfatidilcolina em clorofórmio, fase orgânica, foi colocada em um balão de fundo redondo, no qual formou-se um filme lipídico por evaporação do

clorofórmio induzido por uma atmosfera de nitrogênio. O balão foi deixado em freezer durante 12 horas para remoção do solvente remanescente. O filme foi hidratado com uma fase aquosa (tampão TES – 1,14 g de TES em 1 litro de água destilada, o pH foi acertado para 7,0 com hidróxido de amônio) e levado ao agitador tipo vórtex. Após 10 ciclos de extrusão utilizando-se membrana de policarbonato 100 nm e uma pressão de 200 psi obteve-se uma preparação contendo vesículas unilamelares pequenas de tamanho mais uniforme.

3.1.2 Preparação das micelas tubulares

As micelas tubulares foram preparadas pelo método de evaporação do solvente. Para a preparação das micelas tubulares utilizou-se copolímero bloco poli (etileno óxido) - *b* - poli (ε-caprolactona) (5000-6500) (PCL) nas concentrações de 1 e 10 mg/mL.

Preparou-se uma solução de copolímero bloco em clorofórmio. Em seguida adicionou-se essa solução em 3 mL de fase aquosa (tampão TES) e a deixou em agitação magnética vigorosa por 2 horas para remoção do clorofórmio e por mais 12 horas em agitador de baixa rotação dentro de uma câmara fria.

3.1.3 Preparação dos lipossomas com paclitaxel

A preparação de lipossomas contendo paclitaxel foi realizada de acordo com o item 3.1.1.

Preparou-se uma solução mãe de paclitaxel em metanol, da qual diferentes volumes foram adicionados na fase orgânica da preparação dos lipossomas, devido ao caráter lipofílico da molécula resultando em preparações contendo 1mg, 2,5 mg, 3 mg ou 5 mg de paclitaxel.

3.1.4 Preparação das micelas tubulares com paclitaxel

Micelas tubulares foram preparadas conforme descrito no item 3.1.2. Inicialmente preparou-se uma solução mãe de paclitaxel em metanol. Adicionou-se solução de paclitaxel em metanol às preparações de micelas tubulares prontas, deixando por cerca de 1 hora sob agitação vigorosa para remover o solvente. Em seguida, os frascos foram levados de volta à câmara fria por mais 12 horas em agitador de baixa rotação para a completa remoção de todo o metanol.

3.2 Medida do tamanho dos nanossistemas

A média e a distribuição do tamanho das vesículas lipídicas foram determinadas utilizando-se a técnica de espalhamento de luz em um equipamento Zetasizer Nano-S.

As micelas tubulares foram observadas em microscópio ótico de fluorescência para determinação do tamanho e morfologia.

3.3 Determinação dos parâmetros analíticos do paclitaxel

3.3.1 Desenvolvimento de metodologia analítica para a quantificação do paclitaxel por cromatografia líquida de alta eficiência

Preparou-se uma solução de paclitaxel em metanol para o desenvolvimento do método cromatográfico, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises foram realizadas usando uma coluna C_{18} (150x4,6mm; Chromsep SS Omnispher®; 5µm), detector UV no comprimento de onda de 227 nm. Testaram-se diferentes composições de fase móvel e fluxo.

3.3.2 Determinação da curva de calibração do paclitaxel

Foi preparada uma solução mãe de concentração 100µg/ml em metanol. Esta solução foi diluída, obtendo-se os seguintes pontos: 80µg/ml; 50µg/ml; 20µg/ml; 8µg/ml; 5 µg/ml e 2 µg/ml.

3.4 Determinação da eficiência de encapsulação

3.4.1 Separação do fármaco livre e fármaco encapsulado

A separação do fármaco livre do fármaco encapsulado nos nanossistemas foi realizada por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos utilizando uma centrífuga Sigma 3-18K O fármaco livre precipita e o sobrenadante é retirado para posterior quantificação.

3.4.2 Análise do fármaco encapsulado

A quantificação do fármaco encapsulado nos nanossistemas foi realizada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência pelo método desenvolvido no item 3.3.1. Os cálculos foram realizados com base nas respectivas curvas de calibração.

Uma alíquota de 200 µL foi retirada do sobrenadante e misturada com 1 mL de metanol, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 5000 rpm e, posteriormente, quantificou-se o paclitaxel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparação dos nanossistemas

Foi formada uma dispersão com aparência leitosa, azulada e translúcida, após os 10 ciclos de extrusão dos lipossomas, devido à diminuição do tamanho das vesículas. Ao acrescentar paclitaxel em quantidades mais elevadas, a preparação perdeu um pouco o brilho azulado e ficou com uma aparência mais opaca, devido ao fármaco livre presente na amostra. O processo de centrifugação realizado para a remoção do fármaco livre fez com que ocorresse a precipitação do paclitaxel que estava em excesso fazendo com que a dispersão ficasse mais límpida.

Durante o preparo das micelas tubulares observou-se que a preparação sem fármaco apresentava-se mais transparente quando acrescentou o fármaco, a dispersão ficou com um caráter opaco em virtude do fármaco que não estava incorporado nas micelas.

4.2 Determinação do tamanho dos nanossistemas

O tamanho dos lipossomas obtidos neste estudo foi em torno de 104nm de diâmetro e o índice de polidispersão menor que 0,1, indicando homogeneidade das nanoestruturas. Li *et* al (2007) obteve lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação com diâmetro médio de 207 nm, enquanto que por extrusão, Crosasso *et al* (2000), conseguiu vesículas de 120nm. O tamanho mais reduzido dos lipossomas obtidos permite que eles sejam capturados pelos macrófagos com menor eficiência que lipossomas grandes, permanecendo mais tempo na circulação sanguínea e apresentando uma liberação mais prolongada (FRÉZARD *et al,* 2005).

O perfil de formação dos lipossomas (Figura 1) mostra que a partir do sexto ciclo de extrusão já não houve grande mudança no tamanho das vesículas. Entretanto, optou-se por realizar 10 ciclos para garantir um tamanho ainda menor e maior homogeneidade.

Após uma semana, não foi observada alteração no tamanho dos lipossomas, indicando que as vesículas encontravam-se estáveis, sem aglomeração.

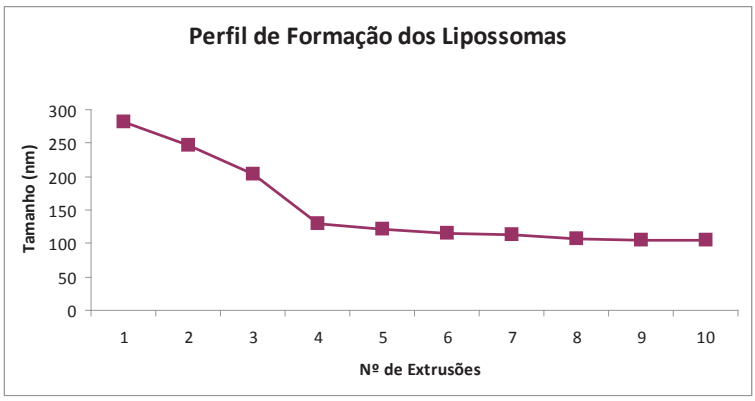


Figura 1: Perfil de formação dos lipossomas

As micelas poliméricas foram analisadas por microscopia ótica, onde observou-se certa heterogeneidade no tamanho, que variava 2 a 3µm (Figura 2). Geng e Discher (2006) obtiveram micelas tubulares com tamanhos maiores que 10µm. No presente trabalho as micelas tiverem um menor tamanho provavelmente em virtude do tempo de agitação, em agitador magnético, que pode ter promovido uma quebra mecânica dessas micelas.

O grande comprimento das micelas tubulares favorece a encapsulação de maior quantidade do fármaco na porção hidrofóbica interna quando comparado às em micelas esféricas, podendo as primeiras encapsular até 2 vezes mais que as últimas (CAI *et al*, 2007).

A Figura 3 mostra que houve redução no tamanho das micelas após uma semana de armazenamento a 4°C, chegando a menos da metade do tamanho inicial. Isso ocorre porque o microambiente aquoso no qual as micelas estavam armazenadas favorecem a hidrólise da porção éster da PCL na seqüência final e/ou aleatória, levando à desintegração das micelas tubulares (AHMED e DISCHER, 2004).

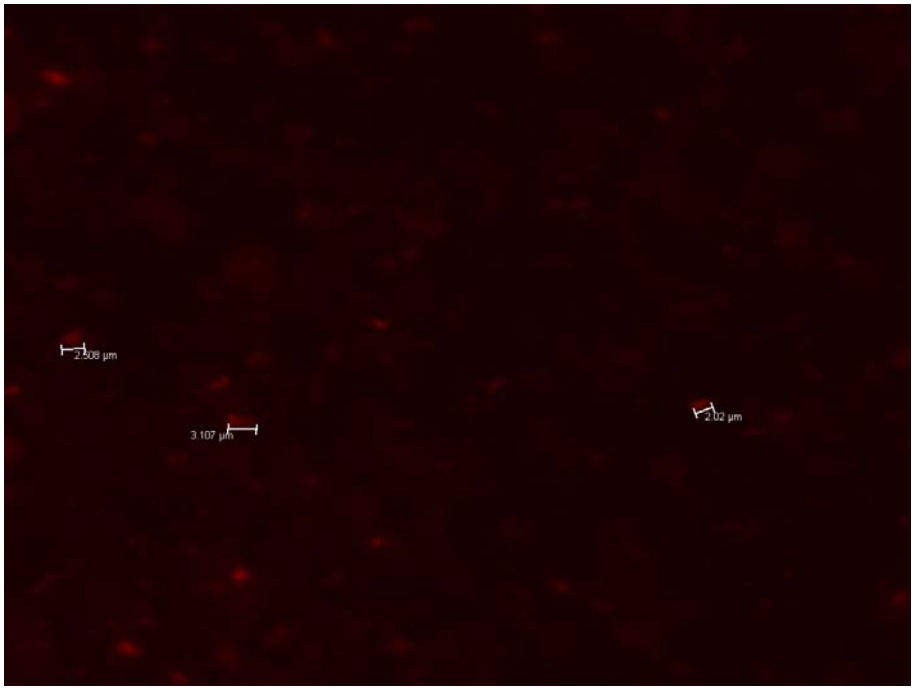


Figura 2: Fotomicrografia em micelas tubulares contendo paclitaxel logo após o preparo

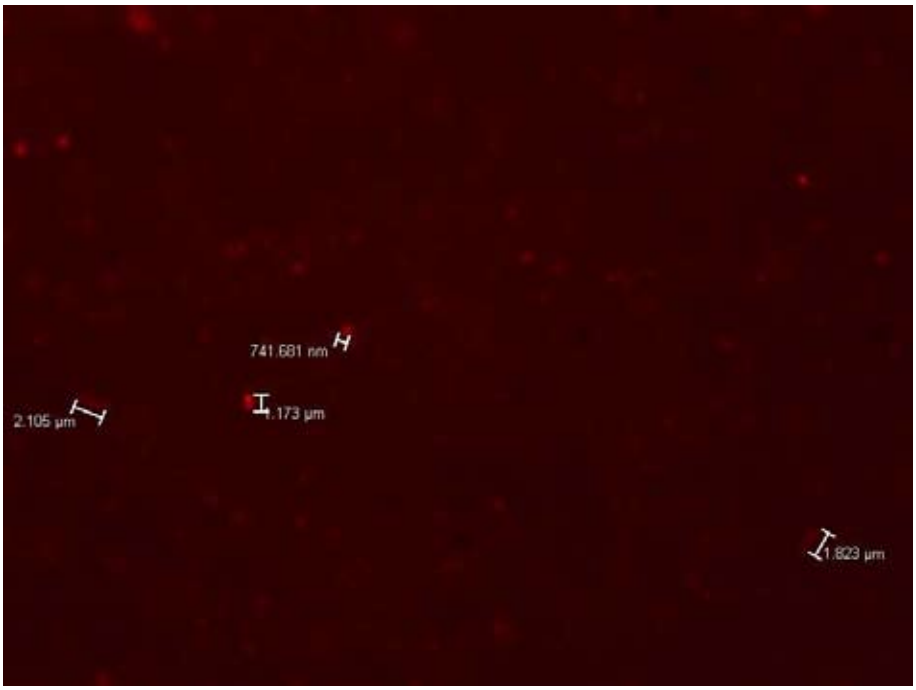


Figura 3: Fotomicrografia em micelas tubulares contendo paclitaxel 7 dias após o preparo

4.3 Parâmetros analíticos do paclitaxel

No desenvolvimento do método crotamográfico, a fase móvel escolhida para a realização das análises subsequentes foi constituída por metanol: acetonitrila e água (10:50:40); com fluxo de 1.0 mL/min. A quantidade de amostra injetada foi de 20µl.

No ensaio quantitativo por CLAE o paclitaxel apresentou tempo de retenção de 6,38 minutos (Figura 3). O pico cromatográfico mostrou-se com simetria de 1,09, sem cauda e com um tempo de análise de 18 minutos.

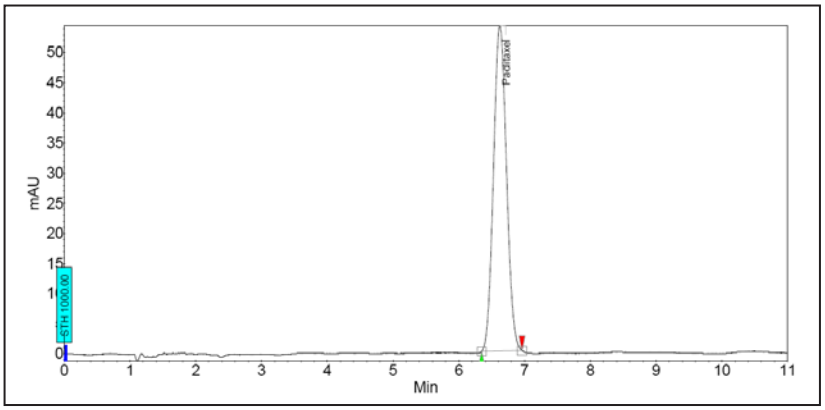


Figura 4: Cromatograma do paclitaxel. Condições cromatográficas: fase móvel, metanol:acetonitrila e água (10:50:40); fluxo de 1.0mL/min, coluna C18 (150x4,6mm; Chromsep SS Omnispher®; 5µm), comprimento de onda de 227nm, detector UV.

A curva de calibração realizada para a quantificação do paclitaxel teve como equação da reta y = 37,191x - 0,6095 e o coeficiente de correlação igual a 1.

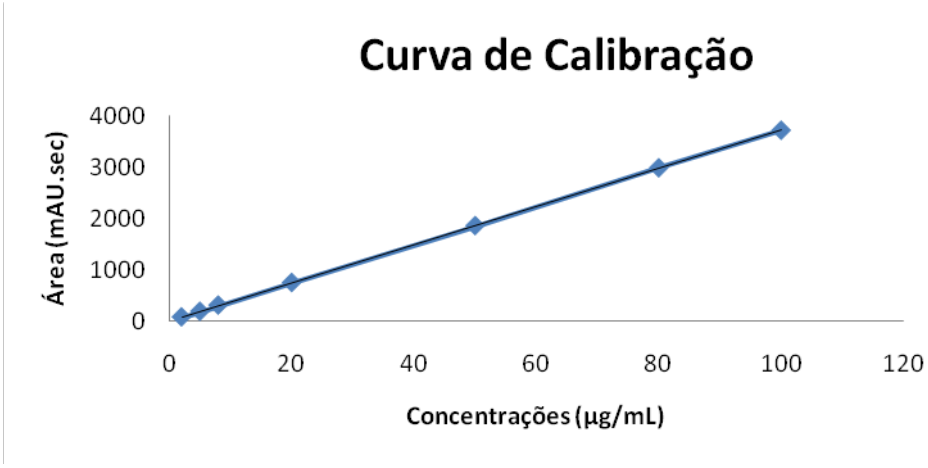


Figura 5: Curva de calibração do paclitaxel em HPLC. Condições cromatográficas: fase móvel, metanol:acetonitrila e água (10:50:40); fluxo de 1.0mL/min, coluna C_{18} (150x4,6mm; Chromsep SS Omnispher®; 5µm), comprimento de onda de 227nm, detector UV.

4.4 Eficiência de encapsulação

4.4.1 Eficiência de encapsulação dos lipossomas

A tabela 1 mostra a quantidade de fármaco encapsulado nos lipossomas. Observou-se que a formulação com 1,0 mg de paclitaxel apresentou eficiência de

encapsulação de 100%. Entretanto, a razão molar lipídio:fármaco é muito elevada 68:1. Com razão molar menor (34:1 e 29:1), obteve-se também boa encapsulação do fármaco, mostrando ser essa a faixa de maior concentração de fármaco alcançada nos lipossomas. Crosasso *et al* (2000) também obteve boa eficiência de encapsulação na razão molar de 30:1 (lipídio:fármaco). Em seu trabalho, ele aumentou a razão molar lipídio:fármaco, no entanto houve queda na eficiência de encapsulação, diferente do observado no presente estudo.

Tabela 1: Eficiência de encapsulação do paclitaxel em lipossomas contendo 20mM de fosfatidilcolina (EE% - eficiência de encapsulação em %).

	Eficiência de encapsulação			
$Pacli_{adicionado}$	**$Pacli_{encapsulado(mg)}$**	**$Pacli_{encapsulado(mM)}$**	**EE%**	**Lipídio: fármaco (razão molar)**
1 mg	1	0,29	100	68:1
2,5 mg	2,02	0,59	80	34:1
3 mg	2,37	0,69	79,24	29:1
5 mg	1,98	0,58	39,60	34:1

4.4.2 Eficiência de encapsulação das micelas tubulares

Na tabela 2 encontra-se a quantidade de fármaco encapsulado nas micelas tubulares, observando-se uma eficiência de encapsulação adequada visto que mais de 50% do fármaco colocado na amostra foi encapsulado. A região interna hidrofóbica composta por PCL fornece um ambiente favorável e compatível para solubilização do paclitaxel, que é muito pouco solúvel em água. Essa capacidade de carrear o fármaco no interior das micelas faz com que haja um aumento considerável na solubilidade do paclitaxel na água (GENG e DISCHER, 2006). Isso evita a utilização de veículos mais agressivos para solubilização do fármaco.

Tabela 2: Eficiência de encapsulação do paclitaxel em micelas tubulares (EE% - eficiência de encapsulação em %).

	Eficiência de encapsulação			
Amostra	**$Pacli_{adicionado}$**	**$Pacli_{encapsulado(mg)}$**	**$Pacli_{encapsulado(mM)}$**	**EE%**
1mg/mL	0,6 mg	0,32	0,125	53,3
10 mg/mL	2 mg	1,32	0,515	66,1

5 CONCLUSÃO

Os nanossistemas obtidos no presente estudo demonstram ser apropriados para o transporte de paclitaxel.

Os lipossomas apresentaram-se mais estáveis que as micelas, não alterando seu tamanho em um curto espaço de tempo. Mesmo tendo tamanhos mais elevados que dos lipossomas, a quantidade máxima de fármaco encapsulada nas micelas foi próxima à atingida nos lipossomas.

6 REFERÊNCIAS

AHMED, F.; DISCHER, D. E. Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles. **Journal of controlled release**, v. 96, p. 37-53, 2004.

ALLEN, C.; MAYSINGER, D.; EISENBERG, A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. **Colloids and Surfaces B**, v. 16, p. 3–27, 1999.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHAES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43 (2), p. 167-179, 2007.

CAI, S.; VIJAYAN, K.; CHENG, D.; LIMA, E. M.; DISCHER, D. E. Micelles of Different Morphologies-Advantages of Worm-like Filomicelles of PEO-PCL in Paclitaxel Delivery, **Pharmaceutical Research**, v.24, (11), p.2099-2109, 2007.

CROSASSO, P.; CERUTI, M.; BRUSA, P.; ARPICCO, S.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. **Journal of Controlled Release**, v.63, p.19-30, 2000.

FENG, S.; ZHAO, L.; ZHANG, Z.; BHAKTA, G.; WIN, K.; DONG,Y.; CHIEN, S. Chemotherapeutic engineering: Vitamin E TPGS-emulsified nanoparticles of biodegradable polymers realized substainable paclitaxel chemotherapy for 168 h in vivo, **Chemical Engineering Science,** v.62, p.6641-6648, 2007.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 18 (3), p. 511-518, 2005.

GENG, Y.; DISCHER, D. E. Visualization of degradable worm micelle breakdown in relation to drug release. **Polymer 47**, p. 2519-2525, 2006.

H.-C. Shin, et al., Multi-drug loaded polymeric micelles for simultaneous delivery of poorly soluble anticancer drugs, **Journal of Controlled Release**, **(2009), doi:10.1016/j.jconrel.2009.04.024.**

HUSSEINI, G. A.; PITT, W. G. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1137–1152, 2008.

LASIC, D. D. Handbook of Biological Physics. In: **Aplications of Liposomes**. California: R. Lipowsky and E. Sackmann, 1995. cap. 10.

LI, H.; HU, J.; WANG, K.; HE, X.; GONG, P.; ZHANG, S.; TANG,C. Preparation of PEGylated Paclitaxel Liposomes and Tissue Distribution Study in Mice. **Bioinformatics and Biomedical Engineering**, p. 1296-1298, 2007.

PARK, J. H.; LEE, S.; KIM, J.; PARK, K.; KIM, K.; KWON, I. C. Polymeric nanomedicine for cancer therapy. **Progress in Polymer Science**, v. 33 (1), p. 113-137, 2008.

RIESS, G. Micellization of block copolymers. **Progress in Polymer Science**, v. 28 p.1107–1170, 2003.

SINGLA, A. K.; GARG, A.; AGGARWAL, D. Paclitaxel and its formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, p. 179–192, 2002.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable Polymeric Nanoparticles As Drug Delivery Devices. **Journal Of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27 (2), p. 308-312, 2004.

Anotação e detecção de SNPs em genes de fatores de transcrição bHLH de *Eucalyptus* spp.

Carlos de Melo e Silva Neto[1, 3], Natália Silveira Virgili[1], Alexandre Siqueira Guedes Coelho[2]

[1]*Instituto de Ciências Biológicas/UFG*

[2]*Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos/UFG*

[3]E-mail: carloskoa@gmail.com

Palavras-chave: Polimorfismo, *primers*, EST, marcador molecular, *Genolyptus*.

INTRODUÇÃO

Fatores de transcrição pertencentes à família hélice-volta-helice básica (bHLH) são importantes componentes regulatórios na rede transcricional de muitos caminhos do desenvolvimento. (MURRE *et al*., 1989; MURRE *et al*., 1994; SUX & BALTIMORE, 1991). Eles são envolvidos na regulação de neurogêneses, miogêneses, proliferação celular e diferenciação celular, determinação das linhagens celulares, determinação do sexo e outros processos essenciais em organismos de leveduras a mamíferos (ATCHLEY & FITCH, 1997).

Proteínas bHLH são caracterizadas por possuir domínio comum altamente conservado e bipartido para ligação ao DNA e interação proteína-proteína (MURRE *et al*., 1989; MURRE *et al*., 1994).

O motivo bHLH dimerizado contêm aproximadamente 50 aminoácidos sendo que resíduos básicos e hidrofílicos, formam a região básica, seguidos de duas α-hélices anfipáticas, formando as hélices que são separadas por uma volta de tamanho variável, que é a região *loop*. (ATCHLEY & FITCH, 1997).

Os resíduos básicos são cerca de 18 aminoácidos hidrofílicos e básicos antes da região N-terminal do domínio. (MURRE *et al*., 1994). Os resíduos básicos permite a proteína bHLH se ligar ao consenso hexonucleotideo *E-box* (CANNTG) (VORONOVA & BALTIMORE, 1990). O segundo motivo, composto principalmente de resíduos hidrofóbicos refere-se ao domínio hélice-volta-hélice permitindo que este interaja com proteínas e forme homo e/ou heterodímero (MURRE *et al*., 1994).

Foram feitas várias tentativas de categorizar as proteínas bHLH dentro de um grupo de famílias de proteínas. Geralmente a classificação das proteínas bHLH é baseada em como a proteína se liga ao centro CANNTG *E-box* do DNA (ATCHLEY & FITCH, 1997)

DANG *et al.* (1992) categorizaram a maioria das proteínas bHLH dentro dos grupos A e B, e Swanson *et al.* (1995) criaram um grupo C baseado na ligação com a região *E-box*. Atchley & Fitch (1997) propuzeram um quarto grupo (grupo D) para proteínas com falta da típica região básica do DNA ligante e tem pouca freqüência de resíduos básicos entre os 13 primeiros aminoácidos, formando dímeros de proteínas-proteínas. As análises filogenéticas mostraram que as proteínas do grupo B originaram as proteínas bHLH das plantas (ATCHLEY & FITCH, 1997).

HEIM *et al.* (2003) construíram uma árvore comparativa incluindo 133 seqüências de bHLH de *Arabidopsis thaliana* e evidenciaram a existência de 12 grupos maiores (subfamílias) fortemente suportadas pela análise de *bootstrap*.

O DNA dos seres vivos, principalmente de eucariótos está repleto de regiões que se diferem entre si apenas por um único nucleotídeo, esse polimorfismo é chamado de SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*). É importante salientar que esta classe de polimorfismo representa a forma mais comum de polimorfismo encontrada em genes e apresenta enorme potencial de utilização para análise genômica (SOBRINO *et al.*, 2005; CRAIG & STEPHAN, 2005).

Os SNPs podem ser resultado de transversões, quando bases de um tipo são substituídas por bases de outro tipo (pirimidina substituída por purina, por exemplo), ou transições, quando bases de um tipo são substituídas por bases do mesmo tipo (purina substituída por purina, por exemplo). Essas mutações pontuais podem ocorrer em regiões codantes e em não codantes, em éxons ou em íntrons. Quando ocorrem em éxons, essas mutações podem gerar substituições do tipo conservativa, quando a base trocada em um códon provoca a tradução de um aminoácido com características físico-químicas semelhantes às características do aminoácido original, sem a ocorrência da mutação. Caso o novo códon originado pela mutação seja traduzido em um aminoácido cujas características físico-químicas sejam diferentes das relativas

ao original, então essa mutação será do tipo não conservativa, podendo provocar a inviabilidade da proteína produzida. Ainda podem ocorrer casos em que a mutação não altera o aminoácido traduzido, já que o código genético é degenerado, a troca de uma base por outra pode ocorrer de maneira produzir trincas que codifiquem o mesmo aminoácido (NELSON & COX, 2002). Nesse caso, a mutação é do tipo silenciosa (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

Os SNPs incluem também polimorfismos gerados pela deleção ou inserção de nucleotídeos em uma seqüência de DNA (*indels*). Alguns autores consideram ainda a restrição de que o alelo mais raro deve ocorrer com freqüência mínima de 1% para que o polimorfismo seja reconhecido como um SNP (BROOKES, 1990).

Dentre as dezenas de milhares de seqüências de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) obtidas no âmbito do projeto *Genolyptus* (Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de *Eucalyptus*) figuram diversos fragmentos identificados como genes bHLH. A identificação de polimorfismo em genes é estratégica para o desenvolvimento de futuros trabalhos de mapeamento por associação. Em última análise, estes estudos poderão avaliar o efeito deste polimorfismo sobre a variabilidade fenótipica.

O presente trabalho busca o estabelecimento de marcadores moleculares que permitam a avaliação genotípica diretamente dos genes responsáveis pelo controle genético de características fenótipicas em *Eucalyptus*. Tal iniciativa se justifica na medida em que o polimorfismo presente nestes locos possa ser utilizado em programas de melhoramento genético visando à obtenção de genótipos superiores de elevado valor econômico.

OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido com os objetivos de anotar genes da família de fatores de transcrição bHLH de *Eucalyptus*; detectar SNPs presentes em seqüências de genes da família de fatores de transcrição bHLH obtidas de diferentes genótipos de *Eucalyptus*; desenvolver *primers* que amplifiquem especificamente estas regiões e que possam permitir o uso

destes polimorfismos como marcadores moleculares em estudos de mapeamento genético e de desequilíbrio de ligação.

METODOLOGIA

Primeiramente, a árvore filogenética dos genes da família de fator de transcrição bHLH, obtida por HEIM *et al.* (2003), de *Arabidopsis thaliana* foi reconstruída. As seqüências dos genes bHLH identificadas pela literatura foram obtidas do banco de dados GenBank, através do site do NCBI, no formato FASTA, o qual permite a leitura dos dados pelo software ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997). Em seguida cada uma das 133 seqüências foi utilizada para identificar no banco de dados ESTs do projeto Genolyptus seqüências que apresentassem similaridade com esses genes. O programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) foi utilizado para essa identificação. Essa ferramenta se baseia em uma medida denominada valor-E. Essa medida mensura a quantidade de alinhamentos entre as seqüências do banco de dados e a de referência que podem ser encontrados com uma pontuação maior ou igual à pontuação observada para uma determinada seqüência presente no banco, por acaso. Desse modo, um valor-E alto (>1) indica resultados que são comumente obtidos por simples acaso e não são, portanto estatisticamente significativos. Para o presente trabalho, foi utilizado um valor-E de 10^{-10}, sendo que todos os ESTs que possuíam valor inferior a esse foram anotados, sendo identificadas 817 reads de genes bHLH de *Eucalyptus* spp. A presença de regiões conservadas entre os genes fez com que muitos ESTs anotados tenham se relacionado a mais de um gene ao mesmo tempo sendo que seqüências repetidas foram desprezadas de forma que apenas uma cópia de cada clone repetido foi mantida, resultando em 108 seqüências. Com o software ClustalX, as seqüências de referencias (HEIM *et al.*, 2003) e seqüências obtidas do banco de dados do Projeto Genolyptus foram alinhadas utilizando-se as configurações padrão do programa. A árvore filogenética foi obtida através do algoritmo Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987) e visualizada através do programa TreeView (PAGE, 1996). De acordo com os grupos formados e as seqüências de referencia de *Arabidopsis thaliana* foi inferido a característica dos ESTs de bHLH de *Eucalyptus*.

Foram obtidos do banco de dados do projeto Genolyptus os eletroferogramas dos 108 *reads* de genes bHLH de *Eucalyptus* spp. Cada um dos eletroferogramas foi submetido à análise de *base-calling* pelo programa *phred* (EWING *et al.*, 1998). Os arquivos contendo as seqüências e suas respectivas medidas de qualidade foram analisados no programa *pregap4* presente no *Staden Package* (STADEN *et al.*, 2000). Foram retiradas as seqüências correspondentes aos vetores de clonagem e construídos os *clusters*, alinhamentos de seqüências com alta similaridade, agrupadas e representadas por uma única seqüência consenso (também representada pelo *contig*). A leitura dos eletroferogramas sob as condições citadas acima gerou um banco de dados, com arquivos ZTR, EXP (*experiment files*) e SCF (relativos aos eletroferogramas) para cada clone, para a interpretação dos resultados obtidos no *software gap4*, também constituinte do *Staden Package*.

Analisando o banco de dados com o programa *gap4*, através da ferramenta *View* > *Find Internal Joins* presente no *software*, foi possível verificar e corrigir possíveis erros no alinhamento das seqüências, retirando ESTs mal relacionados a um *cluster* e adicionando em outro, ou mesmo fundindo dois *clusters* formados por seqüências muito similares (mínimo de 10% de similaridade). Em seguida, a ferramenta *View* > *SNP Candidates* foi utilizada para detectar os SNPs dentro de cada um dos *contigs* referentes a um ou mais genes.

A anotação de cada *contig* que contêm SNP foi feita a partir da obtenção da seqüência consenso do *contig* com o programa *gap4* e alinhamento do mesmo com a seqüência de referencia da sua subfamília já especificada.

Com a localização do SNPs nos *reads* de *Eucalyptus* foi utilizado a seqüência consenso de cada *contig* em formato fasta para desenhar os *primers* com o *software* Primer3Plus (UNTERGASSER *et al.*, 2007) para a amplificação dos fragmentos que contem os SNPs.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As subfamílias de bHLH de *Eucalyptus* que apresentaram resultados relevantes para o trabalho foram: subfamílias IA, IIIA, IIIB, IIIC, IIID, IIIE, IIIF,

IVA, IVB, IVC, VB e X. Sendo os resultados relevantes a formação de *contigs* e presença de SNPs nos *contigs*. As outras subfamílias: subfamília IB, II, IVD, VI, VIIB, VIIIA, VIIIB, VIIIC e IX não obtiveram números de eletroferogramas suficientes para comparação e as subfamílias: VA, VIIA, XI e XII obtiveram números de eletroferogramas comparáveis e apresentaram *contigs*, porém não apresentaram SNPs em seus *contigs*.

Dado a importância da busca de SNPs em genes do fatores de transcrição bHLH em *Eucalyptus*, a Tabela 1 mostra as subfamílias que contem SNPs, sendo os resultados obtidos pelas análises do programa *Staden Package.*

Tabela 1 – Subfamílias de bHLH com SNPs.

	Subfamília	Número de *reads*	N° de *contigs*	*Contig** com SNPs	N° de SNPs
	1A	23	6	Contig 2	6
	3A	10	5	Contig 1	2
	3B	14	7	Contig 4	2
	3C	17	9	Contig 1	2
	3D	16	8	Contig 1	2
	3E	20	9	Contig 1	2
				Contig 4	2
	3F	14	10	Contig 1	2
	4A	5	2	Contig 1	2
	4B	17	9	Contig 1	5
	4C	24	8	Contig 1	3
				Contig 5	5
	5B	13	5	Contig 2	3
	10	11	6	Contig 2	2
TOTAL	12 subfamílias	184 *contigs*	84 *contigs*	14 *contigs*	40 SNPs

Os *contigs* de *Eucalyptus* formados durante as análises contêm diversos *reads* que são relacionados com os genes de *A. thaliana.* Os genes de *A. thaliana* caracterizam os *contigs* de *Eucalyptus*.

A anotação dos *contigs* de *Eucalyptus* mostra que alguns desses *contigs* são bem caracterizados pela análise de *bootstrap* do *ClustalX* com genes de bHLH de *Arabidopsis thaliana*, como o *contig* 2 da subfamília IA se relaciona com o gene AtbHLH097. Outros *contigs* se relacionam com mais de um gene, como o *contig 4* da subfamília IIIE e os genes AtbHLH004 e AtbHLH005. A anotação de alguns *contigs* de *Eucalyptus* não foi realizada devido a necessidade de edição nos *reads.*

Tabela 2 – *Contigs* com SNPs relacionados a genes de fatores de transcrição bHLH de *A. thaliana.*

Subfamílias	*Contigs* com SNPs	Gene de *A. thaliana* relacionado	Acesso* do gene
1A	Contig 2	AtbHLH097	AF488624
3A	Contig 1	AtbHLH029	AF488570
3B	Contig 4	AtbHLH061/AtbHLH093	AF488594/AF488621
3C	Contig 1	AtbHLH090	AF488620
3D	Contig 1	AtbHLH014	AJ519812
3E	Contig 1	AtbHLH028/AtbHLH006	AF252636/X99548
	Contig 4	AtbHLH004/AtbHLH005	AF251689/AF251690
3F	Contig 1	Não consta[1]	Não consta
4A	Contig 1	Não consta[1]	Não consta
4B	Contig 1	Não consta[1]	Não consta
4C	Contig 1	Não consta[1]	Não consta
	Contig 5	Não consta[1]	Não consta
5B	Contig 2	AtbHLH051	AF488586
10	Contig 2	AtbHLH068	AF488634

*Acesso do genes é o nome do gene no site do NCBI.

1 Não consta – *Contig* com analise de *bootstrap* fraca em relação a outro gene de referencia.

Os *reads* de *Eucalyptus* que contêm SNPs foram priorizados para caracterização dos mesmos e desenho de *primers* para desenvolver marcadores moleculares específicos para os SNPs de fator de transcrição de bHLH em *Eucalyptus.* A relação dos SNPs encontrados e os *reads* que apresentaram as mutações estão na Tabela 3.

Tabela 3 – *Reads* com SNPs em cada *Contig*.

Subfamília	*Contigs* com SNPs	N° de SNPs por *contig*	*Reads* com SNPs
1A	Contig 2	6	EUGR-XY-006-089-E12-RS.R
	-*	-	EUGR-XY-006-089-E12-RS.R
	-	-	EUGL-XY-001-102-E07-AF.R
	-	-	EUPE-XY-003-002-H11-CN.R
	-	-	EUSP-FX-002-016-C08-CN.R
	-	-	EUSP-FX-002-016-C08-CN.R
3A	Contig 1	2	EUGL-XY-002-031-D01-CN.R
	-	-	EUPE-XY-003-003-B06-CN.R
3B	Contig 4	2	EUPE-XY-003-003-B06-CN.R
	-	-	EUGR-TS-002-019-C09-CN.R
3C	Contig 1	2	EUPE-XY-003-003-B06-CN.R
	-	-	EUGL-XY-002-031-D01-CN.R
3D	Contig 1	2	EUGL-XY-002-031-D01-CN.R
	-	-	EUPE-XY-003-003-B06-CN.R
3E	Contig 1	2	EUGL-XY-002-031-D01-CN.R
	-	-	EUPE-XY-003-003-B06-CN.R
	Contig 4	2	EUGR-SE-001-083-D12-GO.R
	-	-	EUGR-SE-001-107-G07-GO.R
3F	Contig 1	2	EUGL-XY-002-031-D01-CN.R

	-	-	EUPE-XY-003-003-B06-CN.R
4A	Contig 1	2	EUGL-XY-002-031-D01-CN.R
	-	-	EUPE-XY-003-003-B06-CN.R
4B	Contig 1	5	EUUR-XY-000-042-G09-BA.R
	-	-	EUGR-ML-001-002-F12-BA.R
	-	-	EUUR-XY-000-042-G09-BA.R
	-	-	EUGR-ML-001-002-F12-BA.R
	-	-	EUSP-FX-001-042-C04-BA.R
4C	Contig 1	3	EUPE-XY-004-013-D08-RS.R
	-	-	EUGR-ML-001-002-F12-BA.R
	-	-	EUSP-FX-001-042-C04-BA.R
	Contig 5	5	EUGR-XY-006-020-F06-RS.R
	-	-	EUGR-XY-006-020-F06-RS.R
	-	-	EUGR-XY-006-020-F06-RS.R
	-	-	EUGR-XY-006-020-F06-RS.R
	-	-	EUGR-XY-006-020-F06-RS.R
5B	Contig 2	3	EUSP-RX-001-001-F04-GO.R
	-	-	EUSP-RX-001-001-F04-GO.R
	-	-	EUSP-RX-001-001-F04-GO.R
10	Contig 2	2	EUUR-XY-001-002-C08-BA.R
	-	-	EUGR-PU-000-003-C04-MG.R

*Igual o quadrante acima.

Foram desenhados *primers* para amplificar as regiões que contêm os SNPs em cada *contig.* Em um total de 17 pares de *primers,* para 14 *contigs* diferentes em 12 subfamílias de bHLH de *Eucalyptus*. Sendo que os *primers* desenhados conseguem amplificar todas as regiões que contêm os 40 SNPs encontrados.

Tabela 4 – N° de *primers* desenhados para cada *contigs* de *Eucalyptus.*

Subfamílias	***Contigs* com SNPs**	**N° de SNPs por *contig***	**N° de pares de *primers***
1A	Contig 2	6	2
3A	Contig 1	2	1
3B	Contig 4	2	1
3C	Contig 1	2	1
3D	Contig 1	2	1
3E	Contig 1	2	1
	Contig 4	2	1
3F	Contig 1	2	1
4A	Contig 1	2	1
4B	Contig 1	5	2
4C	Contig 1	3	2
	Contig 5	5	1
5B	Contig 2	3	1
10	Contig 2	2	1
TOTAL	14 *contigs* com SNPs	40 SNPs	17 pares de *primers*

A Tabela 5 apresenta as seqüências dos *primers* de cada *contig* no sentido 5' a 3', com os fragmentos *forward* e *reverse*. De acordo com as análises do *software* Primer3Plus a temperatura média de anelamento dos *primers* na seqüência de nucleotídeo é de 58,9 °C.

Tabela 5 – *Primers* desenhados para amplificação dos fragmentos dos *contigs* que contem SNPs.

Subfamílias	*Contigs* com SNPs	*Primers*	Seqüência (5' –> 3')	Tm de anelamento (°C)*
1A	Contig 2	EUIAcontig2.1	Primer_F[1] aggaggaggaggggaggggg	59,9
			Primer_R[2] gttgttccactcgccgcaagg	58,9
		EUIAcontig2.2	Primer_F ctagctcgccatccccgtcg	59.1
			Primer_R acggtcagcctcaacgagtgc	59.4
3A	Contig 1	EUIIIAcontig1	Primer_F actcaccgtcacaactgtgtcatc	57,2
			Primer_R ccacgtaaaagaggaaggaagcctgc	59,8
3B	Contig 4	EUIIIBcontig4	Primer_F ccacgtaaaagaggaaggaagcctgc	59,8
			Primer_R actcaccgtcacaactgtgtcatc	57,2
3C	Contig 1	EUIIICcontig1	Primer_F aaccacgtaaaagaggaaggaa	59,2
			Primer_R caccgtcacaactgtgtcatc	60,1
3D	Contig 1	EUIIIDcontig1	Primer_F ccgtcacaactgtgtcatca	59,1
			Primer_R aaccacgtaaaagaggaaggaa	59,2
3E	Contig 1	EUIIIEcontig1	Primer_F actcaccgtcacaactgtgtcatca	58,4
			Primer_R ccacgtaaaagaggaaggaagcctgc	59,8
	Contig 4	EUIIIEcontig4	Primer_F gccccttcttccccgtccct	59,9
			Primer_R gcgcgacctttgatccgcct	60,1
3F	Contig 1	EUIIIFcontig1	Primer_F actcaccgtcacaactgtgtcatc	57,2
			Primer_R ccacgtaaaagaggaaggaagcctgc	59,8
4A	Contig 1	EUIVAcontig1	Primer_F actcaccgtcacaactgtgtcatc	57,2
			Primer_R ccacgtaaaagaggaaggaagcctgc	59,8
4B	Contig 1	EUIVBcontig1.1	Primer_F actccaacgaaaaagcagtcagtagac	57,5
			Primer_R ggccaagccccggaaacaa	59,8
		EUIVBcontig1.2	Primer_F caccacgcaactgggtcacca	59,5
			Primer_R tcgccggagcaggcgaattg	60,1
4C	Contig 1	EUIVCcontig1.1	Primer_F caccacgcaactgggtcacca	59,5
			Primer_R tcgccggagcaggcgaattg	60,1
		EUIVCcontig1.2	Primer_F agcagtcagtagacttccagaaaaagc	57,2
			Primer_R gcagtgcttctagttccaaggca	57,3
	Contig 5	EUIVCcontig5	Primer_F tccttcactccatctgactcccca	58,3
			Primer_R tctctcgagcggcctgcgaa	60,3
5B	Contig 2	EUVBcontig2	Primer_F ccctggttgatccccatcgga	57,6
			Primer_R cggaggcctttcgcttcaggt	59,1
10	Contig 2	EUXcontig2	Primer_F acgcccgagcataagacagca	58,6
			Primer_R agctgactactgggctcctgc	58,0
TOTAL	14 *contigs* com SNPs	17 pares de *primers*		

*Tm – Temperatura média para o anelamento do primer com o fragmento a ser amplificado.

1 – *Primer* de sentido *Foward*.

2 – *Primer* de sentido *Reverse*.

Tabela 6 – P*rimers* com o n° de SNPs no fragmento a ser amplificado

Subfamílias	*Contigs* com SNPs	N° de pares de *primers*	Nome do *Primers*	N° de SNPs no fragmento amplificado
1A	Contig 2	2	EUIAcontig2.1	4
			EUIAcontig2.2	2
3A	Contig 1	1	EUIIIAcontig1	2
3B	Contig 4	1	EUIIIBcontig4	2
3C	Contig 1	1	EUIIICcontig1	2
3D	Contig 1	1	EUIIIDcontig1	2
3E	Contig 1	1	EUIIIEcontig1	2
	Contig 4	1	EUIIIEcontig4	2
3F	Contig 1	1	EUIIIFcontig1	2
4A	Contig 1	1	EUIVAcontig1	2
4B	Contig 1	2	EUIVBcontig1.1	3
			EUIVBcontig1.2	2
4C	Contig 1	2	EUIVCcontig1.1	1
			EUIVCcontig1.2	2
	Contig 5	1	EUIVCcontig5	5
5B	Contig 2	1	EUVBcontig2	3
10	Contig 2	1	EUXcontig2	2
TOTAL	14 *contigs* com SNPs	17 pares de *primers*		40 SNPs

Os 17 pares de *primers* desenhados possuem uma média de 2 SNPs por fragmento a ser amplificado, sendo o tamanho do fragmento varia de 214 a 597 pb com média de 304 pb.

Tabela 7 – Tamanho dos fragmentos amplificados e n° de SNPs em cada *primers.*

Nome do *Primers*	N° de SNPs no fragmento amplificado	Tamanho do fragmento (pares de base - pb)
EUIAcontig2.1	4	247
EUIAcontig2.2	2	221
EUIIIAcontig1	2	300
EUIIIBcontig4	2	300
EUIIICcontig1	2	299
EUIIIDcontig1	2	297
EUIIIEcontig1	2	300
EUIIIEcontig4	2	214
EUIIIFcontig1	2	300
EUIVAcontig1	2	300
EUIVBcontig1.1	3	245
EUIVBcontig1.2	2	388
EUIVCcontig1.1	1	388
EUIVCcontig1.2	2	597
EUIVCcontig5	5	288
EUVBcontig2	3	244
EUXcontig2	2	234
	40 SNPs no total	Média = 304 pb

A ferramenta *View* > *SNP Candidates* do *software gap4* constituinte do *Staden Package* é de grande relevância na procura de SNPs nos eletroferogramas de *Eucalyptus*, porém a qualidade dos eletroferogramas devem ser considerados de acordo com as análises de *base-calling* do *software Phred.* A inspeção visual é necessária para evitar possíveis erros de leitura das seqüências.

A localização dos SNPs pode sugerir alterações significativas nas seqüências de aminoácidos de determinadas proteínas, interferindo diretamente em sua função no organismo. A localização do SNP no gene e o tipo da mutação é necessária para estar relacionando genótipos com suas características fenótipicas. A caracterização dos SNPs poderá ser utilizada em estudos posteriores.

A detecção dos SNPs em fatores de transcrição bHLH de *Eucalyptus* se constitui um passo inicial para estudos voltados para a construção de mapas genéticos desse fator de transcrição. Os *primers* desenhados ajudarão na construção desses mapas. Os polimorfismos encontrados podem ser utilizados em estudos de desequilíbrio de ligação entre esses genes de bHLH e também em associações entre as mutações gênicas e características fenótipicas de *Eucalyptus.*

CONCLUSÃO

Foram relacionados *reads* não anotados de *Eucalyptus* com genes do fator de transcrição bHLH de *Arabidopsis thaliana*, que são responsáveis por diversas características nas plantas, sendo caracterizado os *reads* não anotados de *Eucalyptus*.

Detectou-se 40 SNPs dentro dos *reads* de *Eucalyptus* e desenhados 17 pares de *primers* que poderão identificar esses polimorfismos. Os *primers* desenvolvidos poderão ser utilizados em estudos posteriores para a construção de mapas genéticos e estudos de desequilíbrio de ligação, sendo importantes para o melhoramento da produtividade do eucalipto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL S. F.; GISH, W.; MILLER, W. MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 215, p. 403- 410, out. 1990.

ATCHLEY, W. R., FITCH, W. M. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA 94:5172–5176, 1997.

ATCHLEY, W. R., W. TERHALLE, and A. DRESS. Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain. **Journal of Molecular Evolution**, 48:501 16, 1999.

BROOKES, A. J. The Essence of SNPs. **Gene**, Amsterdam, n. 234, p. 177-186, jul. 1999.

CRAIG D.W. & STEPHAN D.A. Applications of whole-genome high-density SNP genotyping. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, Londres, n. 5, p.159-170, mar. 2005.

DANG, C.V., DOLDE, C., GILLISON, M.L., and KATO, G.J. (1992). Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic helix-loop-helix proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA 89**,** 599–602

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C. & GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p.175-185. 1998.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C. & GELBART, W. M. **Introdução à genética**. 6º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 794p.

HEIM, M.A., JAKOBY, M., WERBER, M., MARTIN, C., WEISSHAAR, B., AND BAILEY, P.C. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. **Molecular Biology Evolution,** 20,735–747.

MURRE, C., G. BAIN, M. A. VAN DIJK, I. ENGEL, B. A. FURNARI, M. E. MASSARI, J. R. MATTHEWS, M. W. QUONG, R. R. RIVERA, and M. H. STUIVER. 1994. Structure and function of helix–loop–helix proteins. **Biochimica et Biophysica Acta,** 1218:129–135.

MURRE, C., P. S. MCCAW, and D. BALTIMORE. 1989. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. **Cell,** 56:777–783.

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3° ed. São Paulo: Sarvier, 1992. 839p.

PAGE, R. D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, Oxford, v. 12, n.4, p. 357-358, ago. 1996.

SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructin phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, p. 405-425, jul. 1987.

SOBRINO, B.; BRIÓN, M.; CARRACEDO, A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing technologies. **Forensic Science International,** Clifton, n.154, p.181-194, jan. 2005.

STADEN, R.; BEAL, K. F. & BONFIELD, J. K. The staden package. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 132, p. 115-130, fev. 1998.

STEVE ROZEN AND HELEN J. SKALETSKY (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds)

Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386.

SWANSON HI, CHAN WK, BRADFIELD CA (1995) DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT and SIM proteins. **Journal of Biological Chemistry,** 270:26292–26302.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. & HIGGING, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleid Acid Researchs**, Oxford, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, dez. 1997.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.;. LEUNISSEN, J.: **Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3** Nucleic Acids Research 2007 35: W71-W74.

VORONOVA, A. and BALTIMORE, D. (1990) **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 87, 4722-4726.

Formação do Psicólogo: a produção em artigos publicados em periódicos especializados no campo da Psicologia e Educação.

Eloy San Carlo Maximo Sampaio, Anita Cristina Azevedo Resende.
Faculdade de Educação/UFG
e-mail: eloysancarlo@yahoo.com.br; **anita.resende@pq.cnpq.br**

Palavras-chave: Cultura, Razão, Formação.

Questionar acerca dos limites e possibilidades da proposta hegemônica de "formação" desenvolvida no contexto da sociedade capitalista, implica uma ação ético-política de enfrentamento e recusa ao avanço da barbárie em todas as suas formas e especialmente na crescente radicalização da irracionalidade. Os espaços e projetos formativos que se atualizam contemporaneamente são predominantemente pautados na racionalidade instrumental, que se estabelece com a reprodutibilidade do existente e com a impossibilidade da emancipação humana (Maar, 2003), se constituindo então não como formação, mas sim como *semiformação* (*Halbbildung)*.

Indagar acerca do que é "formação" exige ampliar investigação e buscar a apreensão de mediações mais amplas e determinantes como: cultura, razão, subjetividade e objetividade. Nessa perspectiva é possível encontrar importantes contribuições na obra de um grupo de pensadores que desenvolveram as suas pesquisas principalmente a partir da Primeira Guerra mundial e integraram a denominada Escola de Frankfurt. No conjunto das contribuições dos diferentes autores é possível destacar Theodor Adorno e Max Horkheimer como fundamentais para o desenvolvimento da Teoria Crítica da sociedade.

Enquanto síntese da realidade, o conceito de cultura é basilar para a Teoria Crítica. A cultura é construída na e pela sociedade. As suas determinações são encontradas justamente no contexto no qual ela se desenvolve, expressando, portanto, todas as tensões e contradições sociais. Ao analisar mais detidamente esse conceito é possível identificar dois aspectos que, segundo Adorno constitui a cultura: "a cultura possui ela própria um caráter duplo: como cultura de espírito, de um lado; como dominação conformista da natureza de outro" (ADORNO apud MAAR, 2003, p.59).

Nesse sentido é que se pode afirmar que,

> portanto, uma cultura que se apresenta, na forma da contraposição entre o real e o conceito, os elementos críticos em relação ao vigente; e, por outro uma cultura da adequação ao existente. A primeira dimensão poderia ser denominada humanista-ideal, a segunda, expressiva (MAAR, 2003, p.59).

É a partir da dimensão humanista-ideal que se pode estabelecer um distanciamento da realidade imediata e executar um movimento reflexivo sobre a mesma. É nesta perspectiva que a ação da razão pode ser assumida em toda a sua radicalidade. Cenário diferente é notado na chamada cultura expressiva, uma vez que ela não pressupõe a crítica, mas sim a exclusiva adaptação ao existente. Nesse processo, a sociedade é tomada como sendo algo natural a ser indefinidamente reproduzido. A conformação social é tornada legítima, convertendo-se em um ideal a ser preservado. É esse cenário que permite a afirmação que "a organização do mundo ela própria converteu-se em sua própria ideologia" (ADORNO, 1995, p. 143).

Atualmente é a segunda possibilidade, a dimensão expressiva, que se apresenta como hegemônica e atua, inclusive, na conformação da subjetividade dos indivíduos. Duarte (2003) aponta que os mecanismos que trabalham a favor da reprodutibilidade social não são acidentais, mas sim dotados de forma intencional, sendo criados inclusive aparatos sofisticados para garantir que a perenização do existente ocorra. Esse processo é possível de ser observado, por exemplo, na ação daquilo que Adorno definiu como sendo Indústria Cultural.

A busca da continuidade e reprodutibilidade desta sociedade tal qual ela se apresenta passa pela afirmação da sujeição, da adaptação, da recusa da reflexão e crítica e da redução da capacidade de pensamento à apenas ao que é útil e necessário para a execução laboral. O conjunto desse processo pode ser compreendido pelo que se denomina racionalidade instrumental. Ao mesmo tempo, todos estes fatores constituem as bases da *semiformação* (*Halbbildung*). Maar, a partir de Adorno, propõe que a "semiformação seria a forma social da subjetividade determinada nos termos do capital. É meio para o capital, e simultaneamente, como expressão de uma contradição, sujeito gerador e transformador do capital"(2003, p.467).

A semiformação, ao passo que não é comprometida com o esclarecimento, mas sim com a continuidade do sistema e racionalidade econômicos, não comporta

dimensão que permita a compreensão dos elementos constituidores da realidade. É a partir da semiformação que as *experiências formativas*, isto é, o "processo básico de constituição dos sujeitos sociais no processo de interação dos homens entre si e com a natureza, como produção da consciência em sociedade" (MAAR, 1996, p.64), são abandonadas em nome das *experiências substitutivas*, que podem ser entendidas como a recusa da real experimentação da sociedade, interpondo uma dimensão obscurecedora entre o homem e sua realidade. A preponderância da experiência substitutiva é um dos elementos que apontam para o fato de que a semiformação estabelece uma íntima relação com o irracionalismo.

Adorno estabelece dois estudos fundamentais que expõem tal vinculação. O primeiro deles, intitulado "As estrelas descem à terra" (2007), investiga a irracionalidade a partir da consideração de alguns produtos oferecidos para a massa, em especial a astrologia. A opacidade da realidade não permite que o homem se reconheça nos elementos que constituem a sua vida real, acarretando que esta seja percebida como algo insípido que não promove qualquer realização efetiva. Ao invés de promover um questionamento sobre o motivo pelo qual a organização social resultou em uma deteriorização geral da vida humana, o que seria consoante com a crítica racional, os indivíduos optam por se alinhar a propostas de explicação místicas, irracionais e ilusórias. Neste sentido o autor esclarece que

> Até mesmo a mente supostamente "normal" está preparada para aceitar sistemas de ilusões, pela simples razão que é difícil demais distinguir tais sistemas, daquele outro igualmente inexorável e opaco, sob o qual têm de viver suas vidas. Isso é muito bem refletido pela astrologia assim como pelos dois tipos de Estado totalitários que também afirmam ter uma chave para tudo, conhecer todas as respostas e reduzir o que é complexo a inferências simples e mecânicas, afastando tudo que é estranho e desconhecido, sendo, ao mesmo tempo incapazes de explicar qualquer coisa. (ADORNO, 2008, p.177)

Tais aceitações ou adesões tomadas como experiências substitutivas, por um lado, aplacam a necessidade de se encontrar explicações para a corrosão geral da possibilidade de felicidade para o homem e, por outro, não contribuem em nada para a superação do obscurecimento na realidade, atuando sim para o ocultamento e o refeorçamento de práticas irracionais.

Um segundo estudo fundamental que expõe a tensão existente entre semiformação, experiências substitutivas e irracionalismo, foi produzido após a dramática ascensão do nazismo, que culminou com a perseguição e morte de milhões de judeus. A investigação que compõe o livro "A personalidade autoritária" visa compreender os determinantes subjetivos que atuam na adesão à determinadas ideologias, conferindo especial atenção aos fatores mobilizados para a aceitação do fascismo. Segundo Adorno e colaboradores (1965) os sujeitos que de fato aderem a ideologias autoritárias norteiam o seu contato com a realidade a partir da estereotipia, do preconceito, da dicotomização imediata entre bem e mal, o que, no limite, pode ser compreendido como uma recusa à verdadeira experienciação daquilo que se apresenta. Nota-se aqui, mais uma vez, a troca da *experiência formativa*, que pode ser entendida neste caso como uma real aproximação com o outro, pela *experiência substitutiva*, que é expressa por uma recusa apriorísitica do contato com a realidade, por meio de padrões e fórmulas ditados anteriormente, que são basicamente irracionais.

Neste movimento fica claro que a semiformação serve ao processo de reprodução do capital, prima pela sua vinculação com as experiências substitutivas e é marcadamente irracional. É este fator que obstacula o exercício racional, impossibilitando uma reflexão sobre a realidade e imputando ao homem um eterno estado de menoridade. Esta série de características tem implicações profundas; e a vinculação com a barbárie é certamente uma das mais graves.

Adorno (1995) define barbárie como sendo a condição na qual

> Estando a civilização do mais alto desenvolvimento tecnológico, as pessoas se encontrem atrasadas de um modo peculiarmente disforme em relação a sua própria civilização – e não apenas por não terem em sua arrasadora maioria experimentado a formação nos termos correspondentes ao conceito de civilização, mas também por se encontrarem tomadas por uma agressividade primitiva, um ódio primitivo ou, na terminologia culta, um impulso de destruição que contribui para aumentar ainda mais o perigo de que toda esta civilização venha a explodir, aliás uma tendência imanente que caracteriza (ADORNO, 1995, p.155)

Auschwitz pode ser tomado como emblema, como um exemplo dramático da materilização da barbárie, não se constituindo como uma promessa ou ameaça, mas

como efetiva execução da barbárie. Do mesmo modo pode-se concluir que o campo de concentração de Auschwitz não pertence a um passado já superado, mas sim a uma possibilidade que se atualiza de diversas formas nesta sociedade presente. Tomando o fato de que a barbárie está presente como possibilidade na civilização moderna e avança com as mais diversas roupagens, é necessário o estabelecimento de pontos de resistências, dos quais o esclarecimento é o mais importante.É a reflexão que provém do exercício da razão que abre alguma possibilidade para que a barbárie seja contraposta.

É neste sentido que a formação se apresenta como uma urgência pois intensiona claramente que Auschwitz não se repita. É um processo de subjetivação da cultura, mas simultaneamente de estranhamento e crítica a esta mesma cultura.

> Emancipação significa o mesmo que conscientização, racionalidade (...)A educação seria impotente se ignorasse a adaptação e não preparasse os homens para se orientarem no mundo. Porém seria questionável igualmente se ficasse nisto, produzindo nada além de *well adjusted people,* em conseqüência do que a situação existente se impõe no que tem de pior (Adorno, 1995, p. 143).

Considerando-se que atualmente vivemos em uma cultura em crise, que investe primordialmente no irracionalismo e na reprodutibilidade do existente, pode-se compreender então que materialização da formação se dá, necessariamente, pela crítica à semiformação. O exercício racional, expresso na reflexão sobre a realidade, implica a busca da compreensão dos mecanismos que impossibilitam a realização humana, que atuam para a progressiva desumanização da sociedade. E dentre destes mecanismos a semiformação é um dos pontos mais importantes e o seu entendimento esclarece vários prismas da atual organização social.

Objetivo

Tendo em vista este complexo cenário a presente pesquisa objetiva a investigação da formação, tomando, para tanto, a formação do psicólogo como um emblema fértil de tal processo. Inscrito na pesquisa que investiga as derivações da relação razão e des-razão na formação do psicólogo, o presente plano de trabalho objetivou realizar o mapeamento da produção, acerca da temática da formação do

psicólogo e expressa em artigos publicados em periódicos científicos, da área de psicologia.

Metodologia

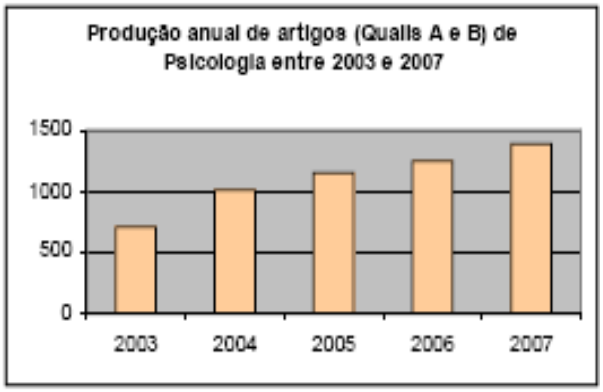
Partindo do estabelecimento do conceito de formação, levando em conta todo o complexo cenário relacionado ao tema e tomando a formação do psicólogo como emblema de processos sociais mais amplos Investigou-se os artigos publicados nos últimos 5 anos em periódicos com a qualificação QUALIS “A” e “B”, disponíveis no site da Capes (www.capes.gov.br)

Os procedimentos iniciais objetivaram mapear a produção e foi realizada um levantamento que possibilitou listar 67 periódicos que correspondiam aos critérios definidos Devido à intensa reposição de material na internet, foram tomados como base do processo investigativo os exemplares que constavam no mês de agosto de 2008. A partir desta definição foi iniciado o mapeamento e a catalogação do material.

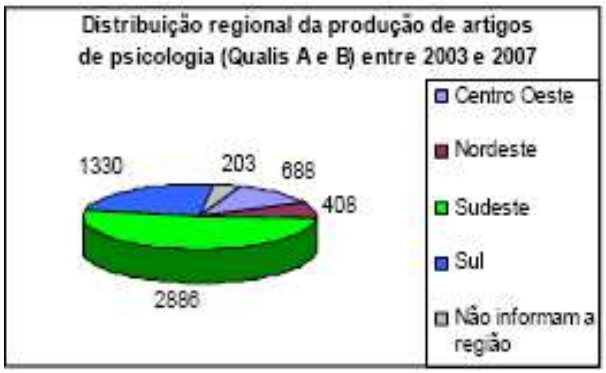
Todos os resumos publicados nos periódicos selecionados entre os anos 1003-2008 foram selecionados e utilizados para a criação de um banco de dado. Este banco de dados contempla as 67 revistas, tomando a produção anual de cada uma destas. Ao final contabilizou-se 5515 resumos, que foram organizados por periódico, volume e ano de publicação.

Esse mapeamento, catalogação e organização no banco de dados possibilitaram o apontamento de algumas tendências gerais que se evidenciam no material coletado relativas ao quantitativo da produção anual na área e também à localização geográfica da produção.

Referente a produção anual nota-se um desenvolvimento cumulativo e crescente, como pode ser verificado no gráfico seguinte:

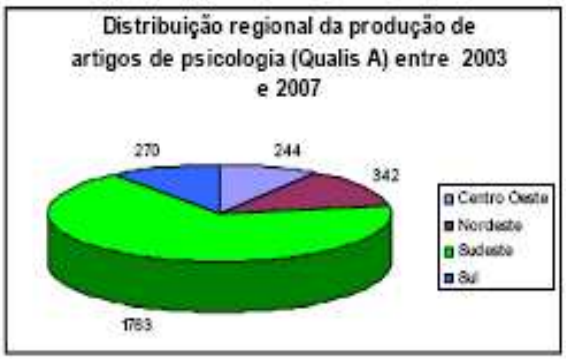


Tomando a localização geográfica dessa produção e a parcela que cada região ocupa no panorama geral de produção de artigos listados pela CAPES, nota-se que ocorre uma distribuição desigual, centralizada prioritariamente nas regiões Sudeste e Sul.



Diante desse quantitativo de artigos optou-se por trabalhar com os periódicos listados pela CAPES com a qualificação QUALIS “A”. Esta opção metodológica se deve ao fato de que esses os periódicos que apresentam uma maior inserção no cenário científico brasileiro. Nesta etapa o número de periódicos foi reduzido de 67 para 28. Tal procedimento também resultou em um decréscimo do número de resumos de artigos, que inicialmente era de 5515 e ao final desta etapa consistia em 2619 resumos.

Trabalhando a partir do banco de dados, foi possível mapear a distribuição destes 2619 resumos nas regiões brasileiras. Tal cenário pode ser visualizado do gráfico abaixo:



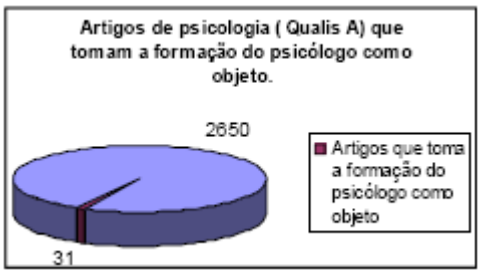
A procedimento que se seguiu consistiu na busca de palavras chave nestes 2619 resumos. Dois descritores foram selecionados como sendo centrais para a apreensão das discussões sobre a formação, sendo que eles consistiam em “formação” e “curso de psicologia”. Foram selecionados todos os resumos que continham ao menos um destes descritores, o que resultou a seleção de 188 resumos.

A partir desse procedimento, foi realizada uma leitura do material selecionado, com o objetivo de localizar os artigos que abordavam a temática da formação nos cursos de graduação de psicologia. Este procedimento foi necessário devido ao fato de que alguns dos 188 resumos selecionados a partir da busca por palavras chave, por vezes contavam com os descritores adotados, porém não estabeleciam a discussão sobre a formação como um dos seus objetivos.

Nesta etapa foram escolhidos todos os textos que tomavam a formação em psicologia como objeto de discussão. Entre os 188 resumos, 31 atendiam a tais critérios e compuseram o material a ser submetido a uma análise detalhada. Os gráficos a seguir demonstram a distribuição destes 31 resumos por região e a sua representatividade em relação aos artigos com a avaliação QUALIS “A” .



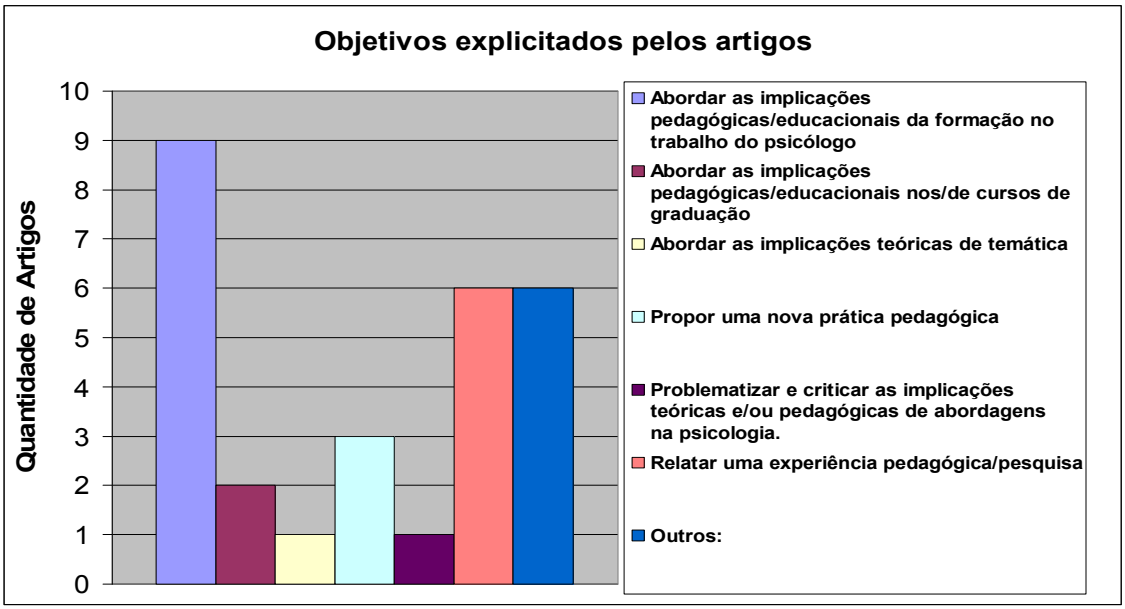
A análise acerca da representatividade dos artigos que abordam a formação em psicologia, diante do total de artigos publicados em periódicos com a avaliação QUALIS "A" permite observar que:



Para a análise destes 31 artigos foi elaborada uma planilha que contemplava a) identificação do artigo, b) objetivo, c) procedimento metodológico adotado, d) enfoque disciplinar predominante, e) enfoque teórico, f) autores de base, g) autores mais citados, h) o conceito de formação, i) a vinculação ou não deste conceito com a profissionalização, j) especificidade da formação do psicólogo, l) concepção de curso de psicologia e m) concepção de mercado de trabalho. Em todos estes pontos ocorreu uma atenção especial aos dados explicitados pelo próprio artigo, sempre buscando trechos do artigo que pudessem ser convertidos em citações dentro da planilha.

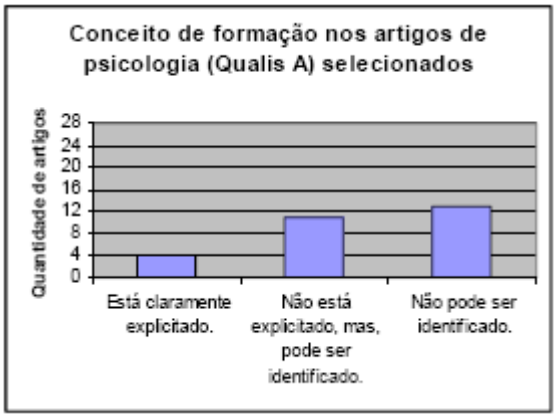
Nesta etapa foi observado que um dos periódicos, "Psicologia, Ciência e Profissão", possuía duas entradas na lista disponibilizada pela CAPES. Tal condição acarretou a repetição de três artigos o que implicou a redução do quantitativo de 31 artigos para 28..

Dentre estes 28 artigos selecionados e submetidos à planilha de análise, nota-se que existem algumas tendências principais no que diz respeito à delimitação de seus objetivos. Estes pontos de convergência foram sintetizados em 7 categorias: a) abordar as implicações pedagógicas/educacionais da formação no trabalho do psicólogo; b) Abordar as implicações pedagógicas/educacionais nos/de cursos de graduação; c) Abordar as implicações teóricas de temática; d) Propor uma nova prática pedagógica; e) Problematizar e criticar as implicações teóricas e/ou pedagógicas de abordagens na psicologia; f) Relatar uma experiência pedagógica/pesquisa; g) Outros. A delimitação da distribuição dos objetivos dos artigos pode ser acompanhada no gráfico abaixo:

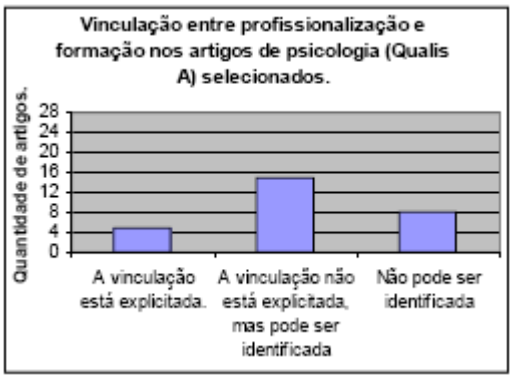


Alguns aspectos apreendidos na análise da planilha se apresentam como sendo mais importantes para a presente pesquisa. A concepção geral de formação, a possível vinculação entre formação e profissionalização e referências a formação específica do psicólogo, foram tomados, tendo em vista os objetivos desta investigação, como sendo os fatores dotados de maior centralidade.

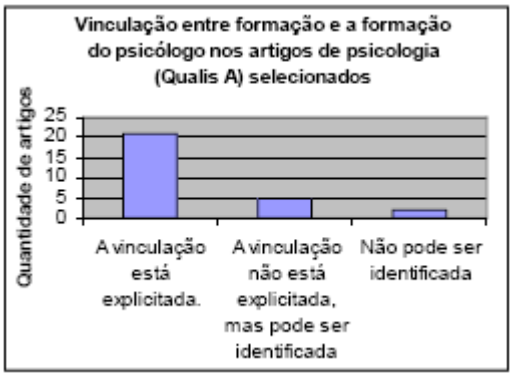
No que diz respeito a concepção geral de formação, buscou-se analisar se os artigos apresentavam explicitamente este conceito, se não apresentavam explicitamente o conceito, mas este poderia ser inferido através da leitura, e por fim, se o conceito não podia ser identificado. A distribuição quantitativa de cada uma destas respostas pode ser acompanhada no gráfico seguinte:



Referente à vinculação entre o conceito de formação e a profissionalização também foi adotado as mesmas três categorias “está claramente explicitado”, “não está explicitado, mas pode ser identificado” e “Não pode ser identificado”. Deve ser notado que na última categoria estão contemplados tanto os artigos que, por falta de clareza, não permitiam a apreensão clara dessa vinculação, quanto aqueles que se contrapunham explicitamente à vinculação entre formação e profissionalização.



Na investigação processada ficou claro que a exposição conceitual do que seja formação, tomada no seu caráter mais global, ocorre de maneira reduzida. É possível afirmar que, na maioria das vezes, ou o conceito não está presente, ou apenas pode ser inferido de maneira indireta, apontando assim para uma imprecisão conceitual sobre o que é tomado como formação. Apesar de não ocorrer a delimitação de tal conceito, nota-se que, por vezes, discute-se de maneira imediata sobre a formação específica do psicólogo. Visando a apreensão de tal configuração, seguiram-se as questões que objetivavam verificar como se a análise expressa no artigo resolve a problemática da formação no privilegiamento da profissão de psicologia, conforme pode ser observado no gráfico seguinte:



Análise dos dados

Através dos dados colhidos é possível perceber que existe uma considerável produção de artigos científicos na área de Psicologia no Brasil, que totalizam 5515, distribuídos em 67 periódicos avaliados e disponíveis pela CAPES. Nota-se um aumento anual na quantidade de material publicado e isto aponta para a crescente importância conferida a este tipo de produção científica.

Tomando-se os artigos com a avaliação ”QUALIS” A e B é visível a concentração em determinadas regiões do Brasil, em especial no sudeste. Esta região conta com 52,3% da produção nacional. Tal característica é explicada pelo fato de que é justamente esta parcela do país que possui uma maior concentração de renda, despontando com um pólo econômico, isto acarreta em uma maior possibilidade de investimento em algumas linhas de pesquisas, resultando em uma produção quantitativamente mais significativa.

Relativo aos periódicos com a qualificação ”QUALIS A” nota-se a mesma tendência pois a região sudeste concentra 67% da produção nacional. Estes dados apontam para uma vinculação entre a quantidade de produção e a possibilidades de investimento em pesquisas. A menor produção das demais regiões e a ausência de qualquer referência à região norte do país são dados que contribuem para corroborar esta hipótese.

Quando o parâmetro de analise é a presença das palavras chave ”formação” e”curso de psicologia” observa-se uma retração na participação da região sudeste do país, que contribui com 40% do universo investigado, seguido de uma expressiva expansão de outras regiões que até então não representavam uma significativa parcela

da produção nacional.Isto fica especialmente claro no caso da região Centro-Oeste que, no quantitativo geral de artigos é responsável por pouco mais de 12% da produção e, com relação ao universo delimitado, representa 36% do total de artigos.

Estes dados indicam que, apesar do peso da região sudeste na produção total de artigos, não se nota a manutenção desta mesma tendência quando se busca a especificidade da discussão acerca da formação. Não ocorre sequer a menção da palavra formação na maioria dos artigos, podendo indicar a ausência de uma reflexão e distanciamento da realidade imediata, que permitiria a reflexão sobre o que está sendo processado nos cursos de psicologia. É justamente esta ausência de estranhamento perante a realidade, aliada com uma tendência de produção a - crítica, que é solidária com a *semiformação.*

No cenário global nota-se que apenas 1,2% dos artigos de psicologia com a qualificação QUALIS 'A' contemplam a temática da formação em psicologia. Tal condição, já pela indicação numérica, é preocupante pela reduzida possibiidade de também colocar em questão a consolidação da *semiformação* que é . solidária com o irracionalismo e com a barbárie. Reduzida essa discussão, reduz-se os posicionamentos de resistência, como por exemplo, por uma busca pela *formação.*

Mesmo na pequena fatia da produção científica que discute a temática, o que é nomeado como formação não é necessariamente solidário com a reflexão, razão e com a emancipação humana. Em uma análise mais detida desta parcela, 1,2% dos artigos, que são representados por 28 textos científicos, nota-se que existe uma compreensão de formação que, na maioria dos casos, aponta prioritariamente para algo que poderíamos definir como *profissionalização.*

Após a submissão destes 28 artigos à planilha, nota-se que a maioria dos textos adotam como objetivo investigar como o percurso acadêmico, tomado predominantemente como equivalente de formação, influenciam no trabalho do psicólogo. É explícita a referência a dimensão profissionalizante, já na delimitação dos objetivos destes textos.

A ausência de uma reflexão ampla e teoricamente consistente sobre o que seria formação fica explícita também quando se pode notar que, dos 28, apenas 4 artigos definem claramente o que estão denominando como formação. Os 24 artigos restantes

ou não definem tal conceito ou não permitem uma apreensão clara do mesmo. Trabalha-se prioritariamente com a 'palavra' formação e não necessariamente com o conceito.

Nota-se também uma tendência a vincular de modo mais ou menos explicito a formação ao exercício profissional. Ao tomar o conceito amplo de formação humana e profissionalização nota-se que em 20 artigos tal ligação se evidencia. Ao se indagar sobre a formação específica do psicólogo e sua interface exclusiva com a sua execução meramente profissional, tem-se que 26 artigos postulam que tal vinculação deve ocorrer.

Não se desconsidera o fato de que em alguma medida o curso superior deve permitir também a inserção do psicólogo no mercado profissional, porém isto não significa postular que tal objetivo deva ser exclusivo ou mais importante. Formação, nos termos definidos pela teoria crítica, comporta a tensão existente entre a necessidade imposta de adaptação e o compromisso com a crítica desta sociedade, ao passo que semiformação estaria comprometida única e exclusivamente com a adaptação imediata ao existente, e isto certamente aponta para conseqüências drásticas, principalmente pela solidariedade para com o irracionalismo.

Conclusão.

A importância da reflexão se estabelece porque somente através do exercício racional é que o esclarecimento a ser conquistado, deslocando o homem do estado de menoridade para a maioridade. Urge portanto um permanente sentimento de estranhamento perante a realidade, que deve ser continuamente pensada.

Seria este um dos movimentos ligados a um projeto de formação que, contudo é obstacularizado por esta sociedade. A análise da produção brasileira de artigos de psicologia materializada nos últimos 5 anos enfrenta e atesta esta obstacularização, uma vez que existe a tendência de não promover reflexões sobre este fenômeno.

Tão pouco a baixa ocorrência de artigos que abordem a formação significa que ocorra um rompimento com tal cenário, pois na maioria dos casos aquilo que é nomeado como formação se restringe aos termos da profissionalização.

A restrição da formação à profissionalização, tal como aparece na maioria dos artigos, pode ser tomada como semiformação. É um projeto que visa garantir a adesão

imediata às conformações sociais, especialmente à formação para o mercado, não abrindo espaço para a crítica e reflexão. O exercício da razão, fundamental para o processo de esclarecimento do homem, é eclipsado pela imposição de uma racionalidade instrumentalizada e operacional, reduzida aos exclusivos termos da técnica para o trabalho. Este quadro estabelece a constatação que o campo de concentração de Auschwitz, tomado como emblema da negação do homem promovida por esta sociedade, não se localiza em um passado remoto, tão pouco se apresenta como apenas uma ameaça, mas sim se atualiza continuamente em várias instâncias, dentre as quais notamos também as instituições de ensino superior.

Referências Bibliográficas

ADORNO, T. *et alli*. **La personalidad autoritaria**. Buenos Aires: Proyección, 1965.

ADORNO, T. **Educação e Emancipação**. São Paulo: Paz e Terra, 1995.

ADORNO, T. **As estrelas descem à terra**. São Paulo: UNESP, 2007.

DUARTE, R, Esquematismo e semiformação. **Educação & Sociedade,** Campinas, v.24, n.83, p.441-458, ago. 2003.

MAAR, W. L., Adornos, semiformação e educação. **Educação & Sociedade,** Campinas, v.24, n.83, p.459-476, ago. 2003.

MAAR, W. L. Auschwitz e a dialética da cultura e da política. In: PUCCI et. alli (Orgs.). **Tecnologia, cultura e formação… ainda Auschwitz.** São Paulo: Cortez. 2003. p.57-74.

MAAR, W. L. Educação e experiência em Adorno. In: PAIVA, V. (Org.). **A atualidade da escola de Frankfurt.** Rio de Janeiro: IEC. 1996. p.63-74.

PUCCI, B (Org.). **Teoria crítica e educação**. São Carlos: Vozes, 1995. p.11-58.

Análise comparativa do perfil dos enfermeiros de um hospital universitário admitidos antes e após o ano de 2004

Thatianny Tanferri de Brito Paranaguá, Ana Lúcia Queiroz Bezerra
Faculdade de Enfermagem/UFG
E-mail: thatywish@yahoo.com.br; analuciaqueiroz@uol.com.br

Palavras chave: gestão de pessoas, processo seletivo, enfermagem.

Introdução

No mercado atual, competitivo, associado a um cenário econômico que impõe regulamentação do setor saúde, crescente demanda de eficácia e eficiência da assistência médico-hospitalar, a implantação de estratégias na gestão de pessoas eficientes e adequadas se faz urgente e necessária. Essa necessidade se acentua na prestação de serviços em saúde por essa atividade estar representada pelo atendimento as pessoas com intervenções diretas sobre os aspectos bio-psico-socio-espiritual (UBEDA; SANTOS, 2008).

A Enfermagem como parte integrante do setor de prestação de serviços de saúde ainda sofre influência dos modelos tradicionais de gestão, resultando num processo de organização do trabalho, baseado em tarefas, e com uma visão fragmentada do cliente, numa estrutura pouco participativa.

Este modelo tem gerado insatisfação dos profissionais e dos clientes e inviabilizado o sucesso no alcance dos objetivos das instituições de saúde e, conseqüentemente, dos serviços de enfermagem.

Para transformação dessa realidade é necessária a incorporação de mudanças e inovações no fazer e pensar a prática profissional, especialmente no gerenciamento de pessoas.

O gerenciamento nos serviços de enfermagem constitui-se em atividade complexa, exigindo dos profissionais competências para a implementação de estratégias adequadas ao contexto organizacional (NÓBREGA et al 2008).

Desta forma, garantir a adequação de pessoal apto ao alcance das metas organizacionais é uma importante função para os gestores de saúde e enfermagem (MARQUIS; HUSTON, 2005).

A escolha de pessoas para integrar os serviços, na visão de que elas constituem o capital humano das instituições que prestam serviços de saúde, é fundamental para os gestores de enfermagem, visto que as atividades se concretizam por meio das pessoas.

Nesse contexto se insere uma das áreas de gestão de pessoas, o recrutamento e a seleção de pessoal, que atualmente se configuram práticas desafiadoras para o serviço de enfermagem por envolver competências relativas a conhecimentos, habilidades e atitudes, para o alcance dos objetivos da instituição e da qualidade do atendimento aos clientes (MAZON, TREVISAN, 2000).

A seleção de profissionais com atributos adequados para a função deve ser uma prática comum no âmbito da saúde e na enfermagem, em decorrência das características do próprio contexto e de que as pessoas constitui elemento-chave na solução de problemas existentes nas unidades de saúde, coerentes com as tendências administrativas modernas (NÓBREGA et al 2008).

As pressões em torno da competitividade, a intensificação dos processos de globalização e as profundas transformações nas estruturas dos mercados implicam na revisão dos modelos e instrumentos de gestão, em particular os direcionados na gestão de pessoas (SANT'ANNA, 2008).

Essa visão precisa ser estimulada tanto nas instituições de saúde, como nas escolas formadoras, numa tentativa de transformar os modelos de ensino e de gestão em enfermagem.

No ensino, as Diretrizes Curriculares para os Cursos de Graduação em Enfermagem do Conselho Nacional da Educação têm provocado transformações nos rumos da formação dos profissionais de enfermagem na realidade brasileira nos sentido de mobilizar as instituições de ensino e serviços para buscar estratégias que possibilitem as mudanças na prática educativa. O intuito é ter profissionais com perfil crítico-reflexivo e que se responsabilize pela sua parcela das intervenções nos processos saúde-doença, na gerência e na construção de políticas de saúde. (BRASIL, 2001).

Num hospital universitário, isso ganha destaque especial por agregar docentes e acadêmicos de diversas áreas da saúde. No hospital campo desta pesquisa,

caracterizado pelo atendimento de alta complexidade e com acadêmicos e docentes das diversas áreas da saúde, os enfermeiros têm como uma das atividades a preceptoria dos acadêmicos da disciplina Estágio Supervisionado do Curso de Graduação em Enfermagem. A seleção de pessoal é por concurso público e até o ano de 2004 era de responsabilidade exclusiva do Centro de Seleção de Recursos Humanos da universidade. A partir de 2005 esse processo passou a ser realizado pelo Serviço de Gestão de Pessoas do hospital. A descentralização desse processo visou a escolha do candidato adequado ao cargo, a minimizar o absenteísmo assim como, o distanciamento entre o perfil dos profissionais selecionados e as necessidades da instituição.

Considerando as peculiaridades de um hospital universitário, o estudo tem como objetivo comparar as características dos Enfermeiros de um hospital universitário da região Centro Oeste admitidos até o ano de 2004 com os admitidos no período de 2005 a 2007.

Referencial teórico

O modelo de gestão de pessoas é um novo conceito em debate e tal terminologia vem sendo utilizada com freqüência por aqueles que estudam e praticam a gestão de recursos humanos nas organizações. Este modelo deve ser compreendido como o conjunto de políticas, práticas, padrões atitudinais, ações e instrumentos empregados por uma empresa para interferir no comportamento humano e direcioná-lo no ambiente de trabalho (FISCHER, 2001).

Na gestão de pessoas numa instituição de saúde, o recrutamento e seleção têm importância singular por ser o marco que orienta todas as ações em termos de desenvolvimento pessoal (PEREIRA; LEITE, 1991).

Entendemos recrutamento como um conjunto de técnicas que visam atrair candidatos potencialmente qualificados e capazes de ocupar cargos dentro da organização (CHIAVENATO, 1997).

A seleção de pessoal se caracteriza pelo processo de comparação, decisão e escolha dos melhores candidatos para a organização (CHIAVENATO, 1999).

Vários são os métodos utilizados na seleção de recursos humanos: triagem preliminar de currículos, entrevista na unidade de seleção, informações de pessoas confiáveis, testes técnico-profissionais, testes psicológicos, dinâmica de grupo,

entrevistas pela chefia futura, informações de empregos anteriores, informações cadastrais e exame médico (LACOMBE, 2005).

Tanto o recrutamento quanto a seleção são atividades integrantes do processo de gestão e envolvem a exploração e a análise do mercado de trabalho, além de encorajar e incentivar as pessoas no desenvolvimento de habilidades inovadoras (MAZON, TREVISAN, 2000).

A participação das instituições assistenciais e de ensino permite investigar em que medida se dá a aproximação dos significados dos elementos constitutivos da gestão de pessoas tanto no ensino como na prática do gerenciamento em enfermagem sendo, o resgate dessa realidade, um dos elementos essenciais para a construção de indicadores, através dos quais também são resgatados e analisados os diferentes elementos constitutivos das estruturas institucionais, dos processos de trabalho e dos resultados da assistência prestada (LIMA; KURCGANT, 2009).

Vários são os desafios apresentados ao mundo corporativo, cabendo ao gestor, escolher ferramentas que facilitem o trabalho e gerem resultados positivos. Surge, então, uma preocupação constante em oferecer qualidade, sendo indispensável a participação de profissionais competentes e que se identifiquem com a missão da organização. (RUTHES; CUNHA, 2008).

Devido às características do trabalho desenvolvido na saúde, a qualidade adquire significado particular e diferenciado das demais atividades envolvidas na produção de bens e serviços (LIMA; KURCGANT, 2009).

No âmbito da saúde, qualidade é definida como um conjunto de atributos que inclui um nível de excelência profissional, o uso eficiente de recursos, um mínimo de risco ao paciente/família, um alto grau de satisfação por parte dos usuários, considerando os valores sociais existentes (OMS, 1981).

Atualmente, ainda com horizonte na qualidade, a gestão de pessoas considera a dimensão humana como o centro da discussão, sendo os anseios, as expectativas e a satisfação das pessoas responsáveis para a concretização desses propósitos e vitais para o alcance das metas institucionais (LEITÃO; KURCGANT, 2004).

Desta forma, é necessário que hospitais e serviços de enfermagem repensem qual é o perfil desejável do enfermeiro que vá ao encontro dos valores, da missão e da visão da organização, tendo como horizonte o alcance das metas estabelecidas (MARTINS; KOBAYASHI; AYOUB; LEITE, 2006).

No intuito de conhecer os atributos dos enfermeiros que participaram do processo de seleção para atuar em um hospital universitário, o estudo se torna relevante, por ser um momento de avaliação e por delimitar as características consideradas adequadas para este profissional atuar num ambiente que integra acadêmicos e docentes, e onde as atividades estão direcionadas para a assistência, pesquisa e extensão. Espera-se que o estudo possa servir de feedback para outros momentos de recrutamento e seleção no processo de gestão de recursos humanos na enfermagem.

Metodologia

Estudo descritivo e exploratório, de abordagem quantitativa, realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC/UFG).

A população do estudo foi de 106 enfermeiros admitidos até dezembro do ano de 2004 (Grupo A) e 19 enfermeiros admitidos de 2005 a agosto de 2008 (Grupo B).

A coleta dos dados foi realizada no período de fevereiro a agosto de 2008. Aplicou-se um questionário contendo questões fechadas sobre a caracterização dos sujeitos e atributos necessários para atuar num hospital universitário e, questões abertas sobre a opinião acerca do processo seletivo.

Para o estudo quantitativo, os dados foram estruturados e processados em planilha eletrônica, Microsoft Office Excel versão 2003. Foi realizada análise descritiva usando freqüência absoluta e relativa, diferença de proporções para as variáveis categóricas e diferenças de médias para variáveis contínuas (idade e tempo de experiência profissional). Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 95%.

O estudo está vinculado ao projeto “Caracterização do Processo de Seleção da Equipe de Enfermagem de um Hospital Universitário da Região Centro-Oeste”, o qual foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, recebendo parecer favorável (Protocolo Nº 102/07). Além disso, todos os sujeitos receberam o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” e só participaram aqueles que concordaram, assinando o referido termo, conforme Resolução nº 196/96 (BRASIL, 1996).

Resultados

Participaram do estudo 81 enfermeiros assim distribuídos: 65 pertencentes ao Grupo A e 16 ao Grupo B. No Grupo A não foram entrevistados 33 enfermeiros por motivo de licença médica e férias e, oito se recusaram participar do estudo. No grupo B não foram encontrados três enfermeiros que se encontravam em férias ou licença médica.

Caracterização dos sujeitos

Os dados de caracterização dos sujeitos estão apresentados na Tabela 1.

Quanto ao sexo, em ambos os grupos, foi predominante o feminino, o que não contraria o contexto da enfermagem. Quanto ao estado civil, no Grupo A, 39 (60%) enfermeiros são casados e 26 (40%) são solteiros. No Grupo B, 8 (50%) enfermeiros são casados e os demais são solteiros. O número de enfermeiros casados é significativo para este tipo de profissional e se aproxima em ambos os grupos.

No grupo A, a média de idade foi significativamente mais alta que a do grupo B. A faixa etária variou entre 28 e 69 anos no grupo A e, no grupo B de 23 a 28 anos. O tempo de formado de 40% dos enfermeiros do grupo A está entre cinco e 15 anos e, 60% têm 16 ou mais anos. No grupo B, o tempo mínimo foi de um ano e o máximo de cinco anos.

O tempo médio de experiência profissional do grupo A em anos foi de 17,14 e do grupo B de 2,38 anos. Pode-se inferir que os enfermeiros do grupo A é composto por profissionais mais experientes, enquanto que o grupo B, mais jovens.

Nóbrega et al (2008) afirma que o maior tempo de formado dá ao enfermeiro mais maturidade e experiências para exercer cargos de gerência. Entretanto, estudos apontam que os padrões modernos de gerência das grandes organizações apostam em profissionais mais jovens por possuírem maior capacidade de desenvolver alto grau de identificação com o trabalho e com a instituição (ALVES; PENNA; BRITTO, 2004). No entanto são necessários mais estudos para comprovar se realmente são estas as novas tendências do mercado de trabalho.

TABELA 1 – Caracterização dos enfermeiros de um hospital escola. Goiânia – GO, 2008.

	GRUPO A	GRUPO B	Total	p
Sexo				
Masculino	4	3	7	0,135
	6,15	18,75	8,64	
feminino	61	13	74	
	93,85	81,25	91,36	
Total	65	16	81	
	100,00	100,00	100,00	
Idade				
Média em anos	44,27	27,75		0,000
Desvio padrão	6,90	3,66		
Estado civil				
solteiro*	26	8	34	0,468
	40,00	50,00	41,98	
casado	39	8	47	
	60,00	50,00	58,02	
Total	65	16	81	
	100,00	100,00	100,00	
Tempo de experiência profissional				
Média em anos	17,14	2,38		0,000
Desvio padrão	6,06	1,20		
Titulação				
especialização	55	14	69	1,000
	84,62	87,50	85,19	
mestrado	10	2	12	
	15,38	12,5	14,81	
Total	65	16	81	
	100,00	100,00	100,00	
Número de vínculos empregatícios				
1	16	6	22	0,351
	24,62	37,50	27,16	
2 ou mais	49	10	59	
	75,38	62,50	72,84	
Total	65	16	81	
	100,00	100,00	100,00	
Motivo para trabalhar na instituição				
educação continuada	13	6	19	0,190
	20,31	37,50	23,75	
plano de cargos e salários	51	10	61	
	79,69	62,50	76,25	
Total	64	16	80	
	100,00	100,00	100,00	
Características ideais				
conhecimentos e habilidades	41	8	49	0,338
	63,08	50,00	60,49	
trabalho em equipe	24	8	32	
	36,92	50,00	39,51	
Total	65	16	81	
	100,00	100,00	100,00	

*Inclui os divorciados e viúvos.

Quanto ao vínculo empregatício, no grupo A foi observado que 16 (24,62%) enfermeiros trabalham apenas no HC/UFG, 49 (75,38%) possuem dois ou mais vínculos empregatícios. No grupo B, seis (37,5%) possuem um vínculo e 10 (62,50) possuem dois ou mais vínculos.

O trabalho em caráter de dedicação exclusiva é um fator positivo para o profissional, visto que possibilita o seu aprimoramento e formação de vínculo tanto organizacional quanto com o usuário. Pesquisadores afirmam que a precarização dos salários obriga os profissionais a terem mais de um vínculo de trabalho, resultando em carga mensal longa, exaustiva e desgastante (NÓBREGA et al, 2008).

Vários são os motivos que influenciaram os enfermeiros a escolherem o HC/UFG como local de trabalho

Ambos os grupos destacaram o item planos de cargos e salário como principal fator de influência para trabalha, sendo 51 (79, 69%) enfermeiros do Grupo A e 10 (62,50%) do Grupo B. Em seqüência citaram a educação continuada, com 13 (20,31%) e 6 (37,50%), respectivamente. O plano de cargos e salários inclui benefícios, estabilidade, aposentadoria e o piso salarial. A educação continuada se refere ao aprendizado com acadêmicos e docentes, o desenvolvimento de treinamentos e oportunidade de aprendizado.

Na área de saúde e especialmente na enfermagem, que envolve várias categorias e múltiplas atividades, o processo de seleção deve ter como pressuposto a entrada de pessoal com atributos para o desenvolvimento de ações profissionais e para o alcance da qualidade da assistência de enfermagem. Esta perspectiva representa um desafio para o hospital, especialmente na esfera da gestão de pessoas, que segundo Marquis; Huston (2005) se destaca pela falta de interesse evidente. Dos objetivos gerais da gestão dos recursos humanos propostos, o autor destaca a execução de uma função global da gestão de pessoas para com o estabelecimento, fornecendo pessoal de quantidade e qualidades ideais.

Em relação à qualificação profissional, todos os enfermeiros de ambos os grupos possuem cursos além da graduação, sendo que 69 (85,19%) têm especialização e 12 (14,81%) possuem mestrado. Entre as especializações destacam-se Terapia Intensiva, Saúde Pública, Saúde da Família, Administração dos serviços de Saúde, Auditoria.

Opinião dos enfermeiros sobre o processo de seleção

No processo de seleção é importante que sejam admitidos pessoas com características que contemplem a missão e a filosofia do gerenciamento de recursos

humanos da instituição. Quando questionados quanto às características ideais para se trabalhar em um hospital universitário, 41 (63,08) enfermeiros do grupo A citaram ter conhecimentos e habilidades e 24 (36,92%) o trabalho em equipe.

No grupo B 8 (50%) citaram conhecimentos e habilidades e os demais o trabalho em equipe.

Considerando que a instituição pesquisada é um hospital escola, onde há predominância de acadêmicos em processo de ensino e aprendizagem, isso ganha uma importância significativa com reflexos na qualidade dos serviços.

Sobre a opinião dos enfermeiros quanto ao processo de seleção, foram feitas algumas questões abertas. Os profissionais do grupo A, quando questionados a opinarem sobre o processo seletivo, referiram: *há a necessidade de mudanças; o processo é voltado somente para acadêmicos da universidade; deve selecionar pessoas que atendem ao perfil da instituição.*

Ao grupo B também foram feitas questões abertas a respeito dos fatores dificultadores e facilitadores das etapas do processo de seleção. Como dificultadores citaram a prova prática devido a: *pouco tempo para o exame físico, uso da sistematização da assistência; atraso no início da prova; pressão dos instrutores; nervosismo; ansiedade.*

A entrevista, e a prova escrita foram relatadas como fatores facilitadores em decorrência de: *capacidade pessoal de expressão; conhecimento; receptividade da banca examinadora.*

O processo de seleção nesta instituição está em concordância com o que ocorre na maioria das instituições de saúde, que inclui análise curricular, prova escrita, prova prática, entrevista e verificação de referências. A prova escrita é considerada uma das fases mais importantes deste processo, uma vez que define quem serão os poucos candidatos que irão para a fase final da seleção. A entrevista também se configura em etapa imprescindível e tem como finalidade obter informações pessoais, profissionais e esclarecer /aprofundar questões contidas no formulário e/ou currículo (MAZON; TREVIZAN, 2000). Desta forma, o candidato deve se preparar para todas as etapas de um processo de seleção, independentemente da instituição/organização que se pretende trabalhar.

Em relação à colaboração do processo seletivo para o serviço de enfermagem, os sujeitos relataram que: *o processo de seleção permitiu a admissão de profissionais mais capacitados; ajudou na falta de pessoal.*

A seleção tem como uma das finalidades escolher, entre os candidatos atraídos pelo recrutamento, aqueles que correspondem ao perfil do cargo desejado pela empresa, visando manter ou aumentar a eficiência e desempenho do pessoal (CHIAVENATO, 1995).

Quanto ao serem consultados para o planejamento do processo seletivo da instituição relataram que : não foram consultados; não participaram da avaliação dos candidatos.

Um bom processo de recrutamento e seleção tem como vantagens adequação potencial e maior facilidade de negociação de metas de desempenho. Quando o seu planejamento e implementação ocorre coletivamente, envolvendo profissionais da instituição, poderá minimizar falhas e permitir a aquisição de pessoas necessárias a realidade institucional. (LIMONGI-FRANÇA; ARELLANO, 2002).

Em se tratando do serviço de enfermagem, entende-se ser o enfermeiro o profissional adequado para participar de um processo de seleção da sua futura equipe, pois apenas este conhece as reais necessidades do serviço, da instituição e certamente irá escolher àquele que irá colaborar com a melhoria da qualidade da assistência aos clientes.

Considerações

Frente aos resultados do estudo e à análise quantitativa aponta uma diferença significativa entre a idade dos enfermeiros do grupo A e do grupo B. Outro aspecto que se destaca é a titulação dos enfermeiros. É possível que os enfermeiros mais experientes estejam continuamente se qualificando em decorrência do processo de educação continuada da instituição. Os mais jovens já adentram com processo de qualificação mais avançado pela exigência atual do mercado de trabalho e a busca de inserção na instituição mediante concursos públicos.

No momento atual, em decorrência do contexto da saúde, do movimento da qualidade e das exigências dos clientes se faz necessário que o processo de seleção de pessoal compartilhado e abrangente seja uma prática na enfermagem, e estejam em consonância com as tendências administrativas modernas onde deve ser considerado as características do contexto do trabalho e de que as pessoas constituem elemento-chave na melhoria do cuidado.

Espera-se que este estudo colabore para a construção de estratégias institucionais inovadoras que orientem a tomada de decisão de gestores quanto à

seleção de pessoal com formação e capacitação para suprir as necessidades de assistência à população no contexto de uma instituição de saúde, que congrega acadêmicos e docentes de diversas áreas da saúde.

Numa perspectiva transformadora, espera-se também que o trabalho contribua para o direcionamento das competências do Enfermeiro, possibilitando a compreensão dos limites e das possibilidades da profissão, no âmbito de um hospital universitário, evidenciando a busca do fortalecimento do vínculo entre o ensino e o serviço de saúde.

Referências Bibliográficas

ALVES, M.; PENNA, C. M. M.; BRITTO, M. J. M. Perfil de gerentes de unidades básicas de saúde. **Revista Brasileira de Enfermagem,** 2004, v. 57, p. 441-6.

BRASIL. Conselho Nacional de Educação - **Resolução CNE/CES Nº 3, de 7 de novembro de 2001** - Institui Diretrizes Curriculares Nacionais do Curso de Graduação em Enfermagem. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde - Conselho Nacional de Saúde. **Resolução n° 196 de 10 de outubro de 1996.** Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras da pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília, 1996. Disponível em: http://www.ufrgs.br/bioetica/res19696.htm . Acesso em 03/03/07.

CHIAVENATO, I.; **Gestão de Pessoas: Novo papel dos Recursos Humanos nas Organizações**. Rio de Janeiro; Campus, 1999.

CHIAVENATO, I. **Introdução à teoria geral da administração.** 5.ª edição, São Paulo: Ed. Makron Books, 1997.

CHIAVENATO, I. **Recursos humanos.** 3. ed. São Paulo: Atlas, 1995.

FISCHER, A. L. O conceito de modelo de gestão de pessoas – modismo e realidade em gestão de recursos humanos nas empresas. In: DUTRA, J. S. **Gestão por competências: um modelo avançado para o gerenciamento de pessoas.** São Paulo: Gente, 2001.

LACOMBE, F. **Recursos humanos: princípios e tendências**. São Paulo: Saraiva, 2005.

LEITÃO, R. E. R.; KURCGANT, P. **Qualidade na prática gerencial de Enfermagem.** Niterói: Intertexto; 2004.

LIMA, A. F. C.; KURGANCT, P. Indicadores de qualidade no gerenciamento de recursos humanos em enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem,** 2009, v. 62, n. 2, p. 234-239.

LIMONGI-FRANÇA, A. C.; FISHER, A. L.; NOGUEIRA, A. J. F. M.; ARELLANO, E. B.; REIS, G. G.; et al. **As pessoas na organização.** São Paulo: Editora Gente, 2002.

MARQUIS, B. L.; HUSTON, C. J.; **Administração e liderança de enfermagem: Teoria e prática.** 4° ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

MARTINS, C.; KOBAYASHI, R. M.; AYOUB, A. C. et al. Perfil do enfermeiro e necessidades de desenvolvimento de competência profissional. **Texto & Contexto – Enfermagem,** 2006, v. 15, n. 3, p. 472-478.

MAZON, L; TREVISAN, M. A.; Recrutamento e seleção de Recursos Humanos em um hospital psiquiátrico de um município paulista. **Revista Latino-Americana de Enfermagem,** 2000, v. 8, n. 4,

NÓBREGA, M. F. B.; MATOS, M. G.; SILVA, L. M. S.; JORGE, M. S. B. Perfil gerencial de enfermeiros que atuam em um hospital público federal. **Revista Enfermagem UERJ,** 2008, v. 16, n. 3, p. 333-38.

Organização Mundial de Saúde. **Avaliação dos Programas de Saúde: normas fundamentais para sua aplicação no processo de gestação para o desenvolvimento nacional de saúde.** Genebra: Organização Mundial de Saúde; 1981.

PEREIRA, L. L.; LEITE, M. M. J. Recrutamento e seleção do pessoal de enfermagem. In: KURCGANT, P; CUNHA, K. C. MASSAROLLO, M. C. K. B. Administração em Enfermagem. São Paulo: EPU, 1991.

RUTHES, R. M.; CUNHA, I. C. K. O. **Gestão por competências nas Instituições de Saúde - Uma aplicação Prática.** Martinari, São Paulo 2008.

SANT'ANNA, A. S. Profissionais mais competentes, politicas e práticas de gestão mais avançadas? **RAE eletrônica,** 2008, v. 7, n. 1, p. 1-26.

UBEDA, C. L.; SANTOS, F. C. A. Os principais desafios da gestão de competências humanas em um instituto público de pesquisa. **Gestão e Produção,** 2008, v. 15, n. 1, p. 189-199.

Efeito do Extrato Aquoso de ESPORÃO-DE-GALO (*Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent) na Secreção Basal e Estimulada em Mucosa Gástrica de Rã.

[3]Tavares, A., [3]Galdino, P.M., [2]Paula, J.R., [3]Costa, E.A., [1]Ferreira, P.M.
[1]DCiF/ICB, UFG, Campus Samambaia; [2]Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais/FF, UFG, Campus Universitário; [3]Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais/DCiF/ICB, UFG, Campus Samambaia.

Palavras-chave: esporão de galo; secreção ácida; mucosa isolada de rã.

1. INTRODUÇÃO

Ulmaceae é uma família de plantas angiospermas, dicotiledôneas classificadas na subdivisão Magnoliophyta pertencente à ordem Rosales. O grupo inclui 25 a 30 espécies classificadas em gêneros como *Celtis, Ampelocera, Chaetachme, Hemiptelea, Holoptelea, Phyllostylon, Planera, Ulmus* e *Zelkova*. A espécie a ser estudada *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent é caracterizada como arbusto ou pequena árvore, apoiante, de copa globosa, de até 10 m de altura, com ramos geralmente em forma de zig-zag e compridos (7m), muito flexíveis, armados de espinhos estipulares curtos, agudos, solitários e recurvados e com ramúsculos comprimidos e pubescentes. A grande variação no tamanho de suas folhas deu a espécie vasta sinonímia botânica. *Celtis aculeata* Sw., *Celtis aculeata var. laevigata* (Kunth) Planch., *Celtis alnifolia* (Wedd.) Planch., *Celtis asperula* Miq., *Celtis bonplandiana* Planch., *Celtis brevifolia* (Klotzsch) Miq., *Celtis dichotoma* (Klotzsch) Miq., *Celtis goudotii* Planch., *Celtis hilariana* Planch., *Celtis morifolia* Planch., *Celtis pavonii* Planch., *Celtis spinosa* Spreng., *Celtis spinosissima* (Wedd.) Miq., *Celtis triflora* (Ruiz ex klotzsch) Miq., dentre inúmeras outras. Também possui sinonímias populares: esporão-de-galo, tela, taleira, taleira-unha-de-gato, gurrupiá, sarã e grão-de-galo.

Relatos populares no Estado de Goiás indicam o uso do Esporão de galo, sobre a forma de chá ou abafado de suas folhas, para o tratamento de várias

queixas tais como, dores no corpo, reumatismo, dores no peito, asma, cólicas, má digestão e como diurética não ficando claro do ponto de vista etnobotânico qual sua principal utilização terapêutica. Seu uso é bastante comum na forma de chá com finalidade gastroprotetora.

Da família Ulmaceae, vários estudos tem demonstrado uma variabilidade nas atividades biológicas. Paschke et al. (2009) e Jin et al. (2008) mostraram atividades antiproliferativa, anticancerígena e antiinflamatória dos extratos da *Ulmus laevis e* da *Ulmus davidiana* Planch, respectivamente. Oh et al. (2008) mostraram que a *Ulmus macrocarpa* possui atividade antihipertensiva, vasorelaxante e antioxidante.

Existem pouquíssimos trabalhos na literatura sobre a atividade farmacológica do Esporão de galo e/ou do gênero *Celtis*.

Dimo et al. (2005) demonstraram um efeito vasorelaxante de extratos da *Celtis* durandii Engler em aortas isoladas de ratos

Recentemente, estudos feitos em nosso laboratório demonstraram que o extrato do Esporão de galo reduz o índice das lesões e o número de úlceras induzidas por etanol e indometacina em camundongos, podendo esta redução de úlceras ser devido à redução da secreção gástrica de ácido (Gonçalvez et al. (2008). Sousa et al. (2009) demonstraram através do modelo de ligadura de piloro que o extrato aquoso das folhas de Esporão de galo reduziu o volume de secreção e acidez livre, aumentando o pH.

Na prospecção fitoquímica do gênero *Celtis* podemos encontrar glicoflavonóides (Spitaler et al., 2009) que possuem atividade antiulcerogênica (Di Carlo et al., 1999)

Assim, este trabalho procura estudar o efeito do extrato aquoso das folhas de Esporão de galo sobre secreção gástrica de H^+, buscando justificativa para o uso popular desta espécie vegetal como gastroprotetora, justificar a atividade anti-ulcerogênica gástrica atribuída a esta espécie e o possível mecanismo de ação.

Os principais mediadores da secreção gástrica em humanos são a Acetilcolina, Gastrina e Histamina. Outras substâncias como aminoácidos

circulantes, cafeína, etanol e prostaglandinas também exercem efeito sobre a secreção de ácido pelas células parietais.

A Acetilcolina é o neurotransmissor clássico liberado pelos neurônios que estimula a secreção gástrica. Os sinais nervosos para estimular a secreção gástrica por este mediador podem ser oriundos do sistema nervoso central, ou podem ser gerados no próprio estômago (sistema nervoso entérico). Além de favorecer diretamente a secreção ácida pelas células parietais, a Acetilcolina liberada dos neurônios proporciona a secreção de Gastrina pelas células G das glândulas pilóricas. A Gastrina atinge as células parietais a partir da circulação sistêmica, estimulando as mesmas a aumentar em até oito vezes a secreção de ácido clorídrico.

Uma pequena quantidade de Histamina é formada continuamente na mucosa gástrica. Quando as células parietais se encontram estimuladas pela acetilcolina e pela Gastrina ocorre liberação dessa histamina armazenada, aumentando substancialmente a secreção de ácido clorídrico. Um fator importante é que nem a Acetilcolina nem a Gastrina são capazes de causar secreção ácida importante na presença de um antagonista de receptores H2. Portanto, a Histamina é um componente imprescindível para a produção de ácido pela célula parietal.

Evidentemente que qualquer substância que interfira com a liberação e/ou com os receptores dos secretagogos também afetará a secreção gástrica ácida.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito do extrato bruto aquoso das folhas de ***Celtis iguanaea* (Jacq.)** (Esporão de galo) sobre a secreção ácida gástrica basal e estimulada pela Histamina e Acetilcolina, utilizando como modelo a mucosa gástrica de rãs. Visto que esta planta é utilizada para o tratamento de distúrbios gastrointestinais na medicina popular, ela pode reduzir a liberação de H^+ basal interferindo com os principais receptores dos secretagogos (Histamina e/ou Acetilcolina).

3. METODOLOGIA

3.1 Material Botânico

Amostras de folhas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent foram coletadas em região de cerrado modificado nas proximidades da cidade de Goiânia (GO). O material botânico coletado foi identificado pelo Prof. Dr. José Realino de Paula – Faculdade de Farmácia - UFG e uma exsicata (n° 4011 0) deposi tada no Herbário do referido departamento.

3.2 Obtenção do Extrato Aquoso de Esporão de Galo (EAEG)

As folhas de esporão-de-galo (*Celtis iguanaea)* foram dessecadas em estufa a 40℃ com ventilação forçada, em seguida, t rituradas em moinho de facas tipo Willey. 27g do material pulverizado foi submetido a um processo de extração por infusão, em 900 ml de água, por trinta minutos, com agitação ocasional, obtendo o extrato aquoso bruto. O processo extrativo obteve um rendimento de 20%.

3.3 Método de preparação da mucosa gástrica isolada de rã

Neste modelo, foi utilizado o método descrito por Ferreira et al. (2004) modificado de Villegas e Sananes (1968).

Após a destruição do sistema nervoso central das rãs, o abdômen foi aberto e o estômago removido. Por divulsão, a camada muscular foi completamente separada da mucosa. Após lavagem da mucosa, esta foi aberta longitudinalmente pela pequena curvatura e colocada sobre um papel de filtro com o lado luminal voltado para cima. A mucosa foi, então, adaptada à câmara de Ussing, sendo o lado luminal preenchido com solução de Ringer sem tampão e o lado seroso com Ringer tamponado. A oxigenação foi feita com oxigênio comercial por borbulhamento das soluções em contato com a mucosa. As substâncias a serem testadas foram adicionadas ao Ringer em contato com o lado seroso ou mucoso após o período de estabilização. O pH da solução em contato com o lado luminal das mucosas foi continuamente monitorado por meio de potenciômetro. O pH foi constantemente ajustado para 6,5 (pH inicial), com NaOH 0,01 N, ao longo de todo o experimento.

Os resultados foram expressos em microequivalentes grama de H+ por grama de peso seco da mucosa e por período de incubação em minutos (µEq/g/min).

3.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como médias ± erro padrão das médias. As diferenças entre os grupos foram detectadas por ANOVA, seguido do teste de Student-Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (Sokal e Rohlf, 1981).

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da Cimetidina sobre a secreção gástrica de H^+

A Cimetidina é um fármaco capaz de bloquear receptores H_2, atuando como antagonista competitivo reversível das ações da Histamina sobre esses receptores. Desta forma, ela é capaz de reduzir eficazmente a secreção ácida gástrica.

Diferentes concentrações de Cimetidina foram testadas em mucosa isolada de rã, ocorrendo uma redução de secreção de H^+ de forma dose-dependente (Fig. 2) (n=3).

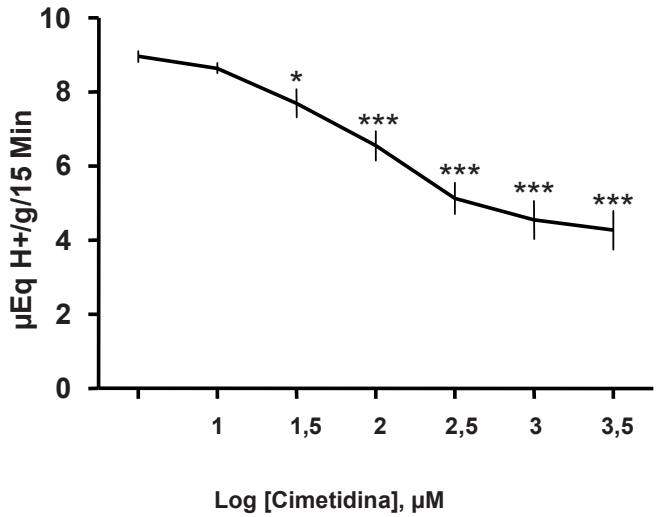


Figura 1. Efeito da Cimetidina sobre a secreção gástrica de H^+. **p<0,05; ***p<0,001*

4.2 Efeito da Histamina sobre a secreção gástrica de H^+

A Histamina é agonista de receptores H_2 e sua ação nas células parietais promove o estímulo da secreção de ácido. A Histamina, ao se ligar a receptores

histaminergicos (H_2) acoplados a proteína G estimula a conversão do AMP em AMP cíclico, o qual ativa proteínas quinases específicas, que iram fosforilar proteínas envolvidas na ativação da bomba de prótons.

Diferentes concentrações de Histamina foram testadas em mucosa isolada de rã, ocorrendo um aumento de secreção de H^+ de forma dose-dependente (Fig. 3) (n=3).

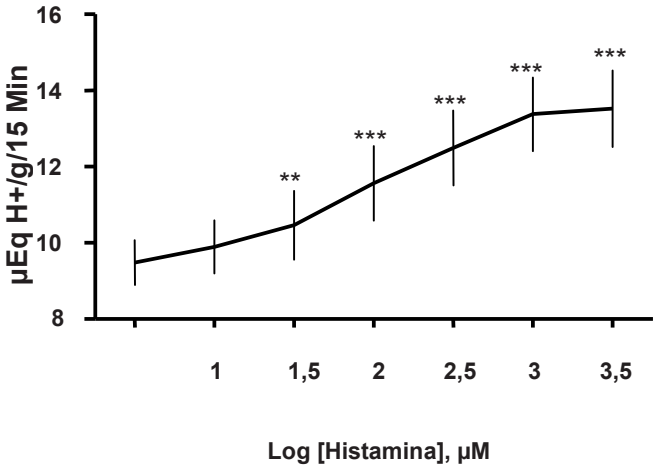


Figura 2. Efeito da Histamina sobre a secreção gástrica de H^+. **p<0,05; ***p<0,001*

4.3 Efeito do EAEG sobre secreção gástrica de H^+

O extrato aquoso das folhas de Esporão de galo foi capaz de atuar sobre a secreção de ácido em mucosa isolada de rã em Câmara de Ussing. Foram utilizadas diferentes concentrações do extrato, as quais reduziram significativamente a secreção gástrica de H^+ comparado com o valor controle (sem adição do extrato) (Fig. 1) (n=3).

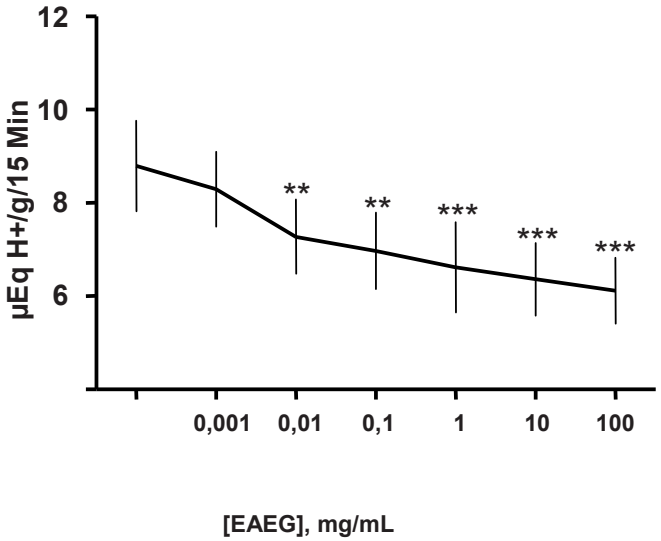


Figura 3. Efeito do EAEG sobre secreção gástrica de H^+. ***p<0,01; ***p<0,001*

4.4 Efeito do EAEG sobre secreção gástrica de H^+ induzida pela Histamina

A Histamina (300 µM) elevou a secreção de ácido em mucosa isolada em câmara de ussing, a qual passou do valor basal 7.383 ± 0.4473 para 10.723 ± 0.8874 µEq/g/15min (n=3) (Fig.4).

No entanto, após a adição do extrato aquoso de Esporão de Galo (10 mg/ml) o efeito da Histamina (300 µM) sobre a secreção gástrica de ácido foi diminuído.

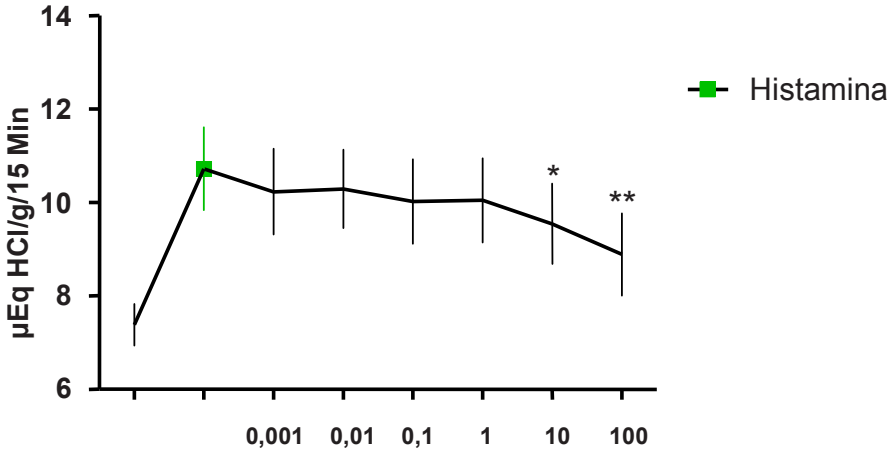


Figura 4. Efeito do EAEG sobre secreção gástrica de H^+, induzida pela histamina (300 µM). ***p<0,01; ***p<0,001*

DISCUSSÃO

Neste trabalho foi feito o estudo do extrato bruto aquoso das folhas de Esporão de galo (*Celtis iguanaea*) sobre a secreção de ácido, utilizando para isso a mucosa gástrica isolada de rã.

As animais utilizados neste estudo foram rãs do gênero *Rana catesbeiana* pois são de fácil manuseio e a mucosa gástrica é facilmente isolada da camada muscular, e este isolamento proporciona a ausência de fatores como ação hormonal, neural e vascular, os quais poderiam estar influenciando a secreção de H+, como ocorre ‘’in vivo’’ (Parsons e Bunce, 1978). Outra vantagem é a utilização de uma única mucosa para avaliar diferentes drogas em diferentes concentrações, permitindo realizar vários experimentos em um mesmo animal e utilizar um número reduzido de animais.

A secreção gástrica de ácido pelas células parietais se dá a partir a interação de diferentes secretagogos. A secreção de H+ é mediada centralmente pelas fibras parassimpáticas vagais (Acetilcolina), e perifericamente, pelas células enterocromafins (Histamina), células G (Gastrina) e terminações vagais (Acetilcolina) (Prinz et al., 1992). Na Fig. 1 podemos observar que a Cimetidina

reduziu a secreção gástrica de ácido e que na Fig. 2 a Histamina aumentou de forma dose-dependente esta secreção, ambas adicionadas do lado seroso da mucosa. Esta metodologia mostrou ser apropriada para este estudo, já que a secreção gástrica de ácido responde tanto a agonistas e/ou antagonistas (Gonzaga & Alzamora, 1981; Lipsy et al., 1990; Alzamora et al., 1998; Ferreira et al., 2004). A Acetilcolina não aumentou a secreção gástrica de ácido quando adicionada do lado seroso da mucosa (dados não apresentados), mas que estão de acordo com a literatura, pois esta substância aumenta a secreção gástrica somente quando adicionada do lado luminal (Ferreira et al., 2004).

Na literatura, não tem nada descrito sobre o Esporão de galo ou sobre o possível mecanismo de ação desta planta sobre a atividade gastrointestinal. Uma vez constatada a viabilidade da preparação, mucosas foram incubadas com o EAEG do lado seroso, o que reduziu a secreção gástrica de ácido (Fig. 3); similarmente ao obtido quando adicionamos a Cimetidina (Fig. 1), Alguns trabalhos tem demonstrado .

Para estudar uma possível inibição da liberação de Histamina pelo EAEG, mucosas foram incubadas com solução de Ringer contendo Histamina e o extrato. O EAEG diminuiu o aumento de secreção de H+ provocado pela Histamina. Com relação à liberação de Histamina, alguns compostos (Acetilcolina e Gastrina) possuem a capacidade de estimular a liberação de Histamina (Rangachari, 1975ª; Schubert e Shamburek, 1990). Logo, deve-se continuar este estudo para saber se o EAEG interfere somente com a Histamina ou com outros secretagogos.

Assim, os resultados mostraram que o EAEG inibiu tanto a secreção basal de H+ como aquela induzida pela Histamina, podendo o extrato estar interferindo com os mecanismos de liberação da Histamina e/ou mesmo estar atuando como antagonista de receptores H2.

CONCLUSÃO

Podemos concluir que o extrato aquoso de Esporão de Galo reduz a secreção gástrica de ácido e este efeito pode estar relacionado com a Histamina,

não podendo descartar outros possíveis mecanismos, como inibição da bomba H+-K+-ATPase, aumento do muco protetor pelas prostaglandinas, dentre outros.

Esses resultados justificam o uso dessa planta pela população como gastroprotetora, já que a mesma possui uma ação anti-secretagoga, o que diminui o efeito agressor do HCl sobre a mucosa gástrica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZAMORA AC, FERREIRA PM, DE OLIVEIRA CN, ALZAMORA F, VIEIRA MA. (1998). kinin receptors mediating the effect of bradykinin on gastric acid secretion. **Regulatory Peptides** 2; 73 (2):113-7.

BERGLINDH, T.; HELANDER, H.F. and OBRINK, K.J. (1976). Effects of secretagogues on oxygen consumption, aminopyrine accumulation and morphology in isolated gastric glands. **Acta Physiologica Scandinavica**, 97: 401-414.

DI CARLO, G., MASCOLO N.; LZZO A.A.; Capasso, F.. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences** 65 (4): 337-353, 1999.

DIMO T, NTCHAPDA F, ATCHADE AT, YEWAH MP, KAMTCHOUING P, NGASSAM P. Effects of methylene chloride/methanol leaf extract of *Celtis durandii* Engler (Ulmaceae) on constriction of rat aorta. **Pharmazie** 60 (7): 548-50, 2005

FERREIRA PM, DE OLIVEIRA CN, DE OLIVEIRA AB, LOPES MJ, ALZAMORA F, VIEIRA MA. A liophilized aqueous extract of *Maytenus ilicifolia* leaves inhibits histamine-mediated acid secretion in isolated frog gastric mucosa. **Planta** 219 (2): 319-24, 2004.

GONÇALVES, N.Z., GALDINO, P.M., HONÓRIO, T.C. DE D., PAULA, M.A.,GUIMARÃES, H.A., PAULA, J.R. DE, COSTA, E.A. ATIVIDADES

FARMACOLÓGICAS DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE Celtis iguanaea (Jacq.) Sargent (ULMACEAE). **FesBE 2008:** 36.059.

GONZAGA, HMS AND ALZAMORA F (1981). A comparative study of gastric secretion induced by agonists added to the luminal or serosal surface of the isolated frog gastric mucosa. **Brazilian Journal Medical and Biological Research** 14: 456-456.

JIN UH, SUH SJ, PARK SD, KIM KS, KWON DY, KIM CH. Inhibition of mouse osteoblast proliferation and prostaglandin E2 synthesis by Ulmus davidiana Planch (Ulmaceae). **Food Chem Toxicol**. 46 (6): 2135-42, 2008.

OH KS, RYU SY, OH BK, SEO HW, KIM YS, LEE BH. Antihypertensive, vasorelaxant, and antioxidant effect of root bark of *Ulmus macrocarpa*. **Biol Pharm Bull.** 31 (11): 2090-6, 2008.

PARSONS, M.E. AND BUNCE K.T. (1978). Gastric H+ - ion secretion in the isolated whole rat stomach - the effects of agonists of agonist and antagonists. **Acta Physiologica Scandinavica (Special Suppl.):** 141-142.

PASCHKE D, ABARZUA S, SCHLICHTING A, RICHTER DU, LEINWEBER P, BRIESE V. Inhibitory effects of bark extracts from *Ulmus laevis* on endometrial carcinoma: an in-vitro study. **Eur J Cancer Prev.** 18 (2):162-8, 2009.

PRINZ, C.; KAJIMURA, M.; SCOTT, D.; HELANDER, H.; SHIN, J.; BESANCON, M.; BAMBERG, K.; HERSEY, S. AND SACHS, G. (1992). Acid secretion and H, K, ATPase of stomach. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, 65: 577-596.

RANGACHARI, P.K. (1975a). Histamine release by gastric stimulants. **Nature**, 253: 53-55.

SCHUBERT, M.L. and SHAMBUREK, R.D. (1990). Control of acid secretion. **Gastroenterology Clinics of North America**, 19 (1): 01-25.

SOUSA, F.B., FLORENTINO, I.F., GALDINO, P.M., PAULA, J.R., COSTA, E.A. Atividade do Extrato aquoso das folhas de Celtis iguanae (JACQ.) Sargent (ULMACEAE) em modelo de úlcera induzida por estresse em camundongo. **FesBE 2009:** 36.003.

SPITALER R., GURSCHLER S., ELLMERER E., SCHUBERT B., SGARBOSSA M., ZIDORN C. Flavonoids from *Celtis australis* (Cannabaceae). **Biochemical Systematics and Ecology** 37: 120–121, 2009.

VILLEGAS, L.; SANANES, L. Independence between ionic transport and net water flux in frog gastric mucosa. **Am. J. Physiol**., 214 (5): 997-1000, 1968.

Efeitos Termodifusivos e Magnetoforéticos em Magnetolipossomas Gigantes

F. M. Faria Filho[1], A. F. Bakuzis[1]

[1]Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física, 74001-970, Goiânia-GO,Brasil

E-mail: abakuzis@hotmail.com

Palavra-chave: Magnetolipossoma; Magnetoforese; Termodifusão.

I. Introdução

Os magnetolipossomas são estruturas esféricas ocas cuja superfície é formada por uma dupla camada lípidica e possuem nanopartículas magnéticas encapsuladas. Esses sistemas são biocompatíveis e possuem diversas aplicações na área de cosméticos, processos de liberação controlada de fármacos, e têm sido utilizados tanto no diagnóstico de doenças, como agentes de contraste no imageamento por ressonância magnética nuclear (RMNI) [1], quanto no tratamento via o processo de magnetohipertermia (aquecimento local via ação de campo magnético ac) [2], ou ainda, no carreamento de fármacos.

O comportamento de magnetolipossomas pode variar dependendo da uniformidade ou não do campo magnético aplicado e até mesmo da intensidade do mesmo. Dependendo do tipo da estrutura do magnetolipossoma e da intensidade do campo magnético citada acima pode ocorrer até mesmo o rompimento destas vesículas após um alongamento das mesmas, sendo resultado da competição entre forças magnéticas e capilares [3]. Neste trabalho nós investigamos o fenômeno de magnetoforese [4], no qual partículas magnéticas se movimentam ao longo da direção de um gradiente de campo e os efeitos termodifusivos [5] sobre esses agentes, no qual é gerado um gradiente de temperatura paralelo ao gradiente de campo magnético [6].

II. Objetivos

Os objetivos do projeto são:

i)Entender o sistema magnetolipossoma e estudar algumas de suas aplicações;

ii)Entender o efeito de magnetoforese e o efeito de Soret;

iii)Fazer uma montagem experimental para investigar efeitos magnetoforéticos e termodifusivos e modelar os resultados.

II-A Magnetoforese

A força magnética, presente devido ao gradiente de campo magnético, faz com que os lipossomas mudem sua trajetória passando a possuir uma velocidade relativa não-nula em relação as moléculas do líqüido carreador. Nesta situação a força de Stokes é igual a força magnética. Sendo a força de Stokes devido a friccão experimentada por objetos esféricos que se movem em um fluido viscoso igual a:

$$F_{Stokes} = 6\pi\eta R u_m \quad (1)$$

onde η é a viscosidade do fluido, R o raio da partícula e u_m a velocidade magnetoforética. E a força magnética devido a presença do gradiente de campo magnético,

$$F_m = \mu_l \frac{dB}{dz} \quad (2)$$

onde $\frac{dB}{dz}$ é o gradiente de campo magnético e μ_l o momento magnético do magnetolipossoma que é definido por:

$$\mu_l = n\mu \quad (3)$$

onde n é o número de nanopartículas encapsuladas por cada magnetolipossoma e μ o momento magnético de cada nanopartícula dado por:

$$\mu = M_s \frac{\pi}{6}\left\langle D^3 \right\rangle \quad (4)$$

sendo M_s a magnetização de saturação e $\left\langle D^3 \right\rangle$ é o diâmetro cúbico médio das nanopartículas. Para uma amostra de nanopartículas de magnetita recobertas com carboxildextran dispersas em água em pH fisiológico, dados de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), mostrados na Fig.1, permitiram obter o diâmetro modal $(\overline{D})$ de 9,01 nm com uma dispersidade (σ) de 0,28, considerando uma função de distribuição de tamanho de partículas do tipo log-norma [7]:

$$P(D) = \frac{\exp(-2\sigma^2)}{\overline{D}\sigma\sqrt{2\pi}} e^{\frac{\ln^2\left(\frac{D}{\overline{D}}\right)}{2\sigma^2}} \quad (5)$$

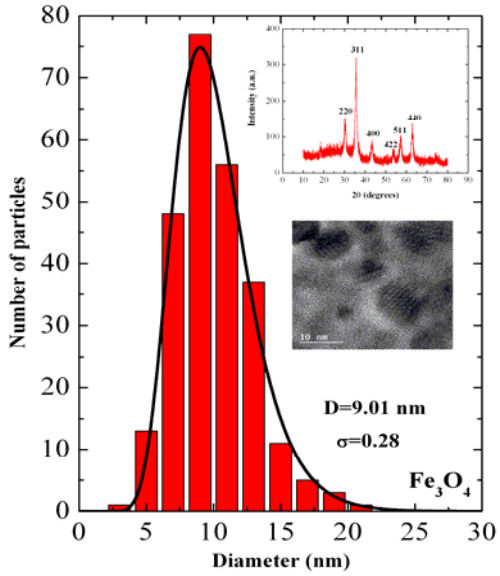


Fig. 1 Distribuição de tamanhos das nanopartículas. A linha sólida representa o melhor ajuste dos dados de TEM, pelo qual obtivemos o diâmetro modal e a dispersidade das nanopartículas magnéticas.

Sabendo a viscosidade do fluido, o gradiente de campo magnético, a magnetização de saturação da magnetita a temperatura ambiente e a distribuição de diâmetros das nanopartículas, pode-se facilmente determinar o número médio de nanopartículas encapsuladas em cada magnetolipossoma. Esta análise aparece na seção V-A.

II-B Efeito de Soret e aTermodifusão

O efeito de Soret é um fenômeno observado quando há uma mistura de dois ou mais tipos de partículas sujeitas a uma força devido a um gradiente de temperatura. Ele foi estudado primeiramente em 1856 por Ludwig e em 1879 por Soret [8]. Este é observado em fluidos magnéticos (colóides estáveis constituídos de nanopartículas magnéticas dispersas em um solvente), onde as nanopartículas se movimentam devido a tal gradiente. Podemos escrever este fluxo de massa da seguinte forma:

$$\vec{J} = -\rho_P D_0 (\vec{\nabla}\varphi + S_T \vec{\nabla} T) \quad (6)$$

onde ρ_ρ é a densidade de fase sólida, φ a fração volumétrica da partícula no colóide, T a temperatura absoluta, D_0 o coeficiente de difusão de translação para colóides diluídos contendo partículas esféricas e S_T o coeficiente de Soret.

A termodifusão é identificada como positiva quando moléculas mudam de uma região quente para uma fria e negativa quando o inverso é verdadeiro. (Vide Fig. 2)

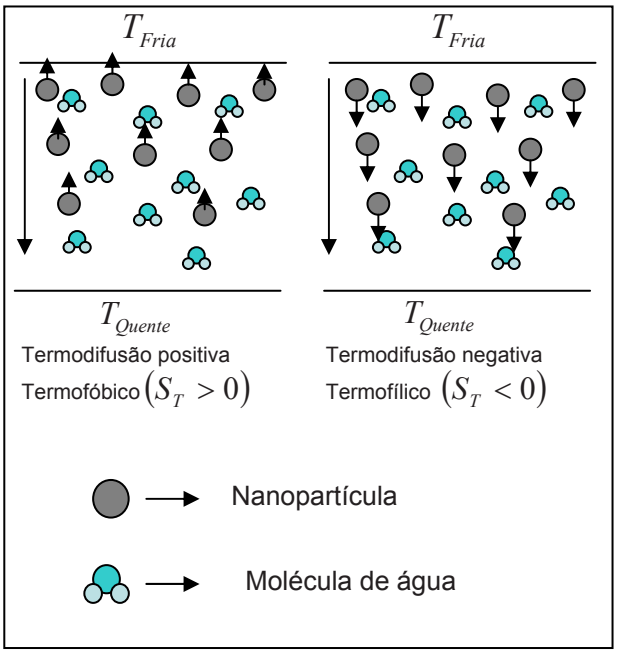


Fig. 2 As partículas se movem devido a um gradiente de temperatura. Note que a seta a esquerda mostra o sentido de tal gradiente.

III-C Magneto-Termodifusão

O fenômeno de magneto-termodifusão combina os processos de magnetoforese e termodifusão. Blums et al. [6] criou um modelo para estudar o efeito de Soret nas nanopartículas sob a ação de um campo magnético. Algumas considerações teóricas permitem concluir que a difusão termal das nanopartículas magnéticas nos ferrocolóides podem ser significamente afetadas pelo gradiente de campo magnético interno.

O cálculo da velocidade magnetoforética da nanopartícula pode ser obtido usando o fluxo de massa, que é descrito por:

$$\vec{J} = -\rho_\rho D_0 \vec{\nabla}\varphi + \vec{u}_m \rho_\rho \varphi \qquad (7)$$

Sendo o coeficiente de difusão igual a:

$$D_0 = \frac{k_B T}{3\pi\eta d} \qquad (8)$$

onde d é o diâmetro da partícula, k_B a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta. Nesse modelo a velocidade magnetoforética pode ser descrita por [6]:

$$\vec{u}_m = \frac{\mu_0 d^2}{18\eta}\left\{3K_\mu\mu\left(H\vec{\nabla}\right)H - +H\left(H\vec{\nabla}\right)\mu\left[\frac{3}{5}K_\mu + \frac{3}{80}K_\mu^2 - K_\lambda\left(\frac{9}{40}K_\mu + \frac{1}{35}K_\mu^2\right)\right]\right.$$
$$\left. + \frac{21}{80}K_\mu^2 - K_\lambda\left(\frac{3}{40}K_\mu + \frac{2}{35}K_\mu^2\right)\right]\Bigg\} \qquad (9)$$

onde, $K_\mu = \frac{(\mu_P - \mu)}{(\mu_P + 2\mu)}$ e $K_\lambda = \frac{(\lambda_P - \lambda)}{(\lambda_P + 2\lambda)}$, sendo μ a permeabilidade magnética do colóide, μ_P a permeabilidade magnética do material da partícula, λ e λ_P as condutividades térmicas do líquido carreador e da partícula respectivamente. Considerando a partir de agora o campo magnético uniforme e os seguintes casos, temos:

(i) Caso paralelo $(\vec{H} // \vec{\nabla}\mu)$

Quando o campo magnético é aplicado paralelo ao gradiente de permeabilidade magnética, obtém-se:

$$\vec{u}_m = -\frac{\mu_0 d^2 H}{18\eta}\vec{\nabla}\mu\frac{12}{5}K_\mu f_1 \quad (10) \quad f_1 = f_1\left(K_\mu, K_\lambda\right) = 1 - \frac{3}{32}K_\mu - \frac{K_\lambda}{16}\left(1 - \frac{4}{21}K_\mu\right)$$

(ii) caso transversal $(\vec{H} \perp \vec{\nabla}\mu)$

enquanto que para o caso em que o campo está orientado transversalmente ao gradiente da permeabilidade magnética, temos:

$$\vec{u}_m = +\frac{\mu_0 d^2 H}{18\eta}\vec{\nabla}\mu\frac{6}{5}K_\mu f_2 \qquad (11)$$

$$f_2 = f_2\left(K_\mu, K_\lambda\right) = 1 - \frac{7}{32}K_\mu - \frac{K_\lambda}{16}\left(1 - \frac{16}{21}K_\mu\right)$$

Vale ressaltar que $\vec{\nabla}\mu$ é orientado na mesma direção do $\vec{\nabla}T$. Considerando agora uma dimensão, segue pela equação de Maxwell $\vec{\nabla}\cdot\vec{B} = 0$, que:

$$H^2\frac{d\mu}{dx} = \frac{\mu H}{1 + \frac{\partial M}{\partial H}}\left(\frac{\partial M}{\partial\varphi}\frac{\partial\varphi}{\partial x} + \frac{\partial M}{\partial T}\frac{\partial T}{\partial x}\right) \qquad (12)$$

e assumindo que o fluido pode ser descrito pela equação de Langevin [9]

$$M = \varphi M_P L(\xi)$$

$$L(\xi) = \coth \xi - \frac{1}{\xi}$$

$$\xi = \frac{\mu_0 M_P V_P H}{k_B T} \tag{13}$$

Para $\varphi << 1$, o fluxo de massa pode ser escrito como:

$$J_x = -\rho_\rho \left(D^i \frac{d\varphi}{dx} + \frac{D_0 \alpha_T^i}{T} \frac{dT}{dx} \varphi \right) \tag{14}$$

$$\alpha_T = \alpha_0 + \alpha_m$$

onde α_T é o coeficiente de Soret efetivo, α_0 é o coeficiente de Soret não magnético, α_m o coeficiente de Soret magnético e D é o coeficiente de translação efetiva.

Para o caso (i)

$$D^P = D_0 \left(1 + \frac{12}{5} K_\mu A f_1 \right) \tag{15}$$

$$\alpha_m^P = \frac{12}{5} K_\mu A f_1 \frac{1}{M} \frac{\partial M}{\partial T} \tag{16}$$

Enquanto que para o caso (ii)

$$D^t = D_0 \left(1 - \frac{6}{5} K_\mu A f_2 \right) \tag{17}$$

$$\alpha_m^t = -\frac{6}{5} K_\mu A f_2 \frac{1}{M} \frac{\partial M}{\partial T} \tag{18}$$

Onde,

$$A = \frac{\mu \varphi \xi L(\xi)}{1 + \frac{\varphi M_P}{H} \xi L'(\xi)} \tag{19}$$

Note que a parte magnética da difusão termal α_m depende mutuamente da orientação de $\vec{B}$ e $\vec{\nabla} T$ como mostram as curvas experimentais da Fig. 3 [6].

Note que para

(1) $\vec{B}$ paralelo a $\vec{\nabla} T$:

$$\alpha_m^P = \frac{12}{5} K_\mu A f_1 \frac{1}{M} \frac{\partial M}{\partial T} \tag{20}$$

(2) $\vec{B}$ transversal a $\vec{\nabla} T$:

$$\alpha_m^t = \frac{6}{5} K_\mu A f_2 \frac{1}{M} \frac{\partial M}{\partial T} \tag{21}$$

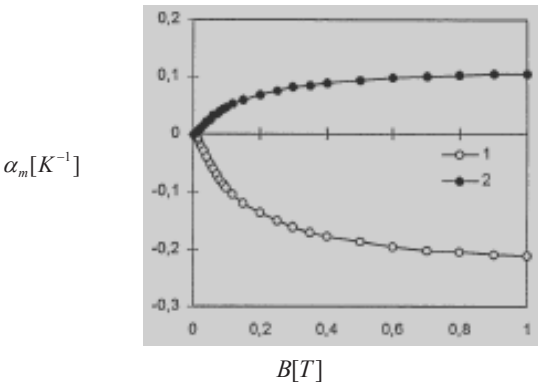


Fig. 3 A parte termomagnética do coeficiente de Soret em função do campo magnético para os casos $\vec{B} // \vec{\nabla} T$ (1) e $\vec{B} \perp \vec{\nabla} T$ (2).

Logo se $\vec{B} // \vec{\nabla} T$ o $\alpha_m < 0$, enquanto que para $\vec{B} \perp \vec{\nabla} T$ o $\alpha_m > 0$. Portanto se uma determinada nanopartícula possui $\alpha_0 > 0$, tem-se a campo nulo uma partícula termofóbica e se $\alpha_0 < 0$ a partícula será termofílica. Ao aplicarmos campo magnético na amostra, acima de um valor crítico uma amostra que se comporta termofobicamente poderá se comportar de modo termofílico e o recíproco é verdadeiro. É devido a essa característica que este efeito se torna tão importante, pois aplicando o campo magnético e criando um gradiente de temperatura de maneira adequada pode-se controlar os magnetolipossomas, consequentemente carrear fármacos para posição desejada que é a principal motivação do nosso trabalho.

IV. Montagem Experimental

Para a captação da imagem do magnetolipossoma foi desenvolvido um aparato instrumental que consiste em um eletromagneto, onde o campo é gerado, e uma câmera CCD (web câmera) acoplada a um microscópio óptico, na qual as imagens são registradas (vide Fig. 4 e Fig.5).

Em uma montagem como esta procura- -se minimizar ao máximo os erros experimentais. A câmera deve ficar fixada de maneira tal que todas as imagens sejam obtidas exatamente na mesma região. A amostra fica em um recipiente não magnético, onde o fluido magnético é sujeito a um gradiente de campo magnético.

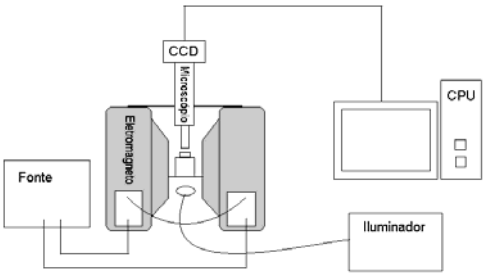


Fig. 4 Diagrama de bloco da montagem experimental. O arranjo consiste em um eletromagneto, uma câmera CCD acoplada a um computador e um iluminador. O sistema de lentes acoplado é necessário nos experimentos realizados com magnetolipossomas.



Fig. 5 Imagem real do aparato experimental.

O gradiente de campo foi constatado por meio de medidas do campo com o auxílio de um teslâmetro, em diferentes regiões. (Vide Fig. 6)

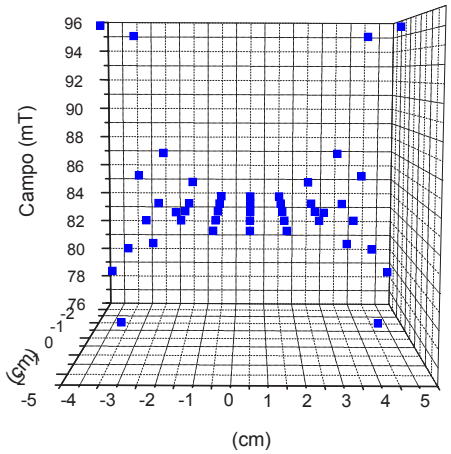


Fig. 6 Na região quadrada de dois centímetros que envolvem o centro, o campo é aproximadamente uniforme, portanto os experimentos foram realizados fora dessa região.

Para estudar os efeitos termodifusivos, foi necessário desenvolver um porta-amostra diferenciado. No qual um cooler induz uma corrente de ar aquecida por um resistor a passar rente ao local onde fica a amostra, provocando um gradiente de temperatura na mesma, o qual é medido através de dois termopares (vide Fig.7 e 8).

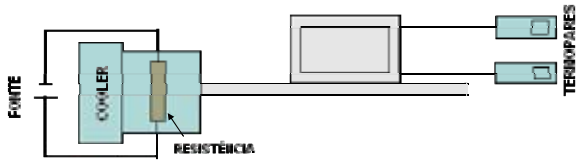


Fig. 7 Diagrama de um porta-amostra, no qual um gradiente de temperatura é gerado através do aquecimento de um dos lados do recipiente de vidro, onde se encontra a amostra.

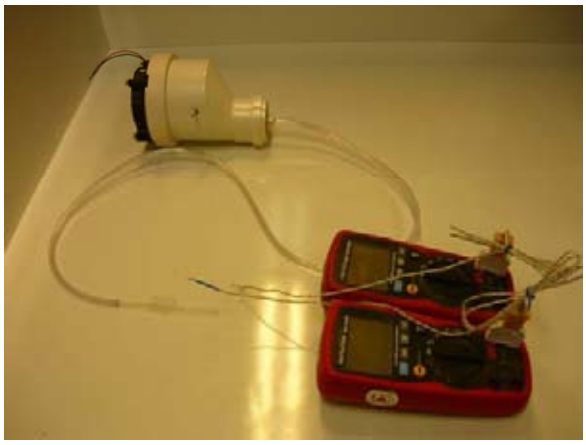


Fig. 8 Imagem real do porta-amostra.

V. Resultados experimentais

V-A Magnetoforese de lipossomas magnéticos gigantes

A Fig.9 mostra magnetolipossomas gigantes movendo sob a ação de um gradiente de campo magnético, conhecido na literatura como efeito magnetoforético.

Utilizando as equações (1), (2), (3), (4) e (5), encontramos o número de nanopartículas dentro de cada magnetolipossoma:

$$n = \frac{36\eta R U_m}{\frac{dB}{dz} M_s \langle D^3 \rangle} \qquad (22)$$

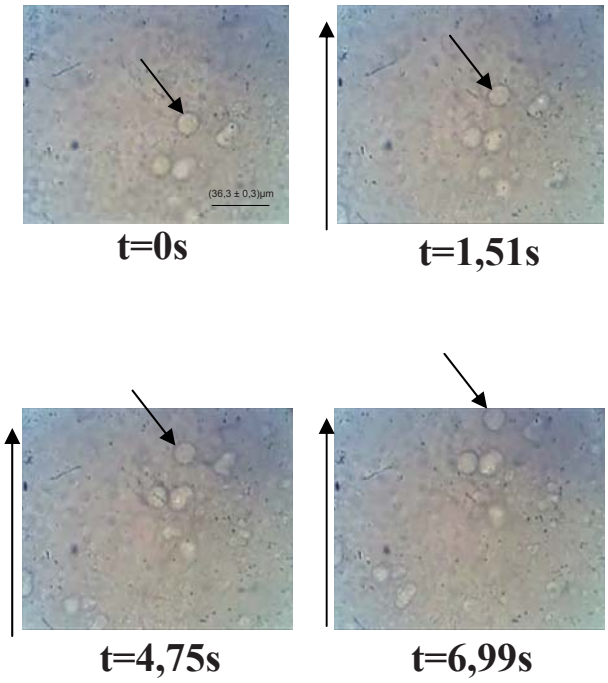


Fig. 9 A figura para $t = 0$ mostra a imagem dos magnetolipossomas na ausência de campo e as outras figuras mostram essas estruturas sob um campo magnético. Note que a seta a esquerda indica a direção do gradiente de campo magnético.

Obtendo a velocidade magnetoforética através das imagens foi possível obter um $n = (2{,}6 \pm 0{,}6)x10^5$ nanopartículas por lipossoma. Conhecendo este resultado, o volume médio das nanopartículas e o volume médio dos magnetolipossomas, encontramos para o sistema uma fração volumétrica de $\phi = \frac{V_p}{V_l} = \frac{n\langle D^3 \rangle}{8R^3} = 0{,}02\%$.

Sendo V_P o volume total de nanopartículas encapsuladas, V_l e R o volume e o raio do magnetolipossoma respectivamente.

V-B Magnetotermodifusão

Devido um atraso na construção do porta-amostra não foi possível obter resultados experimentais satisfatórios de magnetotermodifusão.

VII. Conclusão

Neste trabalho, investigou-se o efeito de magnetoforese em magnetolipossomas gigantes. A determinação da velocidade magnetoforética combinada com os dados do gradiente de campo permitiu que calculássemos o

número de nanopartículas encapsuladas nestas vesículas. Estudou-se a teoria referente a magneto-termodifusão. Portanto por dificuldades encontradas na construção do aparato instrumental não foi possível ainda obter resultados satisfatórios de tais medidas.

VIII. Agradecimentos

Ao Dr. Leandro Martin Socolovsky pelos dados de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e ao Laboratório Nacional de Luz Síncontron (LNLS) onde foram realizadas tais medidas. Ao Juracy L. Santos Junior pela ajuda na montagem experimental. Ao Gustavo Campos, Luís Branquinho, Thiago Amaral e Ediron Lima pelo auxílio em algumas questões técnicas. À Fabrícia S. Ferreira da FF-UFG, ao Thiago Melo do IQ-UFG, à Dra. Patrícia Satoratto do IQ-UFG e à Dra. Eliana M. Lima da FF-UFG pelas amostras de magnetolipossomas. À FUNAPE, à FINEP, ao Instituto de Física e ao CNPq pelo apoio financeiro. E ao Professor Dr. Andris Figueroa Bakuzis pelas orientações recebidas.

IX. Referências

[1] Marie-Sophie Martina, Jean-Paul Fortin, Christine Ménager, Oliver Clément, Gillian Barratt, Cécile Grabielle-Madelmont, Florence Gazeau, Valérie Cabuil and Sylviane Lesieur, **Generation of Superparamagnetic Liposomes revealed as Highly Efficient MRI Contrast Agents for in Vivo Imaging**. J. AM. CHEM. SOC. 127 , 10676-10685 (2005).

[2] A. Ito, H. Honda, T.Kobayashi, **Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a movel concept of "heat-controlled necrosis" with heat stock protein expression**, Cancer Immunol. Immunother. 55 ,320 (2006).

[3] Rajesh Patel, R V Upadhyay and R V Mehta**, Microscopic observation of magnetodeformational effects in magnetic nanocomposite micelles,** J. Phys.: Condens. Matter 20 (2008) 204116.

[4] C. Wilhelm, F. Gazeau and J. C. **Bacri, Magnetophoresis and ferromagnetic resonance of magnetically**, Eur Biophys J: (2002) 31: 118-125.

[5] S. Alves, G. Demouchy, A. Bee, D. Talbot, A. Bourdon and A. M. Figueiredo Neto**, Investigation of the sign of the Soret coefficient in different ionic and surfacted magnetic colloids using forced Rayleigh scattering and single-beam Z-scam techiniques**, Philosophical Magazine: 83 (2003) 17-18: 2059-2066.

[6] Elmars Blums, Stefan Odenbach, Ansis Mezulis and Michail Maiorov, **Soret coefficient of nanoparticles in ferrofluids in the presence of a magnetic field,** Phys. Fluids: Vol. 10, No. 9, September 1998.

[7] E. R. Cintra, F. S. Ferreira, J. L. Santos Junior, J. C. Campello, L. M. Socolovsky, E. M. Lima and A. F. Bakuzis**, Nanoparticle agglomerates in magnetolipossomes**, Nanotecnology 20 (2009) 045103.

[8] C. Ludwig, Sitzungber, Akad Wiss, Wien 20, 539 (1856); **C. Soret**, Arch. Sci. Phys. Nat. Geneva 2, 48 (1879).

[9] R.E.Rosensweig, **Ferrohydrodynamics,** Cambridge Universiry Press, Cambridge, England, (1985).

Identificação de compostos fenólicos em frutas do cerrado por voltametria cíclica

Letícia Oliveira Alves[a], Andréa Fernandes Arruda [a,*]
[a]*Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970, Brasil*
E-mail: arruda@quimica.ufg.br

Palavras-chave: Buriti, mangaba, guapeva, voltametria cíclica

1. INTRODUÇÃO

Os músculos esqueléticos geram continuamente diversos intermediários metabólicos de baixo peso molecular, difusíveis e derivados da redução monoeletrônica do oxigênio. Esses intermediários são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs) e incluem um amplo espectro de espécies radicalares, como o superóxido ($O_2^{-\bullet}$) e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (TEWS et al., 1998). Todas essas espécies exibem atividade redox, podendo influenciar processos intracelulares importantes (SMOLKA et al., 2000).

As células são equipadas com vários sistemas de defesa, caracterizados em proteção via atividade enzimática e proteção não enzimático, este último é constituído principalmente pelos antioxidantes de baixo peso molecular (ABPM), que desativam diretamente as EROs. Os ABPMs estão presentes nos organismos em números e concentração muito maior que os antioxidantes enzimáticos (HALLIWELL et al., 1998).

Estudos clínicos e epidemiológicos oferecem evidências que antioxidantes fenólicos (figura 1) presentes em cereais, frutas ou verduras são o principal fator de contribuição para a redução significante da incidência de doenças crônicas e degenerativas presentes na população, cuja dieta é rica no consumo destes alimentos (XING et al.,1996).

Recentemente, devido ás restrições colocadas ao uso de antioxidantes sintéticos como o BHA (2- e 3-terc-butil-4-metoxifenol) e o BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol), cresceu o interesse por antioxidantes de origem natural. Muitas indústrias cosméticas, farmacêuticas e alimentícias usam-nos na formulação dos seus produtos, porque além de possuírem valor medicinal, previnem o envelhecimento e degradação dos produtos (AMES B. N., 1983; BRANEN A. L. J., 1975; BRIANTE et al., 2003).

Os dois grupos principais que constituem os compostos fenólicos são os ácidos fenólicos e os flavonóides. Os ácidos fenólicos dividem-se em derivados do ácido benzóico (ex.: ácido gálico) e derivados do ácido cinâmico (ex.: ácido cafeico, ácido clorogénico) (BRETT et al., 2003; BLASCO et al., 2005). A rutina (quercetina-3-*o* -rutinose) é um dos flavonóides mais bioativos e já descrito como um fator ativador para a vitamina C (GHICA et al., 2005).

Diversas metodologias têm sido propostas para a determinação da capacidade antioxidante total de amostras de plasma, fluidos corpóreos e extratos de plantas (JAYAPRAKASHA et al., 2000; CAO et al., 1998; JANASZEWSKA et al., 2002; WANG et al., 1996). Atualmente um dos métodos mais utilizados é o teste espectrofotométrico usando o radical livre *difenilpicrilhidrazil* (DPPH 517 nm) como substrato. A habilidade antioxidante de compostos orgânicos pode ser obtida pela medida da facilidade de sua reação com o DPPH, produzindo sua forma reduzida DPPH-H (BONDED et al., 1997).

A voltametria cíclica tem sido utilizada como uma ferramenta instrumental para a avaliação da capacidade antioxidante total dos ABPMs em diversas amostras (CHEVION et al., 1997; CHEVION et al., 1999; CHEVION et al., 1999). Como a técnica estuda a transferência de elétrons entre moléculas e eletrodos e uma vez que os ABPM podem agir doando elétrons diretamente às EROs, a avaliação do potencial de oxidação de uma amostra pode refletir sua capacidade antioxidante.

Algumas das frutas do cerrado são vendidas no mercado regional e tem pouco valor comercial no Brasil. Considerando que uma dieta rica em antioxidantes pode ser uma atitude preventiva de doenças, a investigação da capacidade antioxidante destas frutas, não só vem contribuir para o conhecimento potencial das frutas como fonte de antioxidantes, mas também para ampliar o incentivo de seu consumo. Portanto, o interesse em investigar o potencial antioxidante das frutas do cerrado e a sensitividade, a seletividade e os processos de oxidação e redução da eletroanalítica despertaram a proposta do presente trabalho.

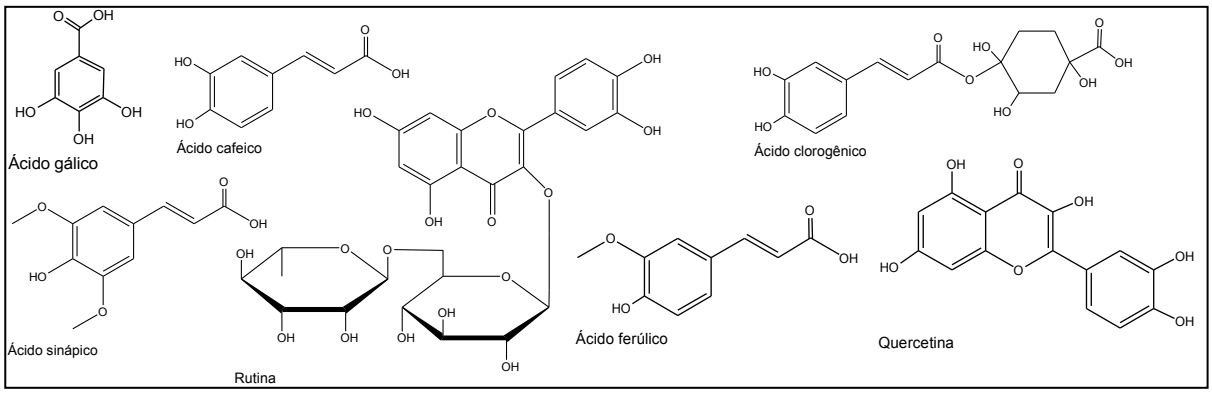


Figura 1. Estrutura química de antioxidantes fenólicos.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho buscamos: investigar a presença de compostos fenólicos nos extratos de mangaba, guapeva e buriti (frutas comumente encontradas no cerrado da região Centro-Oeste do Brasil) por voltametria cíclica; Avaliar o perfil voltamétrico de compostos antioxidantes padrões em condições ótimas e a capacidade antioxidante dos extratos pelo teste com DPPH; e por fim, caracterizar os extratos das frutas pela comparação dos resultados das análises voltamétricas dos compostos padrões e dados obtidos pelo teste com DPPH.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

K_2HPO_4 (Mallinckrodt, Alemanha), KH_2PO_4 (Cinética Química, Brasil) foram utilizados como eletrólito de suporte. Compostos padrões de ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido sinápico, ácido ferrúlico, ácido lipóico, rutina, 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (Sigma-Aldrich) e butil-hidróxi-tolueno (BHT) (Carlo Erba) foram utilizados. Os solventes para extração líquida foram acetato de etila P.A. 99,95% (Belga Química), acetona P.A. 99,5% (Chemco), etanol absoluto P.A. (ISOFAR, Brasil) e hexano P.A. (Dinâmica, Brasil). Álcool metílico P.A. (Quimex). Toda água utilizada no preparo das soluções foi deionizada em sistema milli-Q (Milli-Pore, USA).

3.2. Extração por solvente

Para o processo de extração, foram pesadas aproximadamente 50 g da fruta buriti (*Mauritia vinifera* Mart), madura, contendo casca e polpa. Extrações sucessivas da fruta com aparelho Ultra Turrax T25 (Quimis) foram realizadas utilizando solventes de diferentes polaridades, com duração de cerca de 1 hora cada processo. Os solventes utilizados foram hexano, acetato de etila, acetona, etanol e etanol/água (1:1).

Amostra de mangaba madura contendo casca, polpa e semente (*Hancornia speciosa Gomez*) e polpa da guapeva (*Pouteria spp.*) foram liofilizadas obtendo-se 31,29 g e 102,52 g das frutas secas respectivamente. Extrações sucessivas das frutas com aparelho Ultra Turrax foram realizadas utilizando como solventes: hexano, acetato de etila, acetona, etanol, etanol:água (1:1) e água. Após a etapa de extração os solventes foram rota-evaporados. Os extratos que continham água foram congelados, liofilizados, pesados e armazenados em refrigerador para posterior análise.

3.3. Análise voltamétrica

3.3.1. Equipamento

Todas as análises foram realizadas utilizando analisador voltamétrico METROHM 663 VA Stand (IQ/UFG), conectado pela interface Autolab Type III com programa General Purpose Electrochemical System (GPES) Eco Chemie B.V. O equipamento possui sistema de três eletrodos. Os três eletrodos compreendem eletrodo de trabalho, eletrodo de referência Ag/AgCl, com fio de prata imerso em solução saturada de KCl com potencial fixo em -45mV, e eletrodo auxiliar constituído por um bastão de 10 cm de grafite.

3.3.2. Medida voltamétrica

Eletrodo de carbono vítreo - ECV (Metrohm, Suíça) e Eletrodo de pasta de carbono - EPC (eletrodo de latão preenchido com pasta formada pela mistura de grafite em pó e nujol), foram imersos em eletrólito de suporte, tampão fostato pH = 7,4, na célula eletrolítica para obtenção dos sinais eletroquímicos dos padrões e dos extratos. Após o uso do eletrodo de carbono vítreo sua superfície foi polida com

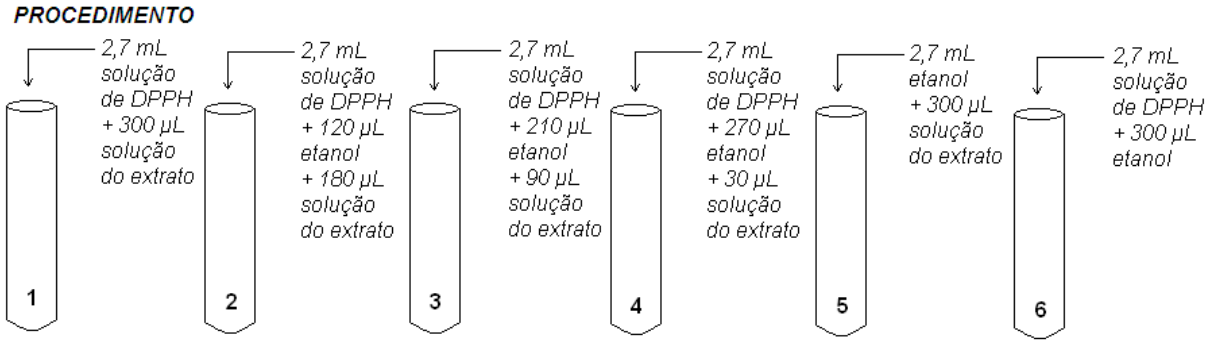
alumina e enxaguada com água. O eletrodo de pasta de carbono teve sua superfície renovada a cada medida voltamétrica.

As análises foram feitas por voltametria cíclica normal (VC) utilizando velocidade de varredura de 10 $mV.s^{-1}$.

3.4. Determinação da atividade antioxidante por teste espectrofotométrico

O ensaio in vitro com o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) é convencionalmente utilizado para avaliar a capacidade de antioxidantes naturais de remover radicais livres (BONDED et al., 1997).

O teste foi realizado misturando diferentes concentrações do extrato com solução de DPPH (40 µg/mL) para um volume final de 3 mL.



Cada tubo foi mantido em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente e protegido contra a luz. O procedimento foi realizado com todos os extratos e os padrões BHT, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido sinápico, rutina e ácido lipóico. O controle foi preparado como descrito acima sem adição de extrato ou padrão. Após repouso, cada solução foi transferida para uma cubeta de quartzo para medida de absorbância no espectrofotômetro com radiação em λ = 515 nm. Etanol foi utilizado para correção da linha base. A habilidade do composto padrão ou extrato de reduzir a absorbância do DPPH a 515 nm foi determinada pelo percentual de atividade antioxidante (%AA), calculado usando a seguinte expressão:

$$\%AA = \{[\ Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})\ ]/\ Abs_{controle}\} \times 100$$

Sendo $Abs_{controle}$ a absorbância da solução de DPPH, $Abs_{amostra}$ a absorbância do DPPH contendo a solução do extrato e Abs_{branco} a absorbância do extrato em

etanol. As concentrações finais das amostras (extratos ou padrões) na cubeta permitem determinar, por meio da regressão linear, os valores de IC_{50} definidos como a concentração final da amostra na cubeta (µg/mL) necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%. Curvas de calibração com solução de DPPH foram construídas para verificar sua faixa linear de absorbância em 515 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Rendimento dos Extratos

A tabela 1 apresenta o rendimento das extrações sucessivas das frutas com diferentes solventes.

O hexano foi usado para extração de compostos como gordura ou alguns carotenóides, já o acetato de etila foi usado para extração de alguns compostos fenólicos e carotenóides. Os outros solventes foram usados para extração de compostos polares. O extrato aquoso do *buriti* ofereceu maior rendimento, enquanto o etanólico foi o de menor rendimento. Já para a *mangaba* o extrato de etanol foi o que apresentou maior rendimento. Para a *guapeva* o maior rendimento foi do extrato de etanol : água (1:1). Estes resultados sugerem compostos diferentes presentes nas diferentes frutas. Sendo promissora a idéia de diversidade de antioxidantes nas frutas do cerrado.

Tabela 1. Rendimento percentual dos extratos

Fruta	Solvente usado para extração	Rendimento (g/100g de fruta)
Buriti	hexano	1,76
	acetato de etila	3,21
	acetona	5,06
	etanol	0,87
	etanol : água (1:1)	2,14
	água	6,12
Mangaba	hexano	15,88
	acetato de etila	5,30
	acetona	2,24
	etanol	28,83
	etanol : água (1:1)	26,94
	água	4,72
Guapeva	hexano	3,05
	acetato de etila	1,61
	acetona	2,93
	etanol	9,40
	etanol : água (1:1)	47,01
	água	8,21

4.2. Perfil voltamétrico dos padrões

O comportamento voltamétrico de ácidos fenólicos, que contém ligações redutíveis ou substituintes oxidáveis nos anéis aromáticos foi investigado com o intuito de relacionar estas características com seu caráter antioxidante. Como primeira etapa, foi realizado um estudo do perfil voltamétrico de cada composto utilizando ECV e EPC como eletrodos de trabalho. Ácidos cafeico, clorogênico, ferrúlico, sinápico e lipóico apresentaram típicos voltamogramas utilizando ECV. Rutina, ácidos cafeico, clorogênico, ferrúlico, sinápico e lipóico ofereceram ondas voltamétricas no EPC.

A figura 2 mostra, os perfis cíclicos dos antioxidantes padrões: ácido ferrúlico, rutina, ácido sinápico, ácido lipóico, ácido cafeico e ácido clorogênico, nas condições de análise (eletrodo de trabalho, eletrólito suporte e velocidade de varredura) que ofereceram melhor sinal.

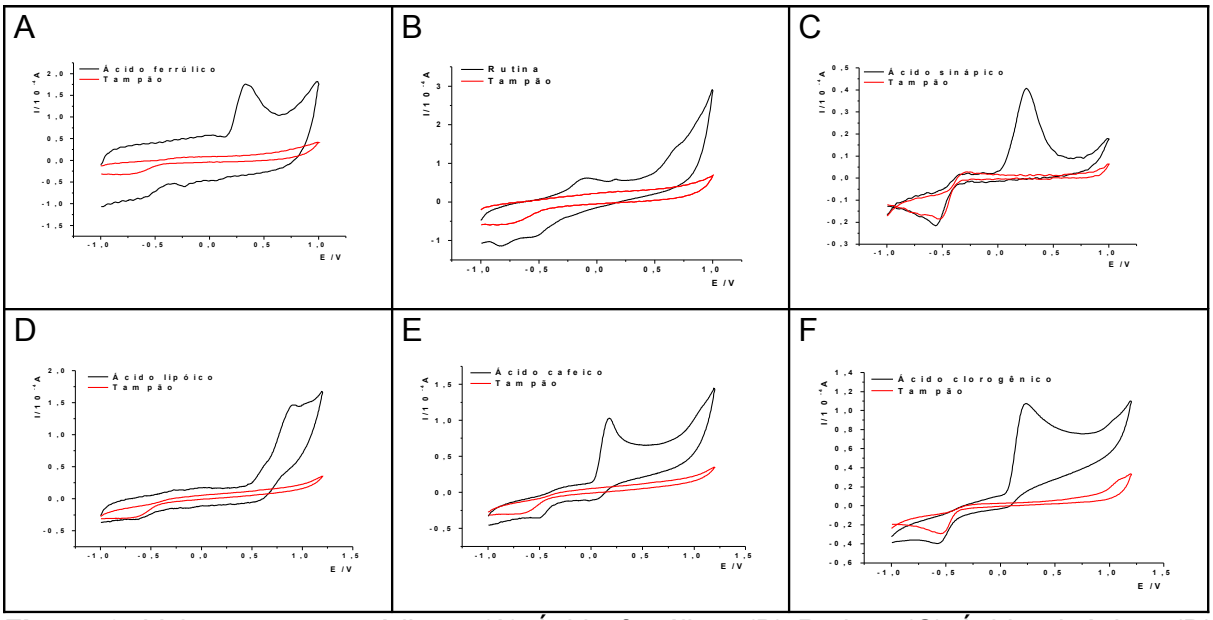


Figura 2. Voltamogramas cíclicos: (A) Ácido ferrúlico; (B) Rutina; (C) Ácido sinápico; (D) Ácido lipóico; (E) Ácido cafeico; (F) Ácido clorogênico. (Utilizando EPC, velocidade de varredura 10 $mV.s^{-1}$ e tampão fosfato pH = 7,4).

4.3. Características Voltamétricas dos Extratos

Buscando avaliar o perfil de oxidação e redução de cada extrato das frutas, curvas voltamétricas foram obtidas usando eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de pasta de carbono como eletrodos de trabalho em faixas de potenciais adequadas.

As análises foram feitas por voltametria cíclica normal (VC), todas nas mesmas condições ótimas para os compostos padrões de conhecida atividade antioxidante.

As características voltamétricas dos extratos das três frutas investigadas mostraram perfis de oxidação/redução bastante diferentes para cada extrato. A maioria dos picos voltamétricos observados para os extratos, foram obtidos no eletrodo de pasta de carbono. A tabela 2 mostra os potenciais dos picos anódicos (E_{pa}) obtidos nas análises dos extratos por VC e indicação de compostos padrões que possuem pico(s) voltamétricos idênticos.

Alguns picos se mostraram bastante largos, como os picos dos extratos de etanol:água (1:1) da *mangaba* e da *guapeva*, os quais sugerem a presença de vários compostos no extrato com potenciais de pico que se sobrepõem. Sendo necessário posterior fracionamento dos extratos. O mesmo pode ser dito para os extratos de acetato de etila e acetona do *buriti*.

Tabela 2. Características voltamétricas dos extratos de frutas

Extrato	E_{pa}/V	Composto padrão	E_{pa}/V	Eletrodo
Buriti				
Acetona	-0,27/0,16/0,50	Ác. cafeico	0,16	EPC
Acetato de etila	0,55			EPC
Etanol	0,43			EPC
Etanol	0,71/1,03	Ác. lipóico	1,03	EPC
Etanol:água	-0,14/0,71			EPC
Água	-0,22			EPC
Mangaba				
Acetona	-0,13;0,16;0,68	Rutina	-0,11;0,16;0,68	EPC
Etanol	0,16	Ác. cafeico	0,16	EPC
Etanol	0,15	Ác. cafeico	0,15	ECV
Etanol:água	0,23/0,70	Ác. clorogênico	0,23	EPC
Guapeva				
Acetona	0,08			EPC
Etanol	0,11			EPC
Etanol:água	0,11			EPC
Etanol:água	0,21	Ác. sinápico	0,21	EPC

E_{pa} = potencial de pico anódico

4.4. Identificação de Compostos Presentes nos Extratos

As figuras de 3 a 5 mostram a comparação dos perfis voltamétricos de cada extrato de fruta com os perfis de compostos padrões que possuem sobreposição de

picos. Os compostos padrões foram adicionados aos extratos e analisados nas mesmas condições experimentais.

O voltamograma cíclico do extrato acetônico do buriti apresentou três ondas anódicas, onde o segundo pico anódico corresponde ao ácido cafeico (fig. 3A). A figura 3B mostra ondas anódicas com potenciais de pico em 710 mV e 1030 mV para o extrato de etanólico do buriti. Uma sobreposição com o segundo pico anódico sugere a presença de ácido lipóico.

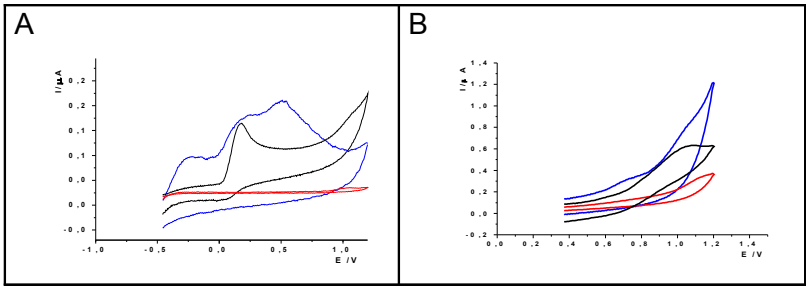


Figura 3. Voltamogramas cíclicos do *Buriti*: A - (__) extrato acetônico e (__) padrão de ácido cafeico; B - (__) extrato etanólico e (__) padrão de ácido lipóico, todos em (__) tampão fosfato pH = 7,4.

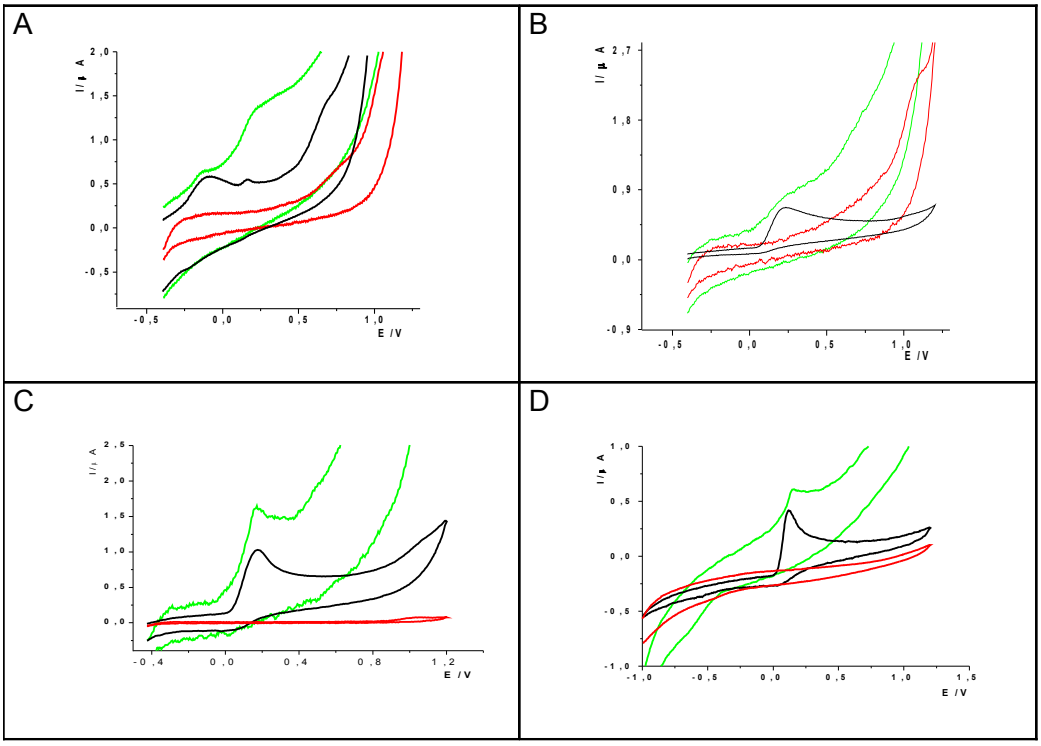


Figura 4. Voltamogramas cíclicos da *Mangaba*: A - (__) extrato acetônico e (__) padrão de rutina; B - (__) extrato etanol:água (1:1) e (__) padrão de ácido clorogênico; C (em EPC) e D (em ECV) - (__) extrato etanólico (__) padrão de ácido cafeico, todos em (__) tampão fosfato pH = 7,4.

Três picos anódicos foram observados para o extrato acetônico da mangaba, em –130 mV, 160 mV e 680 mV, os quais sobrepõem aos picos anódicos observados na rutina (figura 4A). A figura 4B mostra uma onda anódica com potencial de pico em 230 mV para o extrato etanol:água (1:1) da mangaba. O pico sugere a presença de ácido clorogênico. No voltamograma cíclico do extrato etanólico da mangaba existe um pico anódico com potencal 160 mV que corresponde ao ácido cafeico (fig. 4C). A identificação do composto no extrato pode ser confirmada pela mesma sobreposição ao se utilizar o eletrodo de carbono vítreo. Pois, tanto o padrão de ácido cafeico como o extrato da fruta possuem E_{pa} = 150 mV (fig. 4D).

Ao analizar o extrato etanol:água (1:1) da guapeva, foi possível ainda observar a presença de ácido sinápico pelo perfil do voltamograva irreversível e sobreposição do potencial de pico anódico em 210 mV (fig. 5).

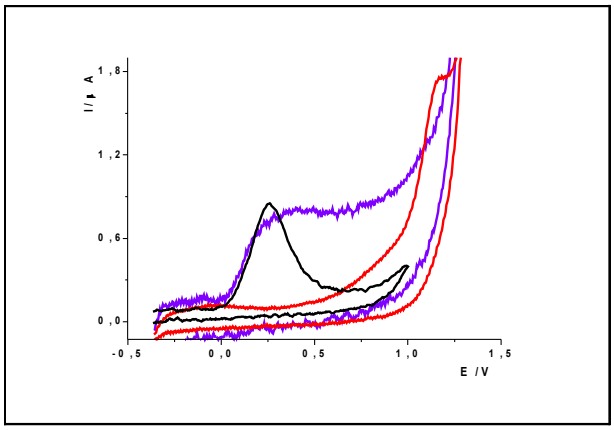


Figura 5. Voltamograma cíclico: (__) extrato etanol:água (1:1) da *Guapeva* e (__) padrão de ácido sinápico, em (__) tampão fosfato pH = 7,4.

Algumas ondas anódicas presentes nos VC dos extratos, ainda não foram possíveis de serem identificadas e assim assinalam outros compostos ou classe de compostos a serem investigadas futuramente.

Considerando que, quanto menor o potencial redutor maior a capacidade antioxidante total do extrato investigado, o extrato acetônico do buriti mostrou alto "poder" antioxidante.

4.5. Avaliação da Atividade Retiradora de radicais pelo Teste de DPPH

Com o intuito de avaliar a voltametria como ferramenta de estudo da capacidade antioxidante, os resultados obtidos foram comparados com um teste colorimétrico, que mede a habilidade de compostos orgânicos reduzir o radical livre difenilpicrilhidrazila (DPPH). Os ensaios foram realizados buscando verificar as propriedades antioxidantes de cada extrato das frutas investigadas. Os resultados evidenciaram o poder retirador de radicais livres pelos extratos das frutas. Os valores de IC_{50} encontrados para os extratos e para antioxidantes padrões estão mostrados na tabela 3.

Tabela 3. Atividade de inibição dos extratos das frutas e de antioxidantes padrões ao radical livre (DPPH)[a]

	IC_{50} (µg/mL) EXTRATOS					
	Hexano	Acetato de etila	Acetona	Etanol	Etanol:água (1:1)	Água
Buriti	875,3	934,1	304,6	869,7	365,7	1460,7
Mangaba	---	912,6	728,7	401,1	768,2	1321,3
Guapeva	---	---	479,0	449,4	329,0	336,0
	IC_{50} (µg/mL) PADRÕES					
BHT	25,5					
Acido ascórbico	3,9					
Acido cafeico	3,4					
Acido clorogênico	7,7					
Ácido sinápico	5,4					
Rutina	109,2					
Ácido lipóico	4,6					

[a] Atividade retiradora radicalar definida como IC_{50}, concentração final da amostra na cubeta (expressa em µg/mL) necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%

O comportamento cinético da reação do DPPH na concentração de 40 µg/mL foi obtido com cada extrato ou padrões. As curvas de dose-resposta relativas ao decréscimo da porcentagem remanescente de DPPH em função do tempo (min) apresentaram cinética relativamente rápida, atingindo praticamente o máximo de consumo do DPPH nos primeiros minutos, com uma porcentagem de DPPH remanescente menor que 50%. Os dados contidos na tabela 3 são relativos a 30 minutos de reação, que assegurou reação completa após este período de tempo.

Extratos das três frutas apresentaram atividade antioxidante. Os resultados obtidos confirmam a capacidade antioxidante observada pelos estudos

voltamétricos. Um exemplo é a atividade antioxidante do extrato de etanol da *mangaba* que apresentou um pico anódico irreversível bem definido e de boa intensidade, identificado como o ácido cafeico. Estes dados confirmam o valor de IC_{50} de 401,1 µg/mL obtido a partir do teste colorimétrico da atividade antioxidante.

Para os extratos de acetona e de etanol:água (1:1) do *buriti* também foi observado boa atividade antioxidante com valores de IC_{50} iguais a 304,6 µg/mL e 365,7 µg/mL respectivamente, o que confirma os resultados obtidos nas medidas voltamétricas. A presença de vários picos voltamétricos nestes extratos, alguns bastante largos e com boa intensidade indica grande quantidade de composto(s) antioxidante(s). Estas características e o baixo potencial de oxidação apresentado estão de acordo com os bons valores de atividade antioxidante obtidos nos testes de DPPH.

Outro extrato que confirma os resultados obtidos nas análises voltamétricas, é o de etanol:água (1:1) da *guapeva*, que possui o menor IC_{50} quando comparado com os demais extratos desta fruta. A alta atividade antioxidante determinada é explicada pela presença de um pico anódico largo, devido à mistura de compostos antioxidantes, presentes neste extrato, com picos sobrepostos.

Na maioria dos extratos os baixos valores de IC_{50} obtidos correlacionam com: alta intensidade e quantidade de picos observados. Considerando que, todo estudo foi feito utilizando extratos brutos das frutas, futuras purificações destes podem tornar ainda menores os valores de IC_{50}.

5. CONCLUSÕES

Os estudos mostraram que os extratos do buriti, mangaba e guapeva, frutas do cerrado brasileiro, possuem antioxidantes naturais. Também evidenciaram o potencial da VC para avaliar esta atividade, a partir da forma do voltamograma e do potencial de oxidação das espécies presentes. A faixa de sensitividade obtida na análise voltamétrica permitiu identificação de compostos de baixo peso molecular com características antioxidantes relevantes. Uma correlação positiva entre os dados voltamétricos e os valores de IC_{50} dos extratos foi evidenciada.

Considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos, os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antio-

xidante de substâncias isoladas destas frutas. A partir de separações e caracterização dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante observada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

TEWS, D. S.; GOEBEL, H. H. Cell death and oxidative damage in inflammatory myopathies. **Clinical Immunology Immunopathology**, San Diego, EUA, v. 87, ed. 3, p. 240-247, jun. 1998.

SMOLKA, M. B.; ZOPPI, C. C.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; MACEDO, D.V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **American journal of physiology**. Regulatory, integrative and comparative physiology, Bethesda, EUA, v. 279, ed. 5, p. R1539-R1545, nov. 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2a ed. Oxford, Inglaterra: Oxford University Press, cap. 3, 1998.

XING, Y.; WHITE, P.J. Antioxidants from cereals and legumes. **Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects, and Applications**. Champaign, EUA: editor Shahidi, F. Cap. 3, p. 25-55, 1996.

AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens – oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**. Washington, EUA, v. 221, ed. 4617, p. 1256-1264, 1983.

BRANEN, A. L. J. Synthesis of long-chain alkyl glyceryl ethers from triglycerides using boron-trifluoride etherate and lithium aluminum-hydride. **Journal of the American Oil Chemists Society**. Champaign, EUA, v. 52, ed. 10, p. 427-429, 1975.

BRIANTE, R.; FEBBRAIO, F.; NUCCI, R. J. Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the Mediterranean diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, EUA, v. 51, ed. 24, p. 6975-6981, nov. 2003.

BRETT, A. M. O.; GHICA, M. E. Electrochemical oxidation of quercetin. **Electroanalysis.** Weinheim, Alemanha, v. 15, ed. 22, p. 1745-1750, nov. 2003.

BLASCO, A. J.; ROGELIO, M. C.; GONZÁLEZ, M. C.; Escarpa, A. “Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods: A proposal. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdã, Holanda, v. 539, ed. 1-2, p. 237-244, maio 2005.

GHICA, M. E.; BRETT, A. M. O. Electrochemical oxidation of rutin. **Electroanalysis,** Weinheim, Alemanha, v. 17, ed. 4, p.313-318, mar. 2005.

JAYAPRAKASHA, F. K.; RAO, L.J. Phenolic constituents from the lichen Parmotrema stuppeum (Nyl.) Zeitschrift fur naturforschung C-A **Journal of biosciences**, Tubingen, Alemanha, v. 55, ed. 11-12, p. 1018-1022, nov-dez 2000.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, Washington, EUA, v. 44, ed. 6, p. 1309-1315, jun. 1998.

JANASZEWSKA, A.; BARTOSZ, G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, Oslo, Noruega, v. 62, ed. 3, p. 231-236, 2002.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 44, ed. 3, p. 701-705, mar. 1996.

BONDED, V.; WILLIAMS, B.W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using DPPH* free radical methods. **Food Science and Technology-L-W & T**, Londres, Inglaterra, v. 30, ed, 6, p. 609-615, 1997.

CHEVION, S.; HOFMANN, M.; CHEVION, M.; NAWROTH, P. P. The antioxidant properties of thioctic acid: Characterization by cyclic voltammetry. **Biochemistry and Molecular Biology International**, Austrália, v. 41, ed. 2, p. 317-327, fev. 1997.

CHEVION, S.; OR, R.; BERRY, E. M. The antioxidant status of patients subjected to total body irradiation. **Biochemistry and Molecular Biology International**, Filadélfia, EUA, v. 47, ed. 6, p. 1019-1027, jun. 1999.

CHEVION, S.; CHEVION, M.; CHOCK, P. B.; BEECHER, G. R. Antioxidant capacity of edible plants: extraction protocol and direct evaluation by cyclic voltammetry. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, EUA, v. 2, p. 1-11, 1999.

Aplicações da Teoria Fuzzy e dos Sistemas P- Fuzzy

Thais B. Damacena, M. T. Mizukoshi,
E-mail:thaisdamacena@hotmail.com, mtuyako@gmail.com

Resumo: Neste projeto, estudamos o modelo presa-predador de Holling-Tanner no contexto fuzzy, utilizando para isso as teorias de subconjunto fuzzy e de sistemas p-fuzzy.

Palavras-chave: Holling-Tanner; Teoria Fuzzy; Sistema p-fuzzy

1 Introdução

A Teoria dos Conjuntos Fuzzy foi introduzida em 1965 pelo matemático Lotfi Asker Zadeh com a principal intenção de dar um tratamento matemático a certos termos lingüísticos subjetivos, como "aproximadamente" , "em torno de" , dentre outros. Esse seria um primeiro passo no sentido de se programar e armazenar conceitos vagos em computadores, tornando possível a produção de cálculos com informações imprecisas.

Para entendermos que alguns modelos, de particular interesse o modelo de Holling-Tanner, necessitam de uma análise no contexto fuzzy, primeiramente foi necessário um estudo da teoria de equações dentro do contexto determinístico [8]. Após o estudo nota-se que as soluções mudam de comportamento quando ocorrem pequenas variações dos parâmetros, ou seja, se eles não forem obtidos com um certo nível de precisão para o estudo de um modelo real eles poderão dar resultados diferentes conforme os valores obtidos na coleta de dados. Neste caso, existem duas aproximações para o modelo. O primeiro utiliza-se da teoria estocástica, porém os pré-requisitos estatísticos necessários para esta aproximação podem dificultar o estudo (veja, mais detalhes em [16]).

A segunda aproximação considera a teoria fuzzy. Pode-se estudar um modelo através das equações diferenciais fuzzy, considerando resultados de estabilidade para modelos discretos ou contínuos (veja, [14, 15]) ou através dos sistemas p-fuzzy, onde obtém-se os resultados através de regras envolvendo as variações das populações das espécies a serem analisadas.

Nas seção 2 são apresentados as principais definições e resultados envolvendo a teoria fuzzy e os sistemas p-fuzzy. Finalmente, na seção 3 foram feitas simulações computacionais utilizando o software Matlab para concluirmos a análise do modelo.

2 Conceitos Básicos

2.1 Teoria dos Conjuntos Fuzzy

Seja U um conjunto (clássico) universo.

Definição 1. *Um subconjunto fuzzy F de U é caracterizado por um função*

$$\varphi_F : U \longrightarrow [0, 1],$$

pré-fixada, chamada função de pertinência do subconjunto fuzzy F.

O valor de $\varphi_F(x) \in [0,1]$ indica o grau com que o elemento x de U está no conjunto fuzzy F, com $\varphi_F(x) = 0$ e $\varphi_F(x) = 1$ indicando, respectivamente, a não pertinência e a pertinência completa de x ao conjunto fuzzy F.

A escolha de qual função deve ser adotada para representar um conjunto fuzzy depende de fatores que estão relacionados com o contexto do problema a ser estudado.

O subconjunto clássico de U definido por

$$suppF = \{x \in U : \varphi_F(x) > 0\}$$

é denominado suporte de F e tem papel fundamental na interrelação entre as teorias de conjuntos clássica e fuzzy.

Sejam A e B dois subconjuntos fuzzy de U, com funções de pertinência indicadas por φ_A e φ_B, respectivamente. Dizemos que A é subconjunto fuzzy de B, e escrevemos $A \subset B$, se $\varphi_A(x) \leq \varphi_B(x)$ para todo $x \in U$.

Note que o conjunto vazio ($\emptyset$) tem função de pertinência $\varphi_\emptyset(x) = 0$, enquanto que o conjunto universo (U) tem função de pertinência $\varphi_U(x) = 1$, para todo $x \in U$. Assim podemos dizer que $\emptyset \subset A$ e que $A \subset U$ para todo A.

Definição 2 (União)**.** *A união entre A e B é o subconjunto fuzzy de U cuja função de pertinência é dada por*

$$\varphi_{(A \cup B)}(x) = \max_{x \in U}\{\varphi_A(x), \varphi_B(x)\}$$

Definição 3 (Intersecção)**.** *A intersecção entre A e B é o subconjunto fuzzy de U cuja função de pertinência é dada por:*

$$\varphi_{(A \cap B)}(x) = \min_{x \in U}\{\varphi_A(x), \varphi_B(x)\}$$

Definição 4 (Complementar de subconjuntos fuzzy)**.** *O complementar de A é o subconjunto fuzzy A' de U cuja função de pertinência é dada por:*

$$\varphi_{A'}(x) = 1 - \varphi_A(x), \ x \in U.$$

Um subconjunto fuzzy A de U é formado por elementos de U com uma certa hierarquia (ordem) que é traduzida através da classificação por graus. Um elemento x de U está em uma classe se seu grau de pertinência é maior que um determinado valor limiar ou nível $\alpha \in [0,1]$ que define aquela classe. O conjunto clássico de tais elementos é um α-nível de A, denotado por $[A]^\alpha$.

Definição 5 (α-nível)**.** *Seja A um subconjunto fuzzy de U e $\alpha \in [0,1]$. O α-nível de A é o subconjunto clássico de U definido por:*

$$[A]^\alpha = \{x \in U : \varphi_A(x) \geq \alpha\} \ para \ 0 < \alpha \leq 1.$$

A seguir, defini-se número fuzzy.

Definição 6 (Número fuzzy)**.** *Um subconjunto fuzzy A é chamado de número fuzzy quando o conjunto universo no qual φ_A está definida, é o conjunto dos números reais $\mathbb{R}$ e satisfaz às seguintes condições:*

1. *todos os α-níveis de A são não vazios, com $0 \leq \alpha \leq 1$;*
2. *todos os α-níveis de A são intervalos fechados de $\mathbb{R}$;*
3. *supp $A = \{ \ x \in \mathbb{R} : \varphi_A(x) > 0 \ \}$ é limitado.*

Vamos denotar os α-níveis do números fuzzy A por

$$[A]^{\alpha} = [\alpha_1^{\alpha}, \alpha_2^{\alpha}].$$

Os números fuzzy mais comuns são os triangulares, trapezoidais e os em forma de sino.

Definição 7. *Um número fuzzy A é dito triangular se sua função de pertinência é da forma*

$$\varphi_A(x) = \begin{cases} 0 & se \quad x \leq a \\ \frac{x-a}{u-a} & se \quad a < x \leq u \\ \frac{x-b}{u-b} & se \quad u \leq x < b \\ 0 & se \quad x \geq b \end{cases}$$

Definição 8. *Um número fuzzy A é dito trapezoidal se sua função de pertinência tem a forma de um trapézio e é dada por*

$$\varphi_A(x) = \begin{cases} \frac{x-a}{b-a} & se \quad a \leq x < b \\ 1 & se \quad b \leq x \leq c \\ \frac{d-x}{d-c} & se \quad c < x \leq d \\ 0 & caso\ contrario \end{cases}$$

Definição 9. *Um número fuzzy tem forma de sino se a função de pertinência for suave e simétrica em relação a um número real.*

A seguinte função de pertinência tem estas propriedades para u, a e δ dados

$$\varphi_A(x) = \begin{cases} \exp\left(\frac{-(x-u)^2}{a}\right) & se \quad u - \delta \leq x \leq u + \delta \\ 0 & caso\ contrario \end{cases}$$

2.1.1 Sistemas baseados em regras fuzzy

Sistemas baseados em regras fuzzy consistem basicamente de três estágios: um estágio de entrada - fuzificador, um estágio de processamento, composto por uma base de regras fuzzy e um método de inferência e um estágio de saída - defuzificador.

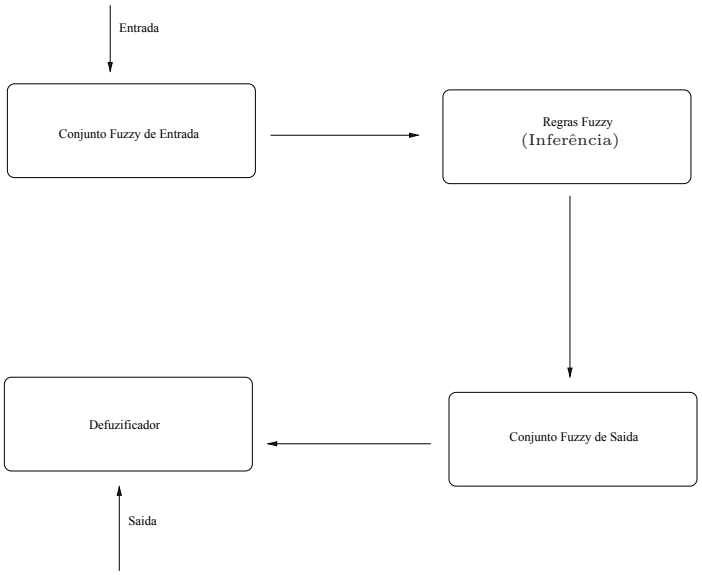


Figura 1: Esquema de um sistema baseado em regras fuzzy

Supondo que $\mathbb{R}^n$ é o universo de discurso, então dado $x_0 \in \mathbb{R}^n$ o fuzificador transforma x_0 em um conjunto fuzzy, $\hat{x_0} \in F(\mathbb{R}^n)$. Normalmente isto pode ser feito simplesmente tomando $\hat{x_0}$ como a imagem da função característica de x_0, isto é, a imagem de:

$$\hat{x_0}(a) = \begin{cases} 1 & \text{se} \quad a = x_0 \\ 0 & \text{se} \quad a \neq x_0 \end{cases}$$

O estágio de processamento é o núcleo do controlador fuzzy. Cada regra da base de regras é uma sentença do tipo;

Se "Condição" Então "Ação"

Normalmente estas sentenças são ligadas por conectivos: E, OU e NÃO. O método de inferência traduz estas regras matematicamente, por meio de t-norma e t-conormas, gerando para cada regra uma saída. A combinação destas saídas gera uma saída fuzzy do sistema, $\hat{x_0} \in F(\mathbb{R}^n)$.

O método de inferência mais utilizado é o MAX-MIN, onde adota-se a t-norma $\wedge$ (mínimo) para modelar o conectivo E e a t-conorma $\vee$ (máximo) para agregar as regras fuzzy da base de regras. Normalmente sistemas do tipo Mamdani usam o MAX-MIN como t-nomas e t-conormas.

A defuzificação é um processo de escolha de um elemento $y \in supp(\hat{y})$ tal que y seja capaz de representar o conjunto fuzzy $\hat{y}$. Existem vários métodos de defuzzificação descritos na literatura, o mais utilizado é o centro de gravidade.

2.2 Sistema p-fuzzy

Um sistema p-fuzzy em $\mathbb{R}^n$ é um sistema dinâmico discreto,

$$x_{k+1} = F(x_k) \tag{1}$$

onde a função F é dada por $F(x_k) = x_k + \Delta(x_k)$, a condição inicial $x_0 \in \mathbb{R}^n$, é dada, e a variação $\Delta(x_k) \in \mathbb{R}^n$ é obtida por meio de um sistema baseado em regras fuzzy. Nesse estudo usamos o método de inferência de Mamdani, ou seja, trabalhamos com sistemas baseados em regras fuzzy do tipo Mamdani.

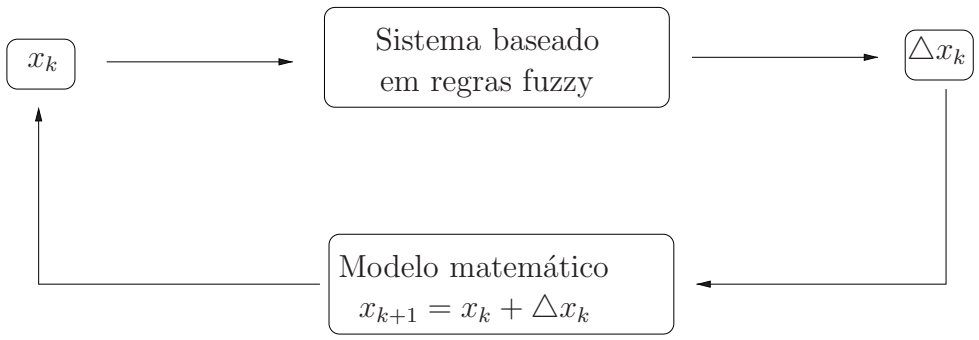


Figura 2: Arquitetura de um sistema p-fuzzy unidimensional

2.2.1 Sistema p-fuzzy unidimensional

Definição 10. *Dado um sistema p-fuzzy unidimensional,*

$$\begin{cases} x_{k+1} = F(x_k), \\ x_0, \qquad x_k \in \mathbb{R} \end{cases} \tag{2}$$

$F(x_k) = x_k + \Delta(x_k)$, *dizemos que* x^* *é um ponto de equilíbrio de* (2) *se* $F(x^*) = x^* \iff \Delta(x^*) = 0$.

Definição 11. *Seja* $\{A_i\}_{1\leq i\leq k}$ *uma família finita de subconjuntos fuzzy normais associados a uma variável linguística x. Dizemos que* $\{A_i\}_{1\leq i\leq k}$ *é uma família de subconjuntos fuzzy sucessivos se,*

1. $supp(A_i) \cap supp(A_{i+1}) \neq \emptyset$ *para cada* $1 \leq i < k$;
2. $\bigcap_{j=i,i+2} supp(A_j)$ *possui no máximo um elemento para cada* $1 \leq i < k-1$;
3. $\bigcup_{i=1,k} supp(A_i) = U$, *onde U é o domínio da variável linguística x;*
4. *dados* $z_1 \in supp(A_i)$ *e* $z_2 \in supp(A_{i+1})$, *se* $A_i(z_1) = 1$ *e* $A_{i+1}(z_2) = 1$ *tem-se* $z_1 < z_2$ *para cada* $1 \leq i < k$.

Definição 12. *Consideremos o sistema p-fuzzy* (2) *e uma família de subconjuntos fuzzy sucessivos* $\{A_i\}_{1\leq i\leq k}$. *Se para algum* $1 \leq i < k$, z_1, $z_2 \in supp(A_i \cup A_{i+1})$, Δz_1 *e* Δz_2 *possuem sinais contrários, então o subconjunto dado por:* $supp(A^*)$, $A^* = A_i \cap A_{i+1}$, *é denominado* ***conjunto viável de equilíbrio*** *do sistema p-fuzzy* (2).

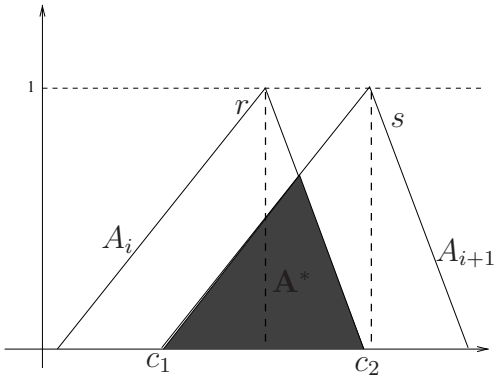


Figura 3: Região viável de equilíbrio para o sistema p-fuzzy unidimensional

A seguir enunciaremos os teoremas que garantem a existência e a unicidade do ponto de equilíbrio num sistema p-fuzzy unidimensional.

Teorema 2.2.1 (Existência)**.** *Seja S um sistema p-fuzzy (r,s)→ (g,f) e* $supp(A^*) \neq \emptyset$ *um conjunto viável de equilíbrio de S. Então,* $supp(A^*)$ *possui ao menos um ponto de equilíbrio. Isto é,* $\exists\ x^* \in supp(A^*)$ *tal que* $\Delta(x^*) = 0$.

Teorema 2.2.2 (Unicidade)**.** *Seja S um sistema p-fuzzy (r,s)→ (g,f) e* $supp(A^*) \neq \emptyset$ *um conjunto viável de equilíbrio de S. Se as funções r e s são monótonas por partes e* A^* *é tal que* $c_1 \geq z_1$ *e* $c_2 \leq z_2$ *então, existe um único ponto de equilíbrio em* $supp(A^*)$.

Exemplo : *Epidemiologia*

O estudo de uma epidemia é fundamental para compreender sua evolução, estabilidade e controle. Os modelos mais simples são aqueles em que a população é dividida em apenas dois compartimentos: S - sucetíveis e I - infecciosos.

Modelo SI: Consiste de uma doença na qual o indivíduo , ao recuperar-se, obtém imunidade. O diagrama compartimentalizado do modelo SI é dado na figura 3, onde β é o coeficiente de transmissão da doença.

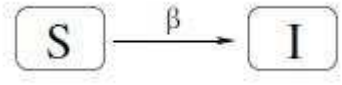


Figura 4: Diagrama compartimental do modelo SI

O sistema de equações que descreve este modelo, normalizado, é dado por:

$$\begin{cases} \frac{dS}{dt} = -\beta SI \\ \frac{dI}{dt} = \beta SI \\ I(0) = I_0 \end{cases} \tag{3}$$

onde $S + I = 1$ e I_0 é dado.
Dada uma condição inicial (S_0, I_0) a solução analítica deste modelo é:

$$\begin{cases} S(t) = 1 - I(t) \\ I(t) = \frac{I_0 e^{\beta t}}{S_0 + I_0 e^{\beta t}} \quad , t \geq 0 \end{cases} \tag{4}$$

Os pontos de equilíbrios deste modelo são $(0, 1)$ e $(1, 0)$, sendo que $(0, 1)$ é instável e $(1, 0)$ é assintoticamente estável.

Assim tem-se o seguinte modelo SI p-fuzzy:
•variável de entrada I, cujas funções de pertinências são dadas na Figura 4;
•variável de saída VI, com funções de pertinências dadas na Figura 5;
•Base de regras:

1. Se I é Baixo Então VI é Baixa
2. Se I é Médio baixo Então VI é Média baixa
3. Se I é Médio alto Então VI é Média baixa
4. Se I é Média Então VI é Alta
5. Se I é Alto Então VI é Baixo

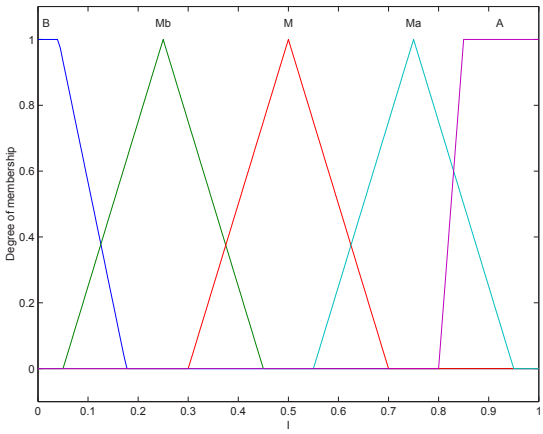


Figura 5: Variável de Entrada I

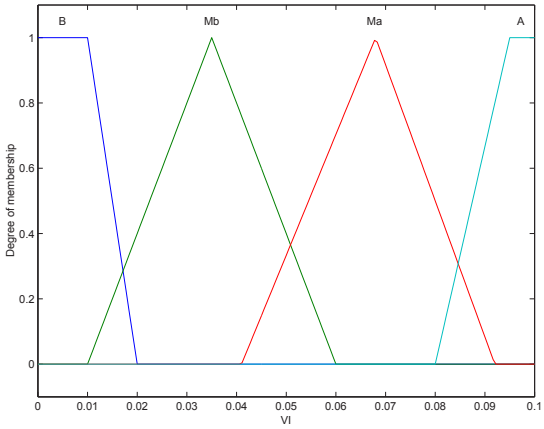


Figura 6: Variável de Saída VI

Implementando no Matlab através de um algoritmo que associa as funções de pertinência inseridas no toolbox fuzzy, obtém-se as soluções do modelo p-fuzzy vistas na Figura 6. Observamos que as curvas obtidas são semelhantes com as soluções do modelo SI clássico, ou seja, o modelo interpretado no contexto fuzzy mantém as característica existentes nos modelos determinísticos e além disso apresenta algumas características que o tornam mais realístico [9].

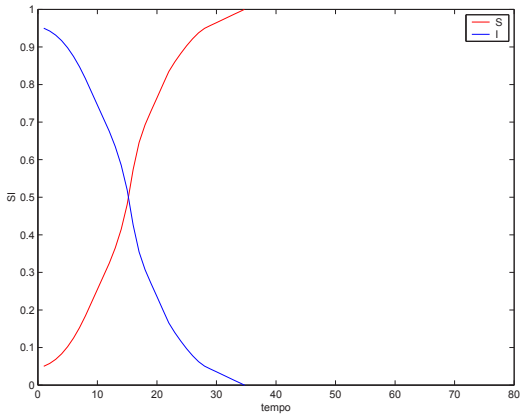


Figura 7: Solução do modelo SI p-fuzzy

No modelo SI determinístico o ponto estável é $(1, 0)$. Observe que o valor 1 é máximo do domínio da variável fuzzy I. Então, não é possível utilizar um conjunto viável de equilíbrio, cujo número 1 seja ponto de equilíbrio deste conjunto. Assim, como a estabilidade é assintótica, fixamos $VI = 0$ quando tivermos $I > 1$, o que forçará a convergência para I.

2.2.2 Sistema p-fuzzy bidimensional

Sejam x e y variáveis de estado, um sistema dinâmico p-fuzzy bidimensional é um sistema de equações de diferenças, dado por:

$$\begin{cases} x_{n+1} = x_n + \Delta_1(x_n, y_n) \\ y_{n+1} = y_n + \Delta_2(x_n, y_n) \end{cases} \tag{5}$$

onde $(x_0, y_0) \in \mathbb{R}^2$ é a condição inicial e $\Delta(x_n, y_n) = (\Delta_1(x_n, y_n), \Delta_2(x_n, y_n))$ é obtido por meio de um sistema baseado em regras fuzzy. O sistema (5), pode ser escrito como,

$$\begin{cases} x_{n+1} = F(x_n, y_n), \\ y_{n+1} = G(x_n, y_n) \end{cases} \tag{6}$$

onde $F(x_n, y_n) = x_n + \Delta_1(x_n, y_n)$ e $G(x_n, y_n) = y_n + \Delta_2(x_n, y_n)$.
Dizemos que um par (x^*, y^*) é um ponto de equilíbrio de (6) se,

$$\begin{cases} x_{n+1} = F(x_n, y_n) \\ y_{n+1} = G(x_n, y_n) \end{cases} \Leftrightarrow \begin{cases} \Delta_1(x^*, y^*) = 0 \\ \Delta_2(x^*, y^*) = 0 \end{cases}$$

Definição 13. *Sejam $\{A_i\}_{1 \le i \le k_1}$ e $\{B_i\}_{1 \le j \le k_2}$, famílias de subconjuntos fuzzy, respectivamente sucessivos, associados às variáveis linguísticas x e y, respectivamente. Se $supp(A^*)$ e $supp(B^*)$ são conjuntos viáveis de equilíbrios, então dizemos que $R^* = supp(A^*) \times supp(B^*)$ é uma* ***região viável de equilíbrio*** *para o sistema p-fuzzy (5).*

A seguir enunciaremos os teoremas que garantem a existência e a unicidade do ponto de equilíbrio num sistema p-fuzzy bidimensional

Teorema 2.2.3 (Existência de ponto de equilíbrio)**.** *Seja S um sistema p-fuzzy e R^* uma região viável de equilíbrio de S. Então, R^* possui pelo menos um ponto de equilíbrio, isto é, $\exists$ (x^*, y^*) $\in R^*$ tal que,*

$$\Delta(x*, y^*) = (\Delta_1(x^*, y^*), \Delta_2(x^*, y^*)) = (0, 0)$$

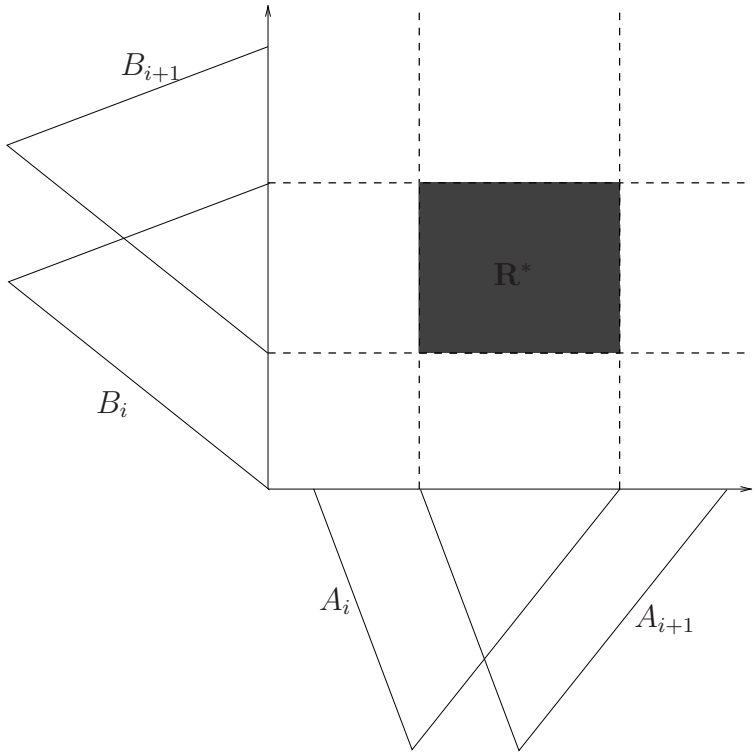


Figura 8: Região viável de equilíbrio para o sistema p-fuzzy bidimensional

Teorema 2.2.4 (Unicidade do ponto de equilíbrio)**.** *Seja $R^* = supp(A^*) \times supp(B^*)$ uma região viável de equilíbrio de um sistema p-fuzzy S. Se S é decomposto em S_1 e S_2 tal que A^* é um conjunto viável de equilíbrio de S_1 e B^* é um conjunto viável de equilíbrio de S_2, então o ponto de equilíbrio $(x^*, y^*) \in \Re^*$ é único se, somente se,*

$$A_1(x^*) = A_2(x^*) = B_1(y^*) = B_2(y^*)$$

2.2.3 Estabilidade de sistemas p-fuzzy bidimensionais

Consideremos um sistema discreto autônomo bidimensional S (6), e sunponhamos que (x^*, y^*) seja um ponto de equilíbrio de S. Então, da teoria clássica de equações de diferenças não lineares sabe-se que a análise de estabilidade de S em (x^*, y^*) depende dos autovalores da matriz jacobiana de S, a qual é dada por:

$$J = \begin{pmatrix} \frac{\partial F}{\partial x}(x^*, y^*) & \frac{\partial F}{\partial y}(x^*, y^*) \\ \frac{\partial G}{\partial x}(x^*, y^*) & \frac{\partial G}{\partial y}(x^*, y^*) \end{pmatrix}. \tag{7}$$

Para determinar a estabilidade de (x^*, y^*) basta encontrar as raízas (autovalores) da equação $det(J - \lambda I) = 0$. Sendo λ_1 e λ_2 estas raízes tem-se: (x^*, y^*) é estável se, e somente se, $|\lambda_1|$, $|\lambda_2| \in (0, 1)$.

Uma outra maneira de testar a estabilidade de (x^*, y^*), sem determinar explicitamente os autovalores, é verificar se: $2 > 1 + det(J) > |tr(J)|$.

3 O modelo Presa-Predador de Holling-Tanner

Nesta seção faremos a simulação do modelo presa-predador de Holling-Tanner no contexto p-fuzzy.

Considere o modelo de Holling-Tanner dado pelo sistema de equações:

$$\begin{cases} \frac{dN}{dt} = N[r(1-\frac{N}{K}) - \frac{kP}{N+D}] \\ \frac{dP}{dt} = P[s(1-\frac{hP}{N})] \end{cases} \tag{8}$$

onde r, K, k, D, s e h são constantes positivas, sendo:

• A taxa de crescimento interespecífica (função densidade - dependência) é a mesma taxa do modelo logístico para uma espécie isolada. Desta forma, o crescimento das presas é inibido, tendo capacidade suporte igual a K na ausência de predadores;

• A taxa de ataque (efeito dos predadores) é crescente em relação à quantidade de presas, aproximando-se de um valor limiar estacionário;

• A capacidade suporte da população de predadores é $\frac{x}{h}$, isto é, P deve ser menor que $\frac{x}{h}$ para que a população de predadores cresça;

• m é o número máximo de presas que podem ser capturadas por um predador em cada unidade de tempo (taxa máxima de predação per capita);

• D é o número de presas necessárias para se atingir metade da taxa máxima m;

• h é uma medida da qualidade alimentícia proporcionada pela presa para conversão em nascimento de predadores.

O sistema (8) assume que a população de presas cresce logisticamente com taxa de crescimento intrínsica r e capacidade suporte K na ausência de predação. A população de predadores cresce com razão intrínseca s e capacidade suporte proporcional ao tamanho da população de presas.

Com estas características podemos propor o seguinte sistema fuzzy:

$$\begin{cases} x(t_{i+1}) = x(t_i) + \frac{1}{2}[x'(t_{i+1}) + x'(t_i)] \\ y(t_{i+1}) = y(t_i) + \frac{1}{2}[y'(t_{i+1}) + y'(t_i)] \end{cases} \tag{9}$$

Temos duas variáveis de entrada - quantidade de presas x e quantidade de predadores y - e duas variáveis de saída - variações das entradas , x' e y' respectivamente.

Com informações obtidas através de coletas e estudo sobre a população é possível classificar cada um dos adjetivos "Baixa, Alta, ..."da variável de entrada x, e a quantidade de predadores encontrados, para classificar analogamente a variável de entrada y.

A fim de exemplo consideremos as seguintes variáveis de entrada (figuras 9 e 10).

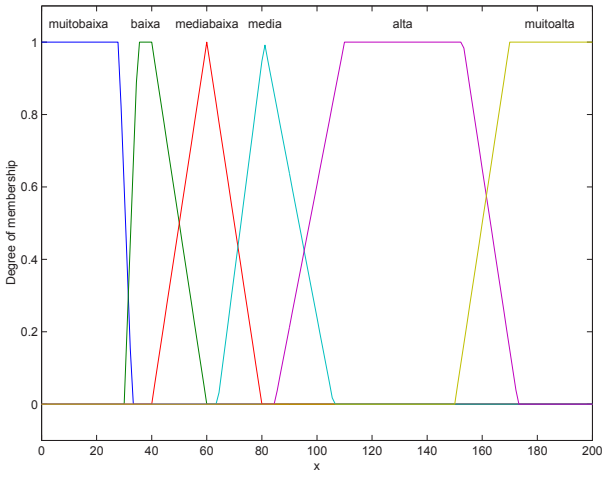


Figura 9: Variável de Entrada x

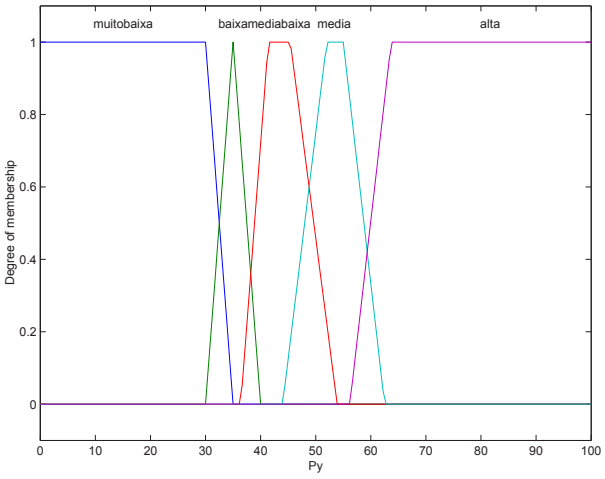


Figura 10: Variável de Entrada y

Já as variáveis de saída x' e y' podem ser modelados através do estudo do ciclo de vida, bem como a interação da população com o meio (figuras 11 e 12).

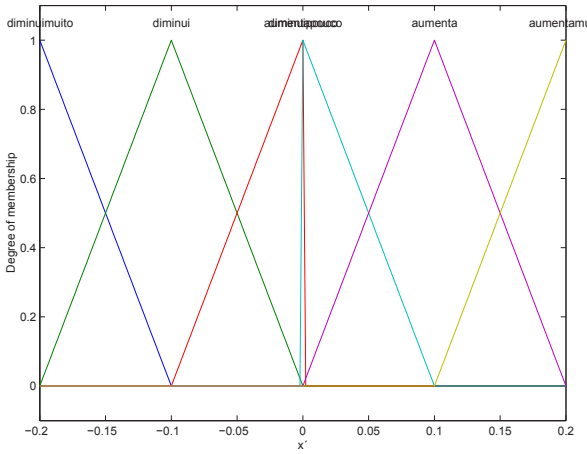


Figura 11: Variável de Saída x'

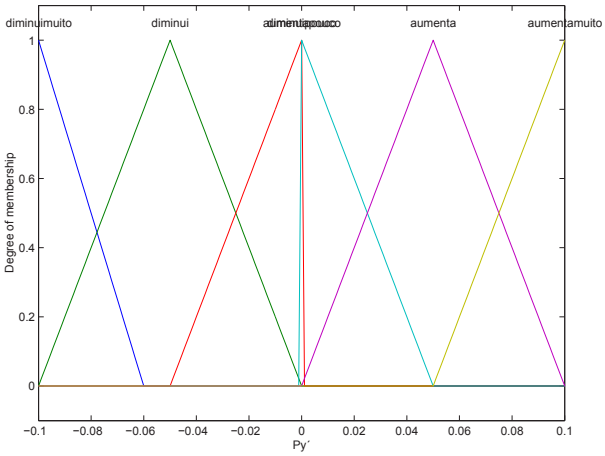


Figura 12: Variável de Saída y'

Assim, a partir de informações qualitativas, dadas por especialistas, é possível propor regras que relacione as variáveis de estado, com suas variações. O que faremos é a substituição das clássicas equações diferenciais por uma base de regras fuzzy para se estudar a evolução do fenômeno. Dessa forma, propomos a seguinte base de regras para contemplar as características desse modelo.

1. Se (x muito baixa) e (y muito baixa) então (x' aumenta muito (+))(y' diminui muito(-))
2. Se (x muito baixa) e (y baixa) então (x' diminui pouco (-))(y' diminui pouco (-))
3. Se (x muito baixa) e (y média baixa) então (x' diminui pouco (-))(y' diminui (-))
4. Se (x muito baixa) e (y média) então (x' diminui pouco (-))(y' diminui (-))
5. Se (x muito baixa) e (y alta) então (x' diminui pouco (-))(y' diminui muito (-))
6. Se (x baixa) e (y muito baixa) então (x' aumenta muito(+))(y' aumenta pouco(+))
7. Se (x baixa) e (y baixa) então (x' aumenta pouco(+))(y' diminui pouco(-)
8. Se (x baixa) e (y média baixa) então (x' diminui pouco(-)(y' diminui(-))
9. Se (x baixa) e (y média) então (x' diminui pouco(-)(y' diminui(-))
10. Se (x baixa) e (y alta) então (x' diminui pouco(-)(y' diminui muito(-))
11. Se (x média baixa) e (y muito baixa) então (x' aumenta(+))(y' aumenta(+))
12. Se (x média baixa) e (y baixa) então (x' aumenta(+))(y' aumenta pouco(+))
13. Se (x média baixa) e (y média baixa) então (x' diminui pouco(-)(y' diminui pouco(-))
14. Se (x média baixa) e (y média) então (x' diminui(-))(y' diminui pouco(-))
15. Se (x média baixa) e (y alta) então (x' diminui pouco(-))(y' diminui(-))
16. Se (x média) e (y muito baixa) então (x' aumenta pouco(+))(y' aumenta muito(+))
17. Se (x média) e (y baixa) então (x' aumenta pouco(+))(y' aumenta(+))
18. Se (x média) e (y média baixa) então (x' aumenta pouco(+))(y' aumenta pouco(+))
19. Se (x média) e (y média) então (x' diminui pouco(-))(y' aumenta pouco(+))
20. Se (x média) e (y alta) então (x' diminui(-))(y' diminui pouco(-))
21. Se (x alta) e (y muito baixa) então (x' aumenta pouco(+))(y' aumenta muito(+))
22. Se (x alta) e (y baixa) então (x' diminui pouco(-))(y' aumenta(+))
23. Se (x alta) e (y média baixa) então (x' aumenta pouco(+))(y' aumenta(+))

24. Se (x alta) e (y média) então (x' diminui pouco(-))(y' aumenta pouco(+))
25. Se (x alta) e (y alta) então (x' diminui muito(-))(y' aumenta(+))
26. Se (x muito alta) e (y muito baixa) então (x' diminui pouco(-))(y' aumenta muito(+))
27. Se (x muito alta) e (y baixa) então (x' diminui pouco(-)(y' aumenta(+))
28. Se (x muito alta) e (y média baixa) então (x' diminui(-))(y' aumenta(+))
29. Se (x muito alta) e (y média) então (x' diminui(-))(y' aumenta(+))
30. Se (x muito alta) e (y alta) então (x' diminui muito(-))(y' aumenta(+))

Utilizando o software Matlab para implementar o algoritmo (Anexo 1), obtemos os gráficos de $x \times t$ e $P \times t$ (Figura 13) e o Plano de Fase (Figura14).

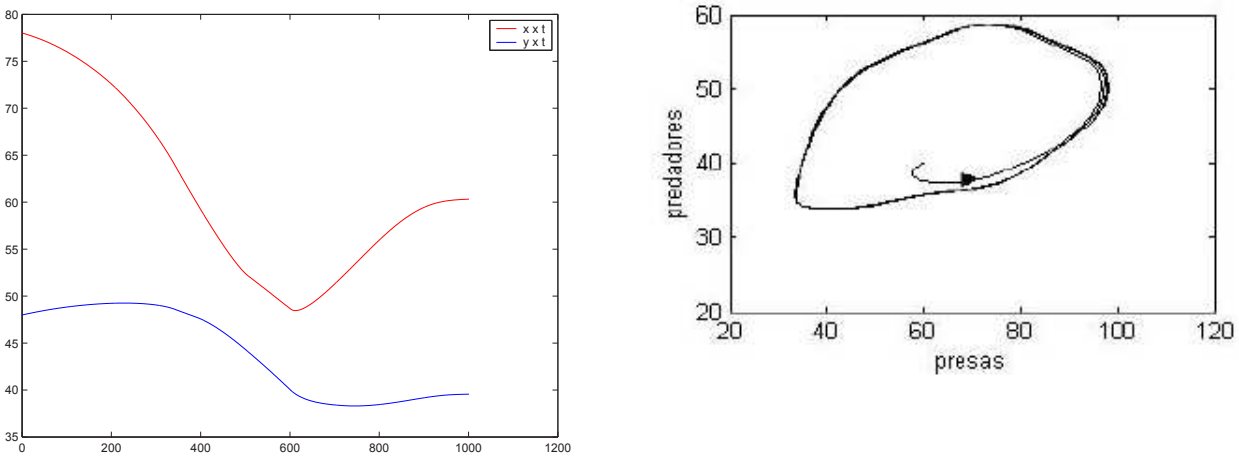


Figura 13: Solução do sistema

Observando a trajetória do modelo p-fuzzy (Figuras 13 e 14) podemos ver que assim como no modelo clássico a solução converge para um ciclo limite. É bem verdade que as soluções obtidas dos sistemas p-fuzzy são aparentemente mais "grosseiras" em comparações com as determinísticas, mas são mais realistas, pois englobam toda a subjetividade descrita por um especialista do fenômeno estudado.

É possível identificar com maior facilidade na Figura 13 que $R^* = [33; 84, 6] \times [35; 56, 2]$ é uma região de equilíbrio do sistema. A identificação e o estudo da estabilidade do ponto de equilíbrio será feito posteriormente.

4 Conclusão

Resaltamos que conseguimos modelar a dinâmica presa-predador sem o uso de equações diferenciais explícitas, utilizando hipóteses naturais da interação entre as espécies envolvidas e o auxílio de especialistas que se faz necessário para compor as funções de pertinência adequadas a cada espécie. Através dessa análise obtemos um plano de fase onde as trajetórias convergem para um ciclo limite, assim como quando feito a simulação no contexto clássico.

A análise pelo contexto fuzzy, é de grande utilidade pois, muitos dos parâmetros das equações diferenciais de sistemas do tipo presa-predador são difícieis de obter e muitas vezes há dificuldade de se analisar tais sistemas. Outra vantagem é que nesse contexto as subjetividades dos dados são levados em conta enquanto no método clássico não é possível considerar tais subjetividades.

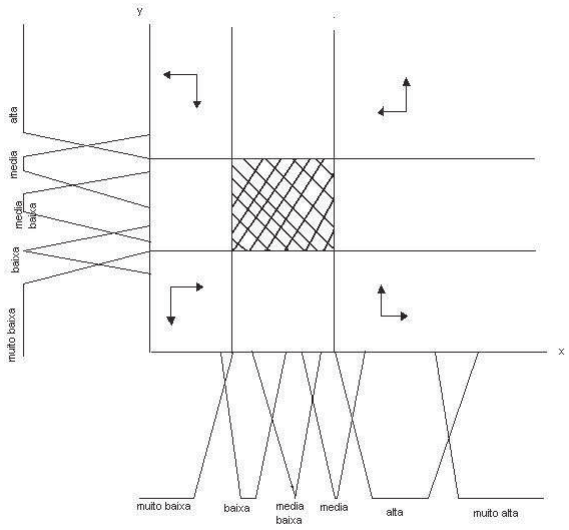


Figura 14: Diagrama de fase do sistema P-fuzzy

Referências

[1] BARROS, L.C. ; BASSANEZI, R.C. Tópicos de Lógica Fuzzy e Biomatemática. UNICAMP. Coleção IMECC-Textos didáticos. v.5. Campinas, SP. 2006.

[2] BARROS, L.C.; RODNEY, C.B.. Introdução à Teoria Fuzzy: Aplicações em Biomatemática. In CONGRESSO LATINO AMERICANO DE BIOMATEMÁTICA. 2001. Campinas.

[3] CUNHA, M.C.C. Métodos Numéricos. Unicamp. Campinas. 2003.

[4] LOPES, Luís Cláudio Oliveira. Utilizando o Scilab na Resolução de Problemas da Engenharia Química. In CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2004, Curitiba.

[5] Peixoto, M.S., Barros, L.C., e Bassanezzi, R.C. Sistemas Dinâmicos e Controladores Fuzzy: um Estudo da Dispersão da Morte Súbita dos Citros em São Paulo. Tese de Doutorado. IMECC-Unicamp. Campinas. 2005.

[6] Robinson, C. Dynamic Systems: stability, symbolic dynamics and chaos. CRC Press LLC. Florida. 1999.

[7] Sotomayor, Jorge. Lições de equações diferenciais ordinárias. IMPA. Projeto Euclides. Rio de Janeiro. 1979.

[8] Damacena, T. B. Teoria Fuzzy e Sistemas P-Fuzzy. Relatório de Iniciação Científica, IME-UFG, Goiânia-GO, 2008.

[9] Silva, J.D.M.da, e Bassanezzi, R.C. Análise de Estabilidade de Sistemas Dinâmicos P-fuzzy com Aplicações em Biomatemática. Tese de Doutorado. IMECC-Unicamp. Campinas. 2005.

[10] Gomide, Fernando, ,PEDRYCZ, Witold, An Introduction to Fuzzy Sets, MIT Press Complex Adaptive Systems, 1998.

[11] Hanselman, Duane, Littlefield, Bruce, Matlab 6 - Curso completo, Prentice Hall, 2003, São Paulo.

[12] Buckley, J.J., Eslami, E., Feuring, T., Fuzzy Mathematics in Economics and Engineering, Physica-Verlag, 2002 .

[13] Bassanezi, R.C., Junior, W.C.F., Equações diferenciais com aplicações, Harboa.

[14] R. C. Bassanezzi, L. C. Barros e P. A. Tonelli, Attractors and asymptotic stability for fuzzy dynamical systems, Fuzzy Sets and Systems, 2000, 113, 473-483.

[15] Mizukoshi, M. T., Barros, L. C. de e Bassanezi, R. C., Stability of Fuzzy Dynamic Systems, International Journal of Uncertainty, Fuzziness and Knowledge-Based Systems, 17(1), 2009.

[16] Krivan, V., Differential Inclusions as a Methodology Tool in Population Biology, Proceedings of the 1995 European Simulation Multiconference, June, 544-547, 1995, San Diego.

Anexo I - Algoritmo para a solução do modelo de Holling-Tanner no contexto fuzzy

```
function presapredador
    clear all
    n =input(' Numero de Iteracoes ? ');
    x0 =input(' Potencialidade Inicial presas ? ');
    y0 =input(' Potencialidade Inicial de Predadores ? ');
    z = 1;
    x(1) = x0;
    y(1) = y0;
    fismat = readfis('thais');
    for i = 1 : n
    z = z + 1;
    if(x(i) <= 0|y(i) <= 0)
    z = z − 1;
    break
    end
    out = evalfis([x(i)y(i)], fismat);
    x(i + 1) = x(i) + out(1);
    y(i + 1) = y(i) + out(2);
    end
    figure(12)
    hold on
    plot(x, y,' − k')
    axis([48 70 36 50])
    hold on
    t = 1 : z;
    figure(13)
    plot(t,x,'-r');
    hold on
    plot(t,y,'-b');
    legend('x x t','y x t')
    x(i)
    y(i) out
```

Turismo Rural

Carolina Pereira de Oliveira Netta, Cátia Regina Assis Almeida Leal
Curso de Educação Física CAJ/UFG
E-mail: catiaassisleal@gmail.com

Palavras-chave: Turismo, Turismo Rural, desenvolvimento do Sudoeste goiano.

INTRODUÇÃO

Leal (2006) pesquisou, no Sudoeste goiano, as ações coletivas e as práticas educativas presentes no processo de modernização agrícola em curso naquela região. Ao finalizá-la me 2006, a autora propôs dar continuidade às suas frentes de pesquisa propondo então para os editais PIBIC 2007-2008 e 2009-2009 pesquisar outras perspectivas de desenvolvimento em curso o Sudoeste do estado de Goiás. Esse artigo é resultado dessa continuidade de pesquisa.

Leal (2006) aponta que a modernização agrícola alterou a lógica de vida dessa região e mudou toda a sua história, alterando a cultura, paisagem, o meio ambiente, a produção, a comercialização, a agroindustrialização entre outros fatores. Nesse sentido os projetos de pesquisa dos editais acima mencionados tiveram dois propósitos, o de oferecer dados e informações sobre o amplo processo desencadeado na região do Sudoeste goiano, e subsidiar pesquisas subjacentes que seriam agregadas pelos pesquisadores envolvidos. Portanto, buscou-se abranger várias dimensões das possíveis perspectivas de desenvolvimento da região do Sudoeste Goiano, em que se propôs desenvolver algumas temáticas. Através de incentivos do Programa Institucional de Iniciação Científica da UFG/CNPq foi possível no edital 2007/2008 investigar dentre as temáticas propostas, uma das perspectivas de desenvolvimento do Sudoeste goiano em foco, tomando como tema de pesquisa: Ecoturismo e turismo rural. Para o edital 2008/2009 também por incentivos do UFG/CNPq, propô-se o tema Turismo rural, cujo presente artigo abordará.

No Brasil a expansão do capitalismo na agricultura tem se dado pela transformação dos proprietários em proprietários capitalistas por meio da política de modernização do latifúndio. Citando um pouco de história, essa situação refletiu no

Sudoeste goiano, fazendo com que da década de 1970 em diante houvesse a passagem de uma economia auto-suficiente para uma economia de mercado, a chamada modernização agrícola. Não se deu somente uma modernização no que se refere às técnicas agrícolas de produção, mas muito mais que isso, pois ao mesmo tempo em que ocorre o processo técnico na agricultura, se modificam as formas de organizações de produção no que diz respeito às relações sociais de produção. Os agricultores de subsistência acabam por dar lugar ao às empresas rurais capitalistas (LEAL, 2006).

A modernização do Sudoeste Goiano deu-se obedecendo aos mesmos padrões das demais regiões do país, especialmente em três municípios pesquisados, Jataí, Rio Verde e Santa Helena de Goiás, municípios pesquisados por Leal (2006). Ela analisou a ação de vários grupos, ou agentes coletivos[1], grupos de pessoas que praticavam ações coletivas para então, compreender quais suas reações em relação ao processo de modernização da agricultura no Sudoeste goiano. Esses agentes visavam à consolidação do processo de modernização agrícola na região, mas os agentes coletivos que portavam de maior capital de investimento permaneciam e dominavam o campo, enquanto que os dominados buscavam formas de contestar essa relação de poder, e uma destas formas eram as ações estratégicas de transformações. Segundo Leal (2006) as estratégias de reprodução dos agentes coletivos no campo da modernização agrícola estão voltadas para ações no âmbito do assistencialismo, da comunicação e da capacitação por meio de programas educativos. Contudo:

> As práticas educativas desencadeadas nas ações coletivas de alguns dos agentes que contestaram esse modelo de desenvolvimento tiveram eficiência mínima, pois conseguiram pouco êxito no campo. A pesquisa apontou que as vozes coletivas que contestaram este modelo de desenvolvimento não ecoaram como possibilidade de transformação desse cenário de desenvolvimento agrícola empreendido no Sudoeste goiano. (LEAL, 2006, p. 250)

A modernização foi motivada por incentivos governamentais, o que repercutiu em diversos problemas, como o não respeito às especificidades, população e cultura locais.

[1] Agentes coletivos: Diocese de Jataí, Cooperativa Agroindustrial dos Produtores Rurais do Sudoeste Goiano (COMIGO), Sindicato Rural Patronal (SR), Sindicato dos Trabalhadores Rurais (STR), Associação Comercial e Industrial de Rio Verde (ACIRV), Conselho Comunitário de Jataí (CCJ) e Sociedade Ecológica de Jataí (SEJA).

Através de subsídios oferecidos pela pesquisa de Leal (2006), no edital PIBIC 2007/2008, objetivou-se compreender os novos rumos no que se refere ao movimento de reorientação da capacidade produtiva da população residente no campo na região do Sudoeste goiano, buscou também compreender as novas formas de organização da produção que se desenvolvem no campo verificando a execução de atividades agrícolas e não-agrícolas; investigou como os pequenos produtores têm combinado atividades da agricultura com outras formas de rendimento para compreender como o fenômeno da pluriatividade se configurou no Sudoeste goiano.

Segundo dados dessa pesquisa, Marques e Leal (2008), com a passagem da economia auto-suficiente para uma economia ocasionando a chamada modernização agrícola, modifica-se também a organização da produção e as relações sociais. Na região do Sudoeste goiano especialmente nos três municípios pesquisados, Jataí, Rio Verde e Santa Helena de Goiás, essa modernização agrícola se deu obedecendo aos mesmos padrões das demais regiões do Brasil (MARQUES E LEAL, 2008). Não foi pensado, para essa e outras regiões, um projeto que se articulasse com as especificades de cada local, ou que respeitasse o modo de ser da população, biodiversidade ambiental, dentre outros fatores.

A pesquisa revelou ainda que grande parte da região do Sudoeste goiano buscou alternativas para o desenvolvimento da região como, por exemplo, a atividade turística, tanto no espaço urbano como no rural. Estas atividades estão sendo realizadas por meio de construções de pousadas rurais, hotéis-fazenda, pesque-pagues, lagos, parques e chácaras ecológicas, que segundo Campanhola e Silva (2000) se encaixam como locais e atividades classificadas como uma modalidade de turismo rural.

Os dados dessa pesquisa permitiram concluir ainda, segundo Marques e Leal (2008), que há uma combinação da atividade agrícola com não-agrícola pelos pequenos e médios produtores rurais do Sudoeste Goiano. E, o turismo como uma dessas atividades não-agrícola, não tem sido explorado como fonte de complementação de renda. Percebeu-se, nessa fase da pesquisa, que o turismo tem contribuindo para o desenvolvimento do Sudoeste goiano, pois tem trazido aos municípios um crescimento econômico, proporcionado pelos setores terciários como, por exemplo, a rede hoteleira, restaurantes, comércio em geral, transporte, entre outros.

Por meio de dados oferecidos por essa pesquisa (Marques e Leal (2008), foi possível dar continuidade à pesquisa com o edital PIBIC 2008/2009, dessa vez intitulada: Turismo rural.

Essa pesquisa se propôs levantar os principais pontos turísticos da região e categorizar em que perspectiva turística eles se enquadram: turismo rural; ecoturismo; turismo peri-urbano; turismo urbano de cunho rural; agroturismo; agrocomércio e turismo de aventura. Objetivou ainda verificar se o fenômeno do turismo rural tem levado a algum processo de construção no que se refere a novas identidades sociais que não podem ser traduzidas simplesmente pela centralidade na atividade agrícola e nem pelo exercício de uma única atividade econômica.

Por fim intentou esclarecer conceitualmente essas diferentes modalidades de turismo rural em suas definições, exemplificações e sua influência na cultura local. Ou seja, verificar se o fenômeno do turismo rural tem reforçado o estigma de lugar marginal e restrito dos elementos culturais do passado da chamada tradição camponesa; ou se tem provocado uma recuperação de um saber tradicional que teria sido negado e 'esquecido' pelo processo de modernização maciça; uma revitalização da sociabilidade local a partir das relações com os turistas; uma maior possibilidade de trabalhos complementares ou alternativos à agricultura.

1.1 Turismo rural como perspectiva para o desenvolvimento no Sudoeste Goiano

Os primeiros indícios de surgimento do turismo na região do Sudoeste de Goiás foram por volta de 1982 com a criação de uma agência de turismo em Jataí – GO, cidade localizada no Sudoeste goiano. Segundo o jornal da cidade Folha do Sudoeste, fonte de pesquisa documental, houve admiração por parte dos moradores, pois até então em Jataí – GO não existia nenhum ponto turístico a ser explorado pela agência (FOLHA DO SUDOESTE, 1982). Essa empresa turística surgia com o objetivo principal de prestar serviços para pessoas interessadas em fazer viagens para fora da região, receber e orientar o turista ou mesmo pessoas que estejam executando qualquer outro tipo de atividade profissional. A empresa turística também tinha como objetivo transportar pessoas a passeio, negócios e eventos sociais. Transportar funcionários de empresas, firmas comerciais, industriais [...] "enfim, a Agência de Turismo integra e divulga a cidade em todo o território

nacional e até mesmo no exterior" (FOLHA DO SUDOESTE, 1982).

Nesse período ainda não havia nenhum ponto turístico devidamente institucionalizado na cidade de Jataí. Essa empresa turística estabeleceu em 1982 uma meta para 1983 que seria "a criação de locais de lazer, [...] nos principais rios que banham esta cidade como o Rio Claro, Rio Paraíso, Rio doce e Rio Ariranha" (FOLHA DO SUDOESTE 1982). Há o início de algumas iniciativas no que se refere à constituição do que posteriormente viria a ser chamado de turismo rural na região do Sudoeste Goiano.

Espaços culturais urbanos também são consolidados na região e em Jataí nesse período, como é o caso do Museu Histórico Francisco Honório de Campos, Catedral Divino Espírito Santo, Estádio de Futebol, melhorias no Parque de Exposição Agropecuária, entre outras ações.

No que se refere ao turismo rural propriamente dito tem-se, oficialmente, notícia, pela primeira vez em 1999, "de origem, pecuária extensiva, posteriormente agricultura, com lavouras irrigadas de feijão, hoje novamente a propriedade muda de rumos, agora para o turismo rural, em perfeita sintonia com a engorda de gado em confinamento e a produção leiteira" (FOLHA DO SUDOESTE 2000). Dá-se assim, a construção de locais destinados ao turismo rural no município de Jataí. A partir daí tem-se notícias da construção de mais dois lagos na área urbana, vários pesque-pagues nas áreas rurais, hotéis fazendas, clubes campestres entre outras iniciativas.

Segundo Carneiro (1998), precisamos nos atentar para o fato de estarmos presenciando um movimento de reorientação da capacidade produtiva da população residente no campo que se expressa em novas formas de organização das atividades agrícola como uma alternativa ao êxodo rural, ao desemprego urbano, e ao padrão de desenvolvimento agrícola dominante.

Marques e Leal (2008) destacam que a realidade encontrada no Sudoeste goiano é diferente, pois as atividades ligadas ao turismo que deveriam ser fomentadas como uma fonte de renda a mais para o agricultor acaba por não fornecer. Isso ocorre pois os agricultores não estão recebendo dinheiro ao ofertar espaços de turismo em suas propriedades, não cobrarem taxa alguma para os turistas na região visitarem suas propriedades.

1.2 Turismo e Turismo Rural

Para Barreto (1995), Turismo é uma atividade em que a pessoa procura pelo prazer e de livre e espontânea vontade que não visa lucro. As motivações obedecem as razões espirituais ou vitais, próprias e íntimas, o que caracteriza a busca individual pelo prazer. Segundo Barretto (1995) citando Torres (1992), a atividade turística é um fenômeno social desenvolvido a partir do deslocamento voluntário e temporário de indivíduos ou grupos de pessoas que buscam descanso, cultura, recreação ou saúde, que saem do seu local de residência habitual para outro lugar, no qual não praticam nenhuma atividade lucrativa e nem remunerada, criando várias inter-relações de importância social, econômica e cultural.

Percebe-se que o turismo como fonte de descanso e lazer é uma das principais motivações dos turistas. O Turismo rural como modalidade turística está se tornando cada dia mais procurado, por ofertar uma paisagem nitidamente rural, que segundo Rodrigues (2000) é uma marca que oferece uma enorme diversidade relativa a ecossistemas.

O Turismo rural segundo palavras de Rodriguez citando Almeida e Riedl (2000) é uma atividade turística que ocorre na zona rural, integrando a atividade agrícola e pecuária à atividade turística, e que surge como uma alternativa para proprietários rurais frente a atual crise financeira fundiária existente acarretando, entre outras coisas, a falta de incentivos ao homem do campo.

As motivações por parte dos turistas podem estar relacionadas à evasão no que diz respeito ao trabalho, de moradia, de vida social e ambientais (BARRETO 1995). Elas podem também estar relacionadas ao descanso, dentro dos planos das necessidades fisiológicas de cada pessoa, e ainda, outra motivação seriam as causas terapêuticas que Barreto (1995) afirma ser um conceito discutível, pois é determinada pela obrigatoriedade de viajar pela necessidade de um tratamento médico.

1.3 Categorização dos locais turísticos do Sudoeste Goiano

Blos (2000) entende que devido a falta de identidade dos ambientes turísticos, a dicotomia existente entre o rural e o urbano começa a perder sentido, pois cada vez mais esses espaços se confundem, se aproximam, se integram,

gerando um fluxo de informações, dificultando de fato uma definição concreta do termo turismo. Embora existam estas dificuldades, não iremos discuti-las no presente trabalho por não ser o objetivo do mesmo, pois torna-se necessário conceituar e posteriormente categorizar acerca das modalidades que fazem parte do turismo urbano e turismo rural.

O turismo rural apresenta como modalidades: ecoturismo, agroturismo, agrocomércio e turismo de aventura. No turismo urbano encontra-se: turismo peri-urbano, turismo urbano de cunho rural.

1.3.1 Modalidades do turismo rural

O Ecoturismo é uma atividade que segundo a embratur pode ser desenvolvida no espaço rural. É também um dos ramos do turismo rural que se enquadra como atividade turística e que segundo o Ministério do Turismo EMBRATUR (1999) é desenvolvida no espaço rural e pode ser adicionado às práticas de turismo no meio rural. São atividades realizadas em locais em que há um potencial ecológico, de forma conservacionista, procurando conciliar a exploração turística ao meio-ambiente, harmonizando as ações com a natureza bem como oferecendo ao turista um contato íntimo com os recursos naturais e culturais da região, contribuindo assim para uma consciência ecológica. Campanhola e Graziano da Silva (2000) concordam que o ecoturismo é uma atividade realizada em áreas naturais que se encontram preservadas, com o objetivo específico de estudar, admirar e desfrutar a flora e a fauna, assim como qualquer manifestação cultural, (passada ou presente) que ocorra nessas áreas.

Agroturismo, segundo Campanhola e Graziano da Silva (2000), são atividades internas à propriedade, que geram ocupações complementares à atividades agrícolas. Exemplos: Fazenda hotel, pesque-pague, fazenda de caça, pousada, restaurante típico, vendas diretas de produtos, artesanato, industrialização caseira e outras atividades de lazer ligadas à vida cotidiana dos moradores do campo. O Agroturismo é também uma modalidade que mais diretamente pode representar uma renda complementar aos pequenos agricultores como afirma Campanhola e Graziano da Silva (2000), e que necessita de três características essenciais para sua implementação. Primeiro: infra-estrutura composta de alojamentos, pousadas, redes de água e esgoto, rede de comunicação, rede

elétrica, coleta de lixo. Segundo, há a necessidade de pessoal treinado para os mais diferentes níveis para o desempenho das diversificadas atividades e, terceiro, a implementação de um quadro institucional para o desenvolvimento e promoção do agroturismo (políticas, planejamento, regulações e estruturas organizacionais), e por fim o preparo das agências e operadoras de turismo em promover e vender produtos turísticos, voltados ao meio rural.

O Agrocomércio surge como uma outra modalidade, que segundo Portuguez (1999) se dá pela venda de produtos de origem rural, como massas, biscoitos, doces, bebidas, queijos, embutidos, frutas, compotas, leite, peixes. Essa modalidade nada mais oferecendo aos visitantes do campo.

Outra modalidade de turismo que está vigorando é o chamado Turismo de Aventura, este possui um grau de proximidade grande com o ecoturismo, uma vez que o único fator diferencial está presente no turista, o qual irá impor a sua atividade desejada, ou seja, a sua motivação principal para participar da atividade.

Para Fennel (2002) no ecoturismo não existe aquela aventura que no turismo de aventura está especificamente presente, a resposta à pergunta de como as experiências se diferem está no campo psicológico social, e o fator mais importante na decisão de alguém se engajar em atividades de aventura é o risco.

1.3.2 Modalidades do Turismo urbano

Segundo Rodrigues (2000) o Turismo Peri-urbano possui a caracterização da propriedade como uma pousada, um hotel às margens de uma rodovia, um motel, ou um resort cuja localização está na zona convencionada como rural. Ou seja, existem casos de pessoas que buscam pelo lazer e turismo localizados em territórios denominados rurais, porém exercem atividades convencionalmente urbanas.

Apesar de haver uma grande dificuldade de classificação dos inúmeros eventos que perpassam várias modalidades de turismo, o turismo urbano de cunho rural trata-se de uma atividade de lazer realizada no meio urbano, sobretudo com inspiração na cultura rural.

É curioso observar que existe um tipo de turismo rural às avessas, ou seja, a cultura rural colonizando o espaço urbano, a qual o sentido está em se recuperar as tradições rurais que foram deturpadas pelo espaço urbano. Citando um

pouco de história, até o ano de 1964, a população rural no Brasil era superior a população urbana. A partir de então, a população urbana teve um crescimento expressivo em relação à população rural que mais tarde começa a sofrer pela pequena parcela de moradores. E essa mesma população urbana acaba por ter sob forte influência o turismo urbano de cunho rural.

2 OBJETIVOS

Os objetivos da pesquisa são investigar as possíveis interfaces desse processo de desenvolvimento do Sudoeste goiano com o Turismo Rural. Objetiva ainda, levantar quais os principais pontos turísticos da região do Sudoeste goiano e categorizar em que perspectiva turística eles se enquadram: turismo rural; ecoturismo; turismo peri-urbano; turismo urbano de cunho rural; agroturismo; agrocomércio e turismo de aventura.

Intenta-se por fim verificar se o fenômeno do turismo rural tem reforçado o estigma de lugar marginal e restrito dos elementos culturais do passado da chamada tradição camponesa; ou se tem provocado uma recuperação de um saber tradicional que teria sido negado e 'esquecido' pelo processo de modernização.

3 METODOLOGIA

A pesquisa compilou toda a produção acadêmica sobre o tema turismo em geral, posteriormente aprofundou nas questões pertinentes ao turismo rural. Após a compilação da produção acadêmica foram realizados levantamentos bibliográficos e documentais de toda a produção acadêmico-científica pertinente ao tema já desenvolvida no Sudoeste goiano da década de 1970 em diante. Depois disso, verificou-se em que medida temas relacionados ao turismo rural aparecem nessa produção científico-cultural. Em um segundo momento, investigou se esse fenômeno chamado turismo rural tem se configurado nessa região do Sudoeste de Goiás e se ele tem se dado na perspectiva da pluriatividade ou não, via levantamento de informações de fonte documental, que auxiliou na obtenção de resultados discorridos no decorrer do relatório.

A opção por pesquisar em fontes documentais se fundamenta nos argumentos de Lüdke e André (1986). Para essas autoras a pesquisa documental se

constitui numa valiosa técnica de abordagem de dados qualitativos desvelando aspectos de um problema. São considerados documentos quaisquer materiais escritos que possam ser usados como fonte de informação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Breve categorização dos pontos turísticos de Jataí – GO

O Sudoeste Goiano nos proporciona uma série de possibilidades de Turismo, sendo assim levantou-se os principais pontos turísticos da região, mas para fins de classificação foi usado o município de Jataí[3]. Após o levantamento dos pontos turísticos foi realizada uma divisão em locais com predominância de Turismo Rural e Turismo Urbano, e, depois disso, uma sub-divisão que categorizou em que perspectiva turística esses espaços se enquadram: turismo rural, ecoturismo, turismo peri-urbano, turismo urbano, turismo urbano de cunho rural, agroturismo, agrocomércio e turismo de aventura.

De acordo com a pesquisa documental feita no Jornal Folha do Sudoeste e informações dadas pela Secretaria de Turismo localizados no município de Jataí, a região Sudoeste tem como locais de Turismo urbano e Turismo rural:

QUADRO REFERENTE AOS ESPAÇOS TURISTICOS DE JATAÍ – GO

TURISMO URBANO	TURISMO RURAL
Estádio Municipal Arapucão	Ribeirão Ariranha
Praça Tenente Diomar Menezes	Jardim Botânico
AABB – Associação Atlética Banco do Brasil	Fazenda Santa Maria da Ariranha
Sindicato dos Bancários	Pesque Pague Hotel Fazenda Recanto das Águas
Jataí Thermas Clube (Thermas Beach Parque)	Chácara Zooflora
Teatro Escola Técnica Federal	Lago Bonsucesso
Catedral Divino Espírito Santo	Hotel Fazenda Bonsucesso
Casa do Artesão	Cachoeira do Lageado
Parque Ecológico JK/ Memorial Jk	Cachoeira do Milano
Museu de Arte Contemporânea	Cachoeira do Rio Claro
Centro de Tradições Gaúchas (CTG)	Pesque Pague do André
Museu Histórico "Francisco Honório de Campos"	Recanto Vale do Rio Claro

[3] Os dois quadros se referem aos pontos turísticos de Jataí – GO, por ser a cidade que mais se destaca dentro do desenvolvimento turístico do Sudoeste goiano.

Os pontos turísticos apresentados em seguida são classificados de acordo com as subcategorias seguintes: Turismo rural: ecoturismo, turismo eco-rural, agroturismo, agrocomércio, turismo de aventura. Turismo urbano: turismo urbano e turismo urbano de cunho rural.

MODALIDADES TURÍSTICAS PRESENTES NO TURISMO RURAL

ECOTURISMO	TURISMO PERI-URBANO	TURISMO URBANO DE CUNHO RURAL	AGROTURISMO	AGROCOMÉRCIO	TURISMO DE AVENTURA
Ribeirão Ariranha	Pesque Pague Hotel Fazenda Recanto das Águas	Clube do Laço	Pesque Pague Hotel Fazenda Recanto das Águas	Pesque Pague do André	Ribeirão Ariranha
Jardim Botânico	Lago Bonsucesso	Centro de Tradições Gaúchas (CTG)	Pesque Pague do André		Cachoeira do Lageado
Fazenda Santa Maria da Ariranha		Casa do Artesão			Cachoeira do Milano
Chácara Zooflora					Cachoeira do Rio Claro
Cachoeira do Lageado					
Recanto Vale do Rio Claro					
Cachoeira do Milano					

As tabelas fazem referência à quantidade de lugares e atividades disponibilizadas por meio dos vários locais de turismo localizados em Jataí – GO. As modalidades apresentadas na segunda tabela são consideradas como subcategorias do turismo rural e turismo urbano. Essas modalidades passam por avaliações que consideram especificamente o tipo de turismo para cada lugar, pois o que vem determiná-las como atuantes em cada espaço é justamente as características de cada local. Características essas apresentadas mediante a conceituação das modalidades previstas anteriormente.

Pode-se citar como exemplo a Chácara Zooflora, um espaço preparado para abrigar animais selvagens, segundo a pesquisa, é considerada um local que realiza o ecoturismo, pois localiza-se em espaço rural e possui um enorme potencial ecológico, características essenciais para ser considerada como ecoturística. Segundo a EMBRATUR (1999) no ecoturismo deve-se agir de forma conservacionista e que procure conciliar a exploração turística ao meio ambiente, isso de fato ocorre, pois a Zooflora possui um espaço com habitat próprio dos animais, espaços até modificados para adaptá-los da melhor forma. Essa relação faz

com que haja harmonia com a natureza e ofereça ao turista um contato íntimo que deve ser feito com os recursos naturais da região. (EMBRATUR, 1999). O local harmoniza as ações com a natureza e oferece ao turista contato íntimo com os recursos naturais e culturais da região, disponibilizados por atividades relacionadas a conscientização ecológica. Portanto a Zooflora contribui, segundo as especificações da Associação Brasileira de Turismo (EMBRATUR), como um local Ecoturistico.

Para ser considerado turismo de aventura são necessárias outras características, diferentemente das exigidas pelo ecoturismo, embora haja alguns aspectos que se assemelhe as características do turismo de aventura, possuem vertentes diferentes. A chácara Zooflora neste caso não pode ser considerada como turismo de aventura por não possuir por parte do turista característica como, a motivação em participar da atividade desejada, a qual o diferencial está no campo psicológico social para se engajar em atividades de aventura e risco.

No Sudoeste goiano, o turismo dessas modalidades está pouco difundido, embora utilizados por uma pequena parcela da população. Marcellino citando Dumazedier (2002) afirma que as pessoas vão em busca de lugares, principalmente relacionados ao turismo rural, que viabiliza por meio do contato com a natureza, um ambiente que traz descanso, divertimento e desenvolvimento, funções que o lazer proporciona através destas modalidades apontadas pela pesquisa.

Pereira de Queiroz (1976) fala que o campo e a cidade cada vez mais se tornam diversos com o predomínio da indústria sobre a agricultura, contudo a cidade é essencialmente consumidora dos produtos do campo. De fato, os citadinos dependem não somente do capital que o campo pode oferecer, mas de momentos que proporcionem estudos, cultura, possibilidades de relaxamento físico, o lazer, que embora necessário não é suficientemente único (BARRETO, 2000). O turismo que permite ao indivíduo o distanciamento de seu cotidiano está se tornando cada vez mais uma necessidade do bem estar humano.

O turismo rural constitui-se uma modalidade do turismo, ele surgiu como uma alternativa para a manutenção do homem no campo. Cientes dessa situação percebemos que o Sudoeste goiano, possui muitos locais que podem sim ser utilizados como mais uma alternativa de renda aos seus empresários rurais, e inclusive ao próprio município que disponibiliza de grandes monumentos, praças, parques, lagos, museus, citados no primeiro quadro acima, no turismo urbano.

Juntamente com esses espaços, o turismo rural também possui seus locais, embora não citados todos no segundo quadro, acontece em suas propriedades visitações no que diz respeito aos seus espaços turísticos, mesmo que não seja cobrado nenhum tipo de valor monetário.

Marques e Leal (2008) confirmam nossa pesquisa de que o turismo rural tem sido extremamente procurado pela população urbana, onde os citadinos saem em busca de se livrar do estresse causado pelos problemas cotidianos. O Sudoeste goiano tem se tornado uma grande perspectiva de desenvolvimento econômico, a partir do aproveitamento das suas potencialidades turísticas.

Atrelando a grande gama de possibilidades turísticas do turismo rural agregado as suas modalidades, juntamente com os incentivos proporcionados pela região, principalmente pela cidade de Jataí – GO, o desenvolvimento e crescimento turísticos da região vem se tornando uma fonte de renda complementar não somente aos moradores do campo, mas a própria economia da cidade. Fazendo essa relação campo e cidade, estaria sendo proporcionada à região e aos próprios moradores a oportunidade de divulgar a sua cultura, a qual possui uma imensa riqueza.

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho, foi possível, por meio de fontes bibliográficas e documentais, conceituar cada modalidade do turismo rural e urbano. Além disso, foi possível a categorização dos locais turísticos de Jataí – GO, cidade que se destaca no Sudoeste goiano por possuir grandes empreendimentos relacionados ao turismo como um todo, principalmente no que se refere à locais que predominam o turismo rural.

Os dados da pesquisa permitem concluir que existe uma gama de possibilidades turísticas nos locais apontados pela pesquisa, principalmente voltadas para a atuação com modalidades no turismo rural, e que contribui diretamente para avanço e desenvolvimento do turismo no Sudoeste goiano.

Conclui ainda que o turismo rural presente no Sudoeste goiano, principalmente no município de Jataí – GO, maior expoente nessa atividade, acaba por não influenciar no processo de construção de novas identidades, pois mesmo que essa região seja rica em locais com uma predominância de espaços de turismo

rural ela não recebe incentivos relacionados ao turismo, trazendo como conseqüência, o pouco fluxo de turistas na cidade. Mesmo que Jataí – GO possua uma gama de possibilidades turísticas, o fato do pouco incentivo, a falta de infra-estrutura adequada, a pouca divulgação o turismo influencia terminantemente, fazendo com que a cidade receba poucas pessoas nesses locais, o que não vem levar a nenhuma construção de novas identidades sociais a partir desse pouco fluxo de pessoas vindas de outras regiões.

Diante dessa situação, a pesquisa aponta que o turismo rural está presente em praticamente todo território do Sudoeste goiano, como em: Mineiros, Chapadão do Céu, São Simão, Caiapônia, Serranópolis, Aporé, Lagoa Santa e Jataí.

Embora haja uma grande possibilidade de modalidades turísticas a partir do turismo rural presente nessa região, não acontece uma mudança da cultura local, fato que em algumas regiões turísticas do Brasil acontece. Há uma preocupação em relação a essa mudança de hábitus[2] da cultura local em virtude do grande número de turistas que freqüentam alguns pontos turísticos. Isso leva a uma inevitável relação com o de fora, fato que vem influenciando/interferindo na cultura dos citadinos locais, segundo indicam pesquisas, como Carneiro (1998).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Joaquim Anécio; RIEDL, Mário. *Turismo Rural*: Ecologia Lazer e desenvolvimento. Bauru, SP: EDUSC, 2000.

BARRETTO, Magarita. *Manual de iniciação ao estudo do turismo*. Campinas, SP: PAPIRUS, 1995. (ColeçãoTurismo).

BLOS, Wlademi. O turismo rural na transição para um outro modelo de desenvolvimento rural. In:_____*Turismo Rural*: Ecologia, lazer e desenvolvimento. Baurú, SP: EDUSC, 2000.

CAMPANHOLA, Clayton; SILVA, José Graziano da. O agroturismo como nova fonte de renda para o pequeno agricultor brasileiro. In:_____ *Turismo Rural*: Ecologia, lazer e desenvolvimento. Bauru, SP: EDUSC, 2000.

CARNEIRO, Maria José. *Ruralidade*: novas identidades em construção. In:_____ Estudos sociedade e agricultura. Campinas: CEDES, Outubro de 1998, p. 26-52.

EMBRATUR. Instituto Brasileiro de Turismo. *Diretrizes Nacionais para o Desenvolvimento do Turismo Rural, Ministério da Indústria do Comércio e do Turismo*. Brasília, Mimeogr., 1999.

[2] O campo da modernização agrícola dita os novos habitus, e cada um dos agentes os reproduzem. A formação do novo habitus foi possível graças às estratégias de ação adotadas pelos agentes coletivos dentro do campo da modernização agrícola (BOURDIEU, 1996).

Fennell, David. A. *Ecoturismo*. tradução de Inês Lohbauer. São Paulo. Contexto, 2002. (Coleção Turismo Contexto). Título original : Ecoturism.

GRAZIANO NETO, Francisco. *Questão agrária e ecologia:* crítica da moderna agricultura. São Paulo: brasiliense, 1982.

MARCELLINO, Nelson Carvalho. *Estudos do lazer*: uma introdução. Campinas, SP. Autores associados, 1996.

MARQUES, Thays Bernardes; LEAL, Cátia Regina Assis Almeida Leal. *Turismo Rural*: perspectiva de desenvolvimento no Sudoeste Goiano. Relatório de pesquisa, 2008

LEAL, Cátia Regina Assis Almeida. *Arapuca armada*: ação coletiva e práticas educativas na modernização agrícola do Sudoeste goiano. 2006. 256f. Tese (Doutorado em Educação) – Faculdade de Educação, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

LÜDKE, Menga; ANDRÉ, Marli E. D. A. *Pesquisa em educação:* abordagens qualitativas. São Paulo: EPU, 1986.

PEREIRA DE QUEIROZ, Maria Isaura. *Do rural e do urbano no Brasil*. In. SZMRECSÁNYA, 2 ed. São Paulo: Editora Nacional, 1976.

PORTUGUEZ, A. *Agroturismo desenvolvimento regional*. São Paulo: Hucitec, 1999.

RODRIGUES, Adyr Balastreri. Turismo e rural no Brasil: ensaio de uma tipologia. In:_____*Turismo Rural*: Ecologia, lazer e desenvolvimento. Baurú, SP: EDUSC, 2000.

FOLHA DO SUDOESTE. Surge em Jataí uma agência de turismo. Jornal Folha do

Sudoeste, Jataí, Junho de 1982, p. 09

FOLHA DO SUDOESTE. Turismo Rural em pauta. Jornal Folha do Sudoeste, Jataí, 20 a 26 de Julho de 2000, p. 2.

Estudo Fitoquímico e Avaliação Biológica dos Caules de *Molopanthera paniculata*

Michele Paula de Melo[a], Lucília Kato[a]

[a]Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970, Brasil

e-mail: tete150382@hotmail.com

Palavra chave: fitoquímica, Rubiaceae, iridóides

1- INTRODUÇÃO

A família Rubiaceae, na qual está inserido o gênero *Molopanthera,* compreende espécies arbóreas e arbustos que ocorrem em vários extratos de florestas tropicais possuindo aproximadamente 650 gêneros e cerca de 13.000 espécies (DELPRETE, 2004). Essa família é rica em alcalóides indólicos, quinolínicos e isoquinolínicos, além da presença marcante de monoterpenos (C10) da classe dos iridóides.

Estudos quimotaxonômicos realizados por Inouye e colaboradores (1988) detectaram a presença de iridóides em diversas espécies da família Rubiaceae, sugerindo que essas plantas podem ser classificadas em três grupos: (i) subfamília Ixoroideae, com membros que contêm gardenosídeo, geniposídeo e ixorosídeo; (ii) subfamília Rubioideae, com membros que contêm asperulosídeo e/ou ácido desacetilasperulosídeo; subfamília Cinchonoideae e Antirheoideae, que contém loganina, secoiridóides e/ou alcalóides indólicos biossintetizados via esses dois glicosídeos.

Os resultados preliminares do estudo fitoquímico de *M. paniculata* (SILVA, 2007) mostrou o isolamento e a elucidação estrutural de dois iridóides glicosilados presentes na fração éter etílica oriunda do extrato etanólico das folhas desta espécie.

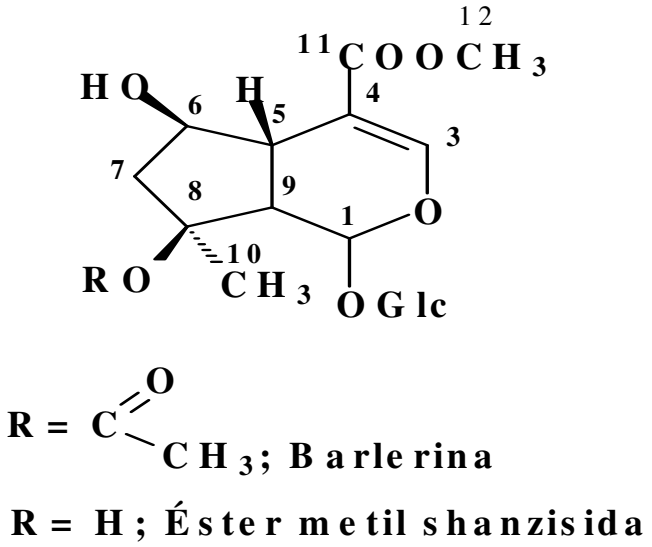


Figura 1: Iridóides glicosilados isolados das folhas de *M. paniculata*

Os iridóides são monoterpenos que contém na sua estrutura um esqueleto iridano constituído, geralmente, por um anel ciclopentano fundido a um anel heterocíclico de seis membros, contendo oxigênio (DEWICK, 1997).

Os iridóides, assim como os alcalóides, são classes importantes do ponto de vista farmacológico, visto que lhes são atribuídas diferentes atividades biológicas, como por exemplo: antitumorais (UEDA e IWAHASHI, 1991), antibacterianas e antiprotozoárias (TADESMIR et al., 2005) entre outras.

2- OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- A extração, o isolamento e a elucidação dos compostos obtidos dos extratos do caule de *Molopanthera paniculata*;
- Avaliação da atividade biológica (antiproliferativa) do caule de *M. paniculata*.

3- METODOLOGIA

3.1 - Coleta e identificação do material vegetal

O material foi coletado no estado de Minas Gerais, no Parque Estadual de Caraça. A identificação dos espécimes coletadas foi feita pelo botânico Dr. Piero Giuseppe Delprete do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, especialista na familía Rubiaceae.

3.2-Preparação do material vegetal

3.2.1-Secagem

Esta etapa tem por finalidade, a retirada de água do espécime vegetal e com isso impedir reações de hidrólise e crescimento microbiano.

Esta exposição pode ser realizada ao ar livre ou com o auxílio de estufas. No trabalho realizado, utilizou-se uma estufa de secagem e esterilização da marca FANEM modelo 315SE.

3.2.2 - Moagem

A moagem foi necessária para a redução do volume vegetal (cascas do caule) transformando-o em fragmentos menores. Utilizou-se um moedor de facas cortantes.

A massa do vegetal obtida após a moagem foi de 19,7g.

3.2.3 - Extração

A obtenção dos extratos a partir das cascas do caule, foi realizado por extração contínua em extrator do tipo Soxhlet. O material foi submetido à extrações sucessivas com solventes em gradiente de polaridade.

Tabela 1: Extratos obtidos por sistema de Soxhlet

Extrato	Massa do extrato (mg)
Hexano	194,9
Cloroformio	146,1
Acetona	459,4
Metanol	730,0

3.2.4 Fracionamento:

Extrato acetona

Para fracionamento e purificação do extrato acetona (343,7 mg) utilizou-se a cromatografia em coluna (CC), utilizando-se como fase estacionaria: sílica gel 60 e como sistema eluente a mistura de clorofórmio e metanol, em gradiente de polaridade, iniciando-se com clorofórmio e finalizando com $CHCl_3$/MeOH 1:1.

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), as 29 frações obtidas pela CC que apresentavam o mesmo perfil cromatográfico (mesmo Rf) foram reunidas fornecendo 12 frações (Tabela 2).

Tabela 2: Frações obtidas da CC do extrato acetona

Frações reunidas	Massa (mg)
1-2	5,6
3-4	1,1
5-7	1,4
8-9	0,9
10	31,6
11	35,2
12-14	52,1
15-18	67,7
19	7,6
20-25	29,0
26-28	8,2
29	24,5
Massa total	**264,9**

As frações 10, 11, 12-14, 15-18, 20-25 foram submetidas à purificação por cromatografia em camada preparativa (CCP) fornecendo 9 subfrações (Tabela 3).

Tabela 3: Sistemas eluentes utilizados nas CCP das frações 10, 11, 12-14, 15-18 e 20-25.

Frações	Sistema Eluente	Subfrações	Massa (mg)
10	$CHCl_3$: MeOH (12%)	1	3,7
		2	6,8
11	$CHCl_3$: MeOH (15%)	3	9,0
		4	7,1
12-14	$CHCl_3$: MeOH (12%)	5	7,0
15-18	$CHCl_3$: MeOH (15%)	6	3,2
		7	11,8
20-25	$CHCl_3$: MeOH (16%)	8	6,1
		9	6,4

Após análise por CCD, as subfrações 2, 3, 4, 5, 6, 7 foram enviadas para análises de RMN.

Extrato Clorofórmio

Utilizou-se 70 mg desse extrato para se realizar uma CCDP da qual resultou as subfrações 10, 11, 12, 13 e 14.

O sistema eluente utilizado foi $CHCl_3$: MeOH (10%) e o volume de solvente gasto foi de 300ml.

Após análise por CCD, verificou-se que a subfração 14 estava pura sendo enviada para análises de RMN.

Extrato hexânico

Após análise por CCD, observou-se que este extrato possuía uma grande quantidade de compostos poucos polares, sendo protelado o seu estudo.

Extrato metanólico

Para o fracionamento em CC, utilizou-se 555 mg do extrato metanólico, fase estacionária Sephadex LH-20 e como sistema eluente metanol e água. As 35 frações resultantes desta coluna, após análise por CCD, foram reunidas conforme as semelhanças apresentadas através do perfil cromatográfico (Tabela 4).

Tabela 4: Frações obtidas do fracionamento do extrato metanol

Frações Reunidas	Massa (mg)
1-5	8,5
6-8	63,2
9	63,8
10-14	202,4
15-22	44,8
23-35	11,5

A fração 6-8 foi submetida a purificação por CCP utilizando-se como sistema eluente $CHCl_3$: AcOEt (7:3) que forneceu 2 subfrações, sendo que a subfração 15 (3 mg) foi submetida a análise por RMN.

Estudo Fitoquímico das folhas de *Molopanthera paniculata*

Em continuação ao estudo fitoquímico de *M. paniculata*, realizou-se uma CCP da fração acetato de etila das folhas dessa planta. A massa e o sistema eluente utilizados foram respectivamente 76 mg e $CHCl_3$: MeOH a 20%. Após esse processo, as subfrações 16 (5,5 mg) e 17 (6,8 mg) foram enviadas para análise de RMN.

3.5 - Determinação estrutural dos novos compostos

Os métodos utilizados, que permitiram a elucidação estrutural dos compostos isolados foram a Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^{1}H), de carbono (RMN ^{13}C) e as técnicas bidimensionais, HMBC e HSQC.

Os espectros foram obtidos em um espectrômetro Varian, Gemini 2000 BB, (300 MHz para ^{1}H e 75,4 para ^{13}C, (DQ/UEM) e Bruker Avance III 500 (IQ-UFG).

3.5.1- Preparação das amostras para análise

As amostras puras: 2, 4, 5, 6, 7, 14, 15, 16, 17 e a subfração MP7, foram solubilizadas completamente em solvente deuterado (metanol ou o clorofórmio). Utilizou-se o TMS (tetrametilsilano) como padrão interno de referência.

3.6-Testes biológicos

3.6.1-Testes antiproliferativos

Os ensaios de citotoxicidade (determinação de atividade antitumoral) foram realizados em parceria com o Laboratório de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da UFG, sob coordenação da Prof. Dra Lidia Andreu Guillo, utilizando-se 155 mg do extrato acetona.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Estudo fitoquímico:

Análise espectroscópica de RMN de MP7

Visto que esse trabalho é a continuação do estudo fitoquímico das folhas de *M. paniculata* e como resultado desse trabalho havia o isolamento, mas não a identificação da subfração MP7, realizou-se as análises espectroscópicas para elucidação desse composto.

- MP7

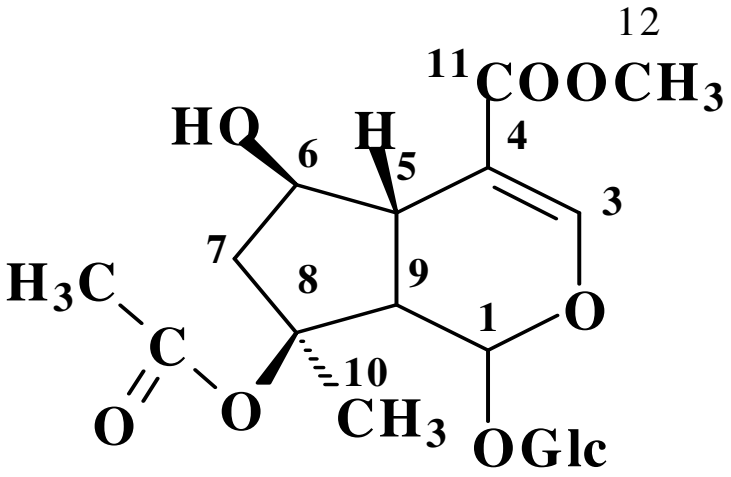


Figura 2: Iridóide Glicosilado
Onde Glc é uma molécula de glicose

O composto MP7 foi isolado como um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio, obtido a partir do fracionamento do extrato acetona das folhas de *M. paniculata.*

O espectro de RMN ^{1}H mostra 8 sinais distintos (Tabela 5), integrando para 12 hidrogênios. O δ_H 7,43 (s, 1H) sugere a presença de H-3, característico do anel secologanínico e o δ_H 5,90 (d, 1H) característico de H-1 do tipo anomérico (JENSEN et al, 2007). Os multipletos na região de 3,0-4,0 sugerem a presença de prótons carbinólicos. O δ_H 3,71 (s, 3H) sugere a presença de metoxila na molécula e o δ_H 1,50 (s, 3H) indica a presença de metila, provavelmente ligado a carbono desprotegido (Fig. 2).

O espectro de ^{13}C, em conjunto com o espectro de HSQC permitiu observar a presença de 17 átomos de carbono, sendo dois deles metilas, dois metilênicos, dez metínicos e três C não-protonados. Desses 17 átomos de carbono, 4 metínicos, 1 metilenico e 1 não-protonado são característicos da molécula de glicose. O δ_c 76,1 (C-6) e 89,8 (C-8) (em campo mais baixo) indica a presença de carbonos ligados a

hidroxilas na molécula. O δ_c 153,9 (C-3) é característico de C_{sp2} ligado a oxigênio e δ_c 170,0 (C-11) de carbonila. O δ_c 95,9 (C-1) é característico de acetal.

A análise do espectro de COSY permitiu a observação do acoplamento alílico de δ_H 7,43 (H-3) e δ_H 3,06, dq, atribuído ao H-5 e também do acoplamento de δ_H 4,05 (H-6, m) com os hidrogênios em δ_H 3,06 (H-5); δ_H 2,04, (d, *J*=5,7 Hz) e 2,19 (d, *J*=15,1 Hz) atribuídos aos metilênicos H-7. Além desses acoplamentos, o δ_H 3,00 (H-9) apresenta acoplamento com δ_H 5,90 (H-1, *J*=2,3 Hz) e 3,06 (H-5, *J*=9,0 Hz) que permitiu localizar o sistema de spin característico do esqueleto dos iridóides (correlações negritadas na Fig.3)

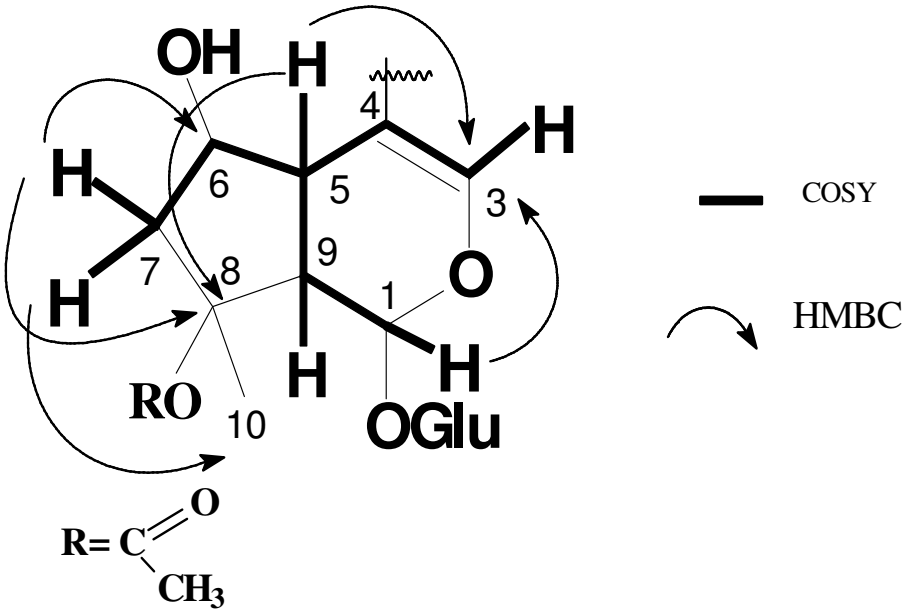


Figura 3: Principais correlações observados nos espectros COSY e HMBC para MP 7.

As correlações observadas no espectro de HMBC (Tab.5 e Fig. 3), ressaltando-se a correlação de H-3 com o carbono insaturado não-protonado em δ_c 109,7 (C-4) que é característico do anel secologanínico, permitiram a determinação da estrutura do composto MP7 como o iridóide. As correlações entre os prótons H-7 e os δ_c 89,8 (C-8),

76,1 (C-6) e 22,3 (C-10) permitiram a correta localização da metila (C-10) e da hidroxila no anel iridano.

A correlação entre o δ_H 5,90 (H-1) e o carbono não-protonado δ_c 100,4 (carbono anomérico da glicose) confirmam a ligação da unidade glicosídica ao iridóide.

Este composto é um iridóide carboxilado com um grupo éster em C-4 e com uma hidroxila em C-6. Apresenta também uma metila ligada a uma carbonila em C-8. (Fig. 4).

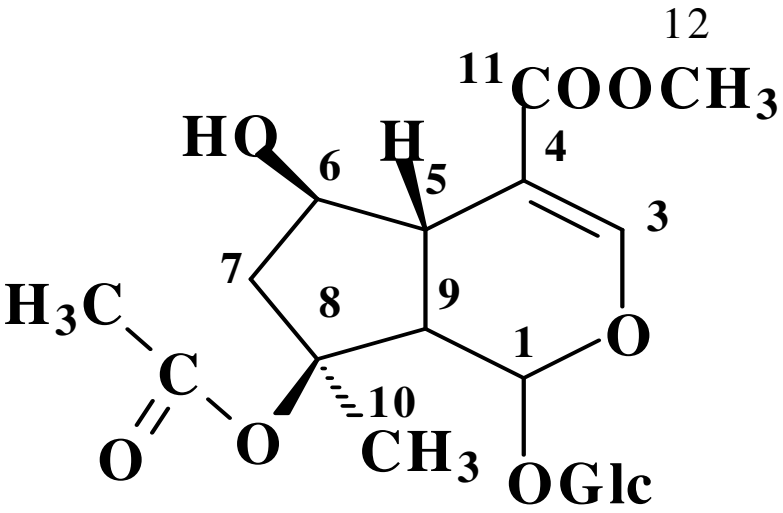


Figura 4: Estrutura do composto MP7 (barlerina).

Os dados espectroscópicos da barlerina descritos por DINDA et al (2007) são concordantes com os encontrados para MP7.

Tabela 5: Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C para o composto MP7 ($CDCl_3$;TMS)

Posição	**^{13}C δ (Dept)**	**^{1}H δ, m (nº H, *J* Hz)**	**COSY**	**HMBC (H-C)**
1	95,9 (CH)	5,90, d (1H; 2,2)	H-5/H-9	42,1/89,8/100,4*/153,9
3	153,9 (CH)	7,43, d (1H; 1,7)	H-5	42,1/95,9/109,7/170,0/109,7
4	109,7 (Cq)	-	-	-
5	42,1 (CH)	3,06, dq (1H; 1,2 e 9,0)	H-3/H-6/H-9	89,8/109,7/50,0/76,1/119,7
6	76,1 (CH)	4,05, m (1H)	H-5/H-7	47,8/89,8
7	47,8 (CH_2)	2,04, d (1H; 5,6) 2,19, d (1H, 15,1)	H-6	76,1/89,8/42,1/22,23
8	89,8(Cq)	-	-	-
9	50,0 (CH)	3,00, dd, (1H, 2,6 e 9,0)	H-5/H-1	89,8/109,7/42,1
10	22,3 (CH_3)	2,01, s (3H)		173,2
11	170,0 (Cq)	-		
12	51,9 (CH_3)	3,71, s (3H)		169,0/109,7
H_3C-COO-	22,2 (CH_3)	1,50, s (3H)		89,8

*deslocamento atribuído ao C anomérico da glicose, cujos deslocamentos não foram discriminados nesta tabela.

Análise da subfração 17

Através de estudos comparativos entre os perfis cromatográficos e do espectro de RMN ^{1}H da subfração 17 e da MP7 percebeu-se que estas amostras apresentaram o mesmo perfil, sendo então a subfração 17, também identificada como barlerina.

Análise das subfrações obtidas do caule de *Molopanthera paniculata*

Análise espectroscópica de RMN das subfrações 2, 3, 4, 6, 14 e 15 mostrou que havia nessas amostras analisadas, uma grande quantidade de compostos apolares de cadeia longa, o que não permitiu a identificação estrutural das substâncias.

Utilizando-se estudos comparativos de perfis cromatográficos foi possível verificar que a subfração 7, obtida do extrato acetona, também possui estrutura química semelhante ao da subfração MP7.

A análise estrutural da subfração 5 mostrou-se complexa, pois trata-se de um composto com esqueleto iridano acoplado a sistema aromáticos e os dados espectroscópicos ainda estão sendo analisados.

4.2-Atividade biológica

A realização dos ensaios de citotoxidade para o extrato acetônico mostrou que esta amostra apresentou atividade citotóxica significativa, ou seja, ela foi potencialmente bioativa, no entanto ensaios realizados com os iridóides isolados mostraram baixa atividade.

Para confirmar a hipótese de que a porção glicolítica do iridóide esteja inibindo a atividade citotóxica, visto que iridóides são bastante ativos, novos ensaios estão sendo realizados com a submissão desses iridóides sob ação da enzima glicosidase. Esses ensaios estão sendo realizados pela Profa. Lidia Andreu Guillo.

5- CONCLUSÃO

Nesse trabalho realizou-se a elucidação estrutural da subfração MP7 obtida do extrato acetona das folhas de *M. paniculata*, o que resultou num iridóide glicosilado conhecido como Barlerina.

Esta é a primeira descrição de isolamento de iridóides para esta espécie.

Comparando-se por CCD, constatou-se que a subfração 17 possui estrutura semelhante ao da MP7. O estudo fitoquímico do caule de *M. paniculata* mostrou que a subfração 7 também possui estrutura química semelhante ao composto MP7, mostrando que a presença de Barlerina é majoritária nesta planta.

O iridóide isolado não apresentou atividade citotóxica a despeito da potencial atividade destes iridóides como antitumorais.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DELPRETE, P.G. Rubiaceae. In: SMITH, N.P. et al. Flowering Plant Families of the Americam Tropics. Ed. Princeton University Press, p. 328-333, 2004.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. **Chicheter**, Eitora John Wiley & Sons, 466 p. 1997.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y.; Naturally Occurring Secoiridoids and Bioactivity of Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids. A Review**. *Chem. Pharm. Bull.*** v. 55 (5) p. 689—728, 2007.

JENSEN, S. R; CALIS, I; GOTFREDSEN, C, H., SOTOFTE, I.; Structural Revision of some published iridoid glucosides, **J. Nat. Prod**. v.70, p29-32, 2007.

GOODLAND, R. J. A.; FERRI, M. G. Ecologia do Cerrado**,** Belo Horizonte, Ed. Itatiaia, 1979, 193 p. Inouye, H. et al. Chemotaxonomic studies of rubiaceous plants containing iridoi glycosides. **Phytochem**. v. 27, p.2591-2598. 1998.

INOUYE, H.; TAKEDA, Y.; NISHIMURA, H.; KANOMI, A.; OKUDA, T.; PUFF, C. Chemotaxonomic studies of rubiaceous plants containing iridoid glycosides. **Phytochem.,** v. 27, n. 8, p. 2591-2598, 1988.

SILVA, F.M., KATO, L., OLIVEIRA, C.M. A, MELO, M. P., DELPRETE, P.; SILVA, C. C., TANAKA, C.M. A. Glicosydic iridoids from Molopanthera paniculata TURCZ (RUBIACEAE, POSOQUERIEAE). In: 1 Brazilian Conferece on Natural Products, 2007, Águas de São Pedro. **Abstract book** 1o Brazilian Conference on Natural Products. ,2007.

SILVA, R. B., TORRES, S. J. G., VIOLANTE, F. A. Do isolamento à síntese da convolutamidina. *Quím. Nova*, v. 31 p 924-929, 2008.

SIMÕES, C. M. O. E.; SCHENKEL, E. P. ; et al. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento; ed. da UFRGS e UFSC, 1999.

TADESMIR, D.; GÜNER, N. D.; PEROZZO, R.; BRUN, R.; DÖNMEZ, A. A.; ÇALIS, I.; RÜEDI, P. Anti-protozoal and plasmodial FabI enzyme inhibiting metabolities of *Scrophualaria lepidota* roots**. Phytochem**. v. 66, p. 355-362, 2005**.**

UEDA, S.; IWAHASHI, Y. Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa Americana* and its cell culture. **J Nat. Prod**., v. 54, n. 6, p. 1677 1680, 1991

Desempenho de frangas de postura brancas alimentadas com rações com diferentes níveis de proteína e de lisina digestível na fase de recria (11 a 20 semanas de idade)

Pedro Moraes Rezende[1,4], Bruno Moreira dos Santos[2,4], Lídia Lopes Ferreira[2,4], Renato de Lima César[1], Lia Sayuri Inumaru[1,4], Alessandra Gimenez Mascarenhas[3], Jose Henrique Stringhini[3,4, 5]

[1]Acadêmico de Medicina Veterinária - UFG.
[2]Mestrando em Ciência Animal - UFG.
[3]Departamento de Produção Animal - EV/UFG.
[4]Bolsista CNPq
[5]Zootecnista UFT
[6]Orientador – henrique@vet.ufg.br

Palavras-chave: aminoácidos essenciais, ganho de peso, consumo de ração, produção de ovos

INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da avicultura, especialmente na genética, os recursos utilizados no desenvolvimento dos produtos avícolas tem tornado as aves extremamente eficientes nos seus objetivos de produção. As poedeiras mostram isso atingindo índices de produção cada vez mais impressionantes, atingindo marcas superiores a 320 ovos por ave alojada, o que significa máxima expressão de seu potencial.

A produção e o consumo de ovos têm crescido bastante nas últimas décadas. Esse crescimento, provavelmente, está relacionado ao aumento do consumo de ovos pela população, pois se constitui em excelente fonte de proteína e vitaminas de baixo custo.

A densidade nutricional da dieta fornecida e o peso corpóreo e sua influencia sobre a taxa de maturidade do aparelho reprodutor é variável e somente algumas vezes o peso da ave pode ser indicativo da atividade produtiva. Mais do que o peso corpóreo, a maturidade hipotalâmica é fator limitante para a puberdade (RENEMA et al., 2003).

É importante avaliar o desempenho das aves na fase de crescimento, pois o amadurecimento precoce das frangas induz à necessidade de programas alimentares que otimizem o desenvolvimento corporal, permitindo, dessa forma, a obtenção de frangas com peso ideal à maturidade sexual (MURAKAMI et al., 1997). Isso, conseqüentemente, refletirá em boa produtividade nas fases seguintes, especialmente durante o período de produção.

Com relação aos estudos com nutrição, artigos sobre as necessidades nutricionais nas fases de cria e recria ainda são escassos no Brasil, mas as Tabelas Brasileiras (ROSTAGNO et al., 2005) e os manuais das principais linhagens trazem informações bastante detalhadas sobre o conteúdo de nutrientes e de energia.

O fornecimento de nutrientes nos estádios iniciais do crescimento deve adequado para o desenvolvimento de tecidos específicos do corpo de uma ave. A poedeira atinge 82% do seu peso adulto às 15 semanas, sendo que a proteína é depositada, principalmente, nos músculos e no trato digestivo e a gordura, por sua vez, é depositada no tecido intramuscular. Da 16^{a} à 22^{a} semana de idade, a proteína é depositada para garantir o crescimento normal do ovário e oviduto e a gordura, presumivelmente, é depositada no abdômen (KWAKKEL, 1992).

A disponibilidade de aminoácidos sintéticos possibilita ao nutricionista formulações de rações para aves, não somente com base na exigência de proteína bruta, mas também ajustadas em relação às exigências de aminoácidos (JARDIM FILHO, 2008).

A suplementação da ração com aminoácidos essenciais objetiva assegurar o satisfatório fornecimento de nitrogênio para síntese de aminoácidos. O ração a ser formulada para o processo de desenvolvimento da poedeira na fase de cria e

de recria busca compatibilizar o peso ideal e idade ao primeiro ovo com suficientes reservas para suportar o período de postura (GARCIA, 2003).

A restrição de lisina ou de proteína em fases que antecedem o período de postura pode acarretar atraso no inicio da postura e produção de ovos com menor peso (KESHAVARZ & JACKSON,1992). A lisina é sintetizada naturalmente por plantas e microrganismos a partir do aspartato (LEHNINGER et al., 1990). As recomendações de lisina e de proteína bruta para frangas de 13 a 18 semanas de idade, segundo Rostagno et al. (2005) são respectivamente 0,483% e 14% de PB. Entretanto, os manuais das linhagens comerciais vêm constantemente apresentando valores superiores a estes, o que gera dúvida sobre o valor recomendado. Sendo assim, realizou-se esse trabalho para se determinar a relação entre proteína bruta e lisina digestível mais adequada para frangas brancas de postura.

ROSTAGNO et al. (2005) relataram que 89% da lisina total da ração correspondem à lisina digestível e recomendaram 796 mg ave-1 dia-1 de lisina digestível para poedeiras leves. Jardim Filho et al. (2008) observaram, em estudo com poedeiras de 24 a 28 semanas de vida, recebendo ração com 16% de PB, que 0,900% de lisina digestível na dieta melhorou a conversão alimentar.

JARDIM FILHO et al. (2004), trabalhando com poedeiras Lohmann (24 a 48 semanas de idade), alimentadas com 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9% de lisina digestível nas rações, encontraram efeito quadrático positivo para produção e massa de ovos com 0,7% de lisina digestível na ração ou ingestão de 595 a 598 mg de lisina por ave por dia.

São poucas as pesquisas realizadas para poedeiras na fase de pré-postura e pré-pico, principalmente sobre o balanço de nutrientes. Há grande deposição de nutrientes nessa fase com o propósito de adequar o organismo para a fase de alta produtividade. Para reduzir custos de produção e minimizar a excreção de produtos nitrogenados, pesquisas devem ser realizadas para obter melhor resposta para utilização do nitrogênio pelo organismo animal.

OBJETIVOS

Objetivou-se com esse experimento, avaliar os efeitos da combinação de níveis dietéticos de proteína bruta e de lisina digestível para frangas de poedeiras comerciais brancas, pelas seguintes variáveis: desempenho, consumo de ração e de nutrientes, produção de ovos, conversão alimentar (kg/dz e kg/kg), peso dos ovos, massa de ovos, relação lisina por ganho de peso, relação proteína por ganho de peso, relação lisina por massa de ovo, relação proteína por massa de ovo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Setor de Avicultura da EV/UFG com frangas de postura Dekalb White. As aves, pintainhas de postura brancas de linhagem comercial, foram adquiridas com um dia de idade de incubatório comercial e submetidas à fase de cria em granja comercial. Após dez semanas de idade foram alojadas em gaiolas de recria em grupos de seis aves por gaiola de 50 x 45 x 32 cm e submetidas às rações experimentais a partir de doze semanas de idade.

O manejo adotado foi o recomendado para a linhagem comercial escolhida até o inicio do período de postura, considerado como a produção do primeiro ovo. Em seguida, as aves foram submetidas a rações de produção únicas para todas as aves. No manejo das aves foi incluído a implantação de um programa de luz ajustado à iluminação natural, e a partir do inicio da postura foi realizada o acréscimo de 15 minutos por semana até atingir 17 horas de luz no pico de postura. Foram realizadas duas debicagens, uma precoce com 7 a 10 dias de idade, e outra realizada por volta da oitava ou nona semana.

As aves receberam as rações únicas para as fases inicial (1 a 6 semanas de idade) e recria I (6 a 11 semanas), e a dieta de postura a partir da postura dos primeiros ovos. Os níveis nutricionais aplicados para essas fases foram os sugeridos por ROSTAGNO et al. (2005).

O experimento foi conduzido para avaliar níveis de lisina digestível de recria 13 a 18 semanas de idade – ou início de postura, com a produção do primeiro ovo.

Foram determinados o peso das aves a cada duas semanas até o aparecimento do primeiro ovo. Os dados de qualidade de ovos (peso do até as 45 semanas de idade e a produção de ovos serão controlados diariamente e calculada a percentagem de produção de ovos por dia.

As rações fornecidas e as sobras no período de recria foram pesadas semanalmente e calculado o consumo real da parcela. As rações foram fornecidas à vontade duas vezes ao dia, pela manhã (8:00h) e à tarde (16:00h). O delineamento experimental utilizado foi o em blocos casualizados com quatro tratamentos e quatro repetições, com 12 aves por parcela, totalizando 160 aves. O critério para estabelecimento dos blocos foi o peso das aves com 11 semanas de idade.

As rações experimentais foram calculadas a partir das rações basais isocalóricas (2900 EM kcal/kg) com dois níveis de proteína (14 e 16% PB) acrescentando-se 0%, 0,128%, 0,256% e 0,384% de L-Lisina-HCl seguindo as tabelas brasileiras (ROSTAGNO et al., 2005). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4 com dois níveis de proteína bruta (14% e 16%) e quatro níveis de lisina digestível (0,484; 0,584; 0,684, e 0,784% Lys digestível) com oito grupos experimentais e quatro repetições com 10 aves cada. O peso das aves foram determinados quinzenalmente até o primeiro ovo e o consumo de ração controlado semanalmente. O consumo de ração ave/dia; a produção de ovos; a conversão alimentar (kg/kg e kg/dúzia de ovos); o peso dos ovos; a massa de ovo; a relação lisina e massa de ovo; o consumo de nutrientes (proteína, energia, lisina) e a gravidade especifica foram avaliados semanalmente. As análises estatísticas foram realizadas com o programa SAEG.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 verificou-se interação significativa para consumo de ração na 13ª, 17ª e 19ª semanas de vida das aves, expressas na Tabela 2.

Tabela 1 - Consumo de ração semanal e peso médio das aves.

	Consumo médio de ração (g/ave/dia)									Peso médio das aves (g)				
	13	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**inicial**	**13**	**15**	**17**	**19**	**20**
PB (%)														
14	52,9	58,0	54,4	60,4	69,3	55,6	56,1	65,4	776	933	1039	1143	1238	1326
16	52,4	53,1	55,4	58,0	66,9	56,1	58,7	67,8	770	939	1052	1156	1241	1334
Lys														
0,484	52,3	56,7	55,4	59,5	66,5	60,3	59,2	67,3	781	936	1044	1152	1238	1326
0,584	52,6	51,2	53,2	59,3	73,7	55,8	61,7	65,5	760	927	1032	1140	1238	1316
0,684	51,1	53,7	57,8	58,0	62,8	54,6	60,4	66,3	787	952	1070	1179	1266	1367
0,784	54,6	56,7	53,1	60,1	69,4	52,8	56,1	67,3	763	929	1036	1128	1216	1312
PB	Ns	0,04	ns	0,15	Ns	Ns	0,10	0,30	ns	ns	Ns	ns	ns	ns
Lys	Ns	0,19	0,10	ns	0,29	0,13	0,01	ns	ns	ns	0,34	0,20	0,23	0,12
PBxLys	0,04	0,34	0,13	0,08	0,015	0,39	0,01	0,16	ns	ns	Ns	0,23	ns	ns
CV (%)	8,23	11,68	7,45	7,75	16,67	11,13	7,50	9,82	4,78	4,13	4,19	4,13	3,84	3,62

Tabela 2 - Desdobramento da interação proteína x lisina digestível para consumo de ração aos 13, 17 e 19 semanas.

	Consumo com 13 semanas[1]					Consumo com 17 semanas[2]					Consumo com 19 semanas[3]			
	0,484	**0,584**	**0,684**	**0,784**		**0,484**	**0,584**	**0,684**	**0,784**		**0,484**	**0,584**	**0,684**	**0,784**
14	55,8	53,0	48,1	54,5	14	58,4	72,0	74,4	72,3	14	59,2	63,7	60,5	55,5
16	48,7	52,2	54,23	54,6	16	74,5	75,3	51,1	66,5	16	58,7	56,1	59,6	58,7

1 - $125,026-0,264025x-0,00023197x^2$; 2- 45,0446+4,4071X; 3- 14% -39,5714+0,300000x; 4- CR19: 16% - $17,6964+0,146071x+0,000125000x^2$

Para as dietas com 14% PB, o consumo diminuiu de forma quadrática na 13ª semana até 0,569% Lys digestível nas rações, aumentou linearmente na 17ª e na 19ª semanas com a elevação dos níveis dietéticos de lisina. Para as dietas com 16% PB houve incremento no consumo até 0,584% Lys digestível na 19ª semana de idade. O nível de PB das dietas influenciou o consumo de ração somente na 14ª semana de idade com maior valor para dietas com 14% PB. O peso das aves não foi afetado pelos tratamentos.

Na Tabela 3 não foram observadas diferenças significativas dos nives de lisina digestível e do conteúdo de proteína nas rações de recria no inicio de produção das aves, expresso como idade ao primeiro ovo e dias para atingir 50% d eprodução. Isto concorda com JARDIM FILHO et al. (2008) que avaliaram níveis nutricionais de lisina digestível em poedeiras Lohmann LSL no período compreendido entre a 16ª e a 25ª semanas de idade e também não constatou efeito dos níveis nutricionais adotados na idade ao primeiro ovo e idade ao atingir 50% de produção. VILAR DA SILVA et al. (2000) verificaram que aves leves submetidas à ração com 0,65% de lisina atingiram 50% de produção aos 157 dias e outras, nos demais níveis, aos 160 dias. Os autores afirmam que a composição corporal é mais importante que o peso no preparo do organismo da ave para a produção de ovos.

Tabela 3 - Idade ao primeiro ovo e idade a 50 % de produção das aves.

PB	**Primeiro ovo**	**50 % produção**
14	135,43	140,06
16	136,56	140,81
LYS		
0,484	135,12	140,75
0,584	136,75	140,47
0,684	136,12	140,00
0,784	136,00	140,50
PB	ns	ns
Lys	ns	ns
PB x Lys	ns	ns
CV(%)	2,08	2,09

CONCLUSÃO

Não ocorreu efeito dos níveis de proteína e lisina digestível o que sugere que 14% PB e 0,484% Lys digestível foram adequadas para o desenvolvimento da ave até o inicio da postura.

Dietas contendo níveis de 14% de proteína bruta com 0,5% de lisina digestível se mostraram adequadas para poedeiras leves de 11 a 20 semanas de idade.

REFERÊNCIAS

GARCIA JRM. SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, Campinas, 2003. Anais... Campinas: CBNA, 2003. p. 35-56.

JARDIM FILHO, R. M.; STRINGHINI, J. H.; ANDRADE, M. A.; BARINI, A. C.; LEANDRO, N. S. M.; CAFÉ, M. B. Qualidade de ovos, parâmetros bioquímicos sanguíneos e desenvolvimento do aparelho reprodutor de poedeiras comerciais Lohmann LSL alimentadas com níveis crescentes de lisina digestível. Acta Scientiarum, v.30, n.1, p. 25-31, 2008.

KWAKKEL, R.P. Nutritional studies on body development and performance in laying-type pullets and hens: a multiphasic approach. In: WOURLD'S POULTRY CONGRESS, 19, 1992, Amsterdam. *Proceedings*... Amsterdam, 1992. p.480-484.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1990.

MURAKAMI, A. E., KUSSAKAWA, K.C.K.,FURLAN, A.C., MARTINS, E.N., SCAPINELLO, C.L. Influência dos níveis protéicos na fase de cria e recria de frangas de reposição sobre o desempenho produtivo na fase de produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, p. 955-958, 1997.

ROSTAGNO HS. ALBINO, L.F.T., DONZELE, J.L., GOMES, P.C., OLIVEIRA, R.F., LOPES, D.C., FERREIRA, A.S., BARRETO, S.L.T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**. Composição de alimentos e Exigências Nutricionais, Viçosa: Imprensa Universitária - UFV, 2005. 186p.

SAEG®, 2001. Sistema para análise estatísticas e genéticas. Viçosa: UFV, 2001.

RENEMA R.A.; ROBINSON, J.J.; FEDDES, J.J.R et al. The effects of genetic strain and feeding regimen on carcass morphology traits at sexual maturity. In: ROBINSON, J.J; FASENKO, G.M.; RENEMA R.A. (ed) **New developments in reproduction and incubation of broiler chickens**. Spotted Cow Press: Alberta, 2003.

Pilha de areia com restrição de altura e altura limite variável

Vanuildo S. de Carvalho [1] , Álvaro de A. Caparica[1,†] , Ronald Dickman[2]

[1] Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, CEP 74001-970, Goiânia-GO, Brasil
[2] Departamento de Física, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 30161-970, Belo Horizonte -MG, Brasil
[†] E-mail: caparica@if.ufg.br
Palavras-chave: SOC, campo médio, simulação computacional

I. Introdução

Modelos de pilhas de areia são um emblemático exemplo de criticalidade auto-organizada (do inglês, *Self-Organized Criticality, SOC)* [1,2], um mecanismo de controle que possibilita a um sistema com um estado absorvente uma transição de fase em seu ponto crítico [3-5], sem a necessidade de ajuste de algum parâmetro [6]. SOC em uma pilha de areia construída lentamente corresponde a uma transição de fase de um estado absorvente para um estado ativo em um modelo que possui a mesma dinâmica local, mas com um número fixo de partículas [3,7-10]. Esta última classe de modelos é usualmente designada como pilhas de energia fixa [9,11-13].

Pelo ponto de vista teórico padrão, uma característica inconveniente dos modelos de pilha de areia é a não limitação do número de partículas por sítio. Isto complica uma tentativa de derivação de propriedades através de uma aproximação por sítios e descrições contínuas. Em uma pilha de areia estocástica de Manna [14,15], um sítio com $z \geq 2$ partículas é ativo, isto é, pode relaxar, cedendo duas partículas para os seus primeiros vizinhos. Isto sugere restringir o número de partículas por sítio a $z = 0, 1$ ou 2, como feito por Dickman, Tomé e de Oliveira em [16]. Neste trabalho, nós estudamos as propriedades críticas de um modelo unidimensional de pilha de areia restrita com número de partículas conservado semelhante, baseado no modelo de Oslo [17], que denominamos pilha de areia restrita com altura limite variável. Análises de pilhas de areia de energia fixa sem restrição de altura revelam que elas exibem uma transição de fase entre um estado absorvente e um estado ativo quando a densidade ζ é incrementada além do valor crítico [3,18,19]; nós encontramos que o mesmo é verdade no nosso modelo de pilha de areia com altura restrita. Dessa forma, o modelo restrito tem um comportamento crítico não trivial, e representa, devido a sua simplicidade, um sistema atrativo a análises de cunho teórico. Além disso, um estudo mais detalhado nos remete a questões de classes de universalidade em pilhas de areia e, mais geralmente, de transições de fase em sistemas conservados com estados absorventes [20].

II. Modelo

O modelo da pilha de areia restrita com altura limite variável é definido em uma rede unidimensional de tamanho *L* com fronteiras periódicas. A configuração do sistema é especificada pelo número de partículas z em cada sítio, sendo que $z \leq z_c$, onde z_c é a altura limite que assume os valores 2 ou 3. Sítios com $z = z_c$ são ativos e devem ser relaxados. Quando um sítio i relaxa, duas partículas movem-se randomicamente para os vizinhos mais próximos j e j' de i (j e j' não precisam ser distintos). Cada partícula transferida é aceita se ela não leva um sítio a ter mais partículas que a altura limite z_c permite. Se acontecer a perda de ao menos uma partícula pelo sítio ativo i, uma nova altura limite deve ser escolhida para ele dentro do conjunto $\{2, 3\}$. O próximo sítio a relaxar é escolhido de uma lista de sítio ativos, que deve naturalmente ser atualizada a cada evento. O incremento de tempo associado com cada queda é $\Delta t = 1/N_A$, onde N_A é o número de sítios ativos antes de cada evento. Δt é o tempo médio de espera para o próximo evento se nós escolhêssemos sítios cegamente, em vez de usar uma lista.

Estudaremos aqui uma lei de decaimento chamada independente [16], onde as transições que podem fazer com que um sítio seja mais que duplamente ocupado são apenas parcialmente realizadas.

III. Objetivos

Os objetivos deste trabalho são determinar se a pilha de areia com altura limite variável possui uma transição de fase de um estado absorvente para um estado ativo; calcular os possíveis expoentes críticos [21] relacionados a esse sistema e averiguar se esses expoentes pertencem à mesma classe de universalidades daqueles da pilha de Manna usual.

IV. Métodos

A. Solução da equação mestra através da aproximação de campo médio

A aproximação de campo médio considera que cada constituinte do sistema (no nosso caso, a pilha de areia) está submetido a um campo V constante, substituindo a interação entre os componentes, de forma que nenhuma estrutura espacial é levada em conta. Dentro dessa aproximação, as partículas que formam o sistema não se “enxergam”, pois a interação ocorre apenas através deste campo efetivo, de

modo que podemos dizer que estas partículas são independentes [22]. Essas considerações permitem simplificar a seguinte equação diferencial

$$\frac{d}{dt}P(n,t) = \sum_{m(\neq n)} \{W(n,m)P(m,t) - W(m,n)P(n,t)\}, \quad (1)$$

conhecida como equação mestra [23,24]. Nela $P(n,t)$ representa a probabilidade de o sistema estar na configuração n no instante t e $W(m,n)$ é a taxa de transição desta configuração para a configuração m. Antes de resolver a equação mestra devemos calcular todas as taxas W, o que pode ser feito através das regras do modelo em estudo.

B. Simulação computacional

Nossa simulação consiste em, fazendo uso do método do estado quase-estacionário [25], usar redes de L sítios com condições de contorno periódicas, preenchidas com N partículas, de modo que a densidade de partículas, que será o parâmetro de controle do modelo, é dada por $\zeta = N/L$. A condição inicial é gerada da seguinte forma: sorteamos um sítio e sobre ele depositamos uma partícula. Se a diferença $z_c - z$ para esse sítio for igual a um, ele receberá mais uma partícula e tornar-se-á ativo, de maneira que guardaremos sua posição numa lista de sítios ativos. Por outro lado, caso ele seja ativo nenhuma partícula a mais será depositada sobre ele, respeitando assim a restrição de altura.

Sorteamos um dos sítios da lista de sítios ativos e sobre ele empregamos a dinâmica do modelo definida na seção II. O tempo é contado em intervalos igualmente espaçados, usando a técnica do histograma logarítmico. Um tempo máximo, t_m, é estipulado para cada tamanho de rede, assim como um número de repetições N_r sobre a qual calcularemos a média das quantidades estudadas.

V. Resultados

A. Aproximação de campo médio por um sítio

Neste nível de aproximação, há sete variáveis $p_{ij} = \binom{i}{j}$ com $i = 0,1,2,3$ e $j = 2,3$ representando a probabilidade de um sítio ter exatamente i partículas e altu-

ra limite j, sendo que $i \leq j$. Há apenas cinco variáveis independentes, decorrentes da restrição de normalização,

$$\sum_{j=2}^{3}\sum_{i=0}^{j} p_{ij} = \sum_{j=2}^{3}\sum_{i=0}^{j} \binom{i}{j} = 1, \quad (2)$$

e da densidade fixa,

$$\zeta = \sum_{j=2}^{3}\sum_{i=0}^{j} i p_{ij} = \sum_{j=2}^{3}\sum_{i=0}^{j} i \binom{i}{j}. \quad (3)$$

Nós começamos a análise enumerando, na Tabela 1, as possíveis transições entre os estados de um único sítio. Cada transição requer uma configuração local específica (de dois ou três sítios, dependendo do processo), e uma redistribuição particular das duas partículas liberadas quando um sítio ativo relaxa. A configuração local e a escolha da redistribuição são eventos independentes. Na aproximação por um sítio todas as probabilidades conjuntas de dois ou mais sítios são fatorizadas: $\binom{i \quad k}{j \quad l} \to \binom{i}{j}\binom{k}{l}$ e $\binom{i \quad k \quad m}{j \quad l \quad n} \to \binom{i}{j}\binom{k}{l}\binom{m}{n}$.

Tabela 1: Transições entre estados de um único sítio. "X" denota uma transição impossível; os elementos diagonais são irrelevantes.

To: For:	$\binom{0}{2}$	$\binom{0}{3}$	$\binom{1}{2}$	$\binom{1}{3}$	$\binom{2}{2}$	$\binom{2}{3}$	$\binom{3}{3}$
$\binom{0}{2}$		X	X	X		X	X
$\binom{0}{3}$	X		X	X		X	X
$\binom{1}{2}$		X		X		X	
$\binom{1}{3}$	X		X			X	
$\binom{2}{2}$		X		X		X	
$\binom{2}{3}$	X		X		X		
$\binom{3}{3}$	X	X	X		X		

Para ilustrar como as taxas de transições são calculadas, nós consideraremos alguns exemplos. A transição $\binom{0}{2} \to \binom{1}{2}$ requer a configuração inicial $\binom{0 \quad 2}{2 \quad 2}$ ou

$\binom{0}{2}\ \binom{3}{3}$, isto é, um sítio vazio com um vizinho ativo. Justamente uma das duas partículas do sítio ativo deve migrar para o sítio vazio; em *d* dimensões isto ocorre com a probabilidade $(2d-1)/2d^2$. Logo, a taxa de transição de $\binom{0}{2} \rightarrow \binom{1}{2}$ é

$$2d\frac{2d-1}{2d^2}\left[\binom{0}{2}\binom{2}{2}+\binom{0}{2}\binom{3}{3}\right]=\frac{2d-1}{d}\binom{0}{2}\left[\binom{2}{2}+\binom{3}{3}\right], \quad (4)$$

onde o fator $2d$ representa o número de primeiros vizinhos.

Considere agora a transição $\binom{2}{2} \rightarrow \binom{0}{2}$. Há dois modos mutuamente exclusivos de essa transição ser realizada. Em um, ambas as partículas deslocam-se para o mesmo sítio (a probabilidade de este evento acontecer é $1/4d^2$); se a diferença $z_c - z$ para o sítio vizinho do ativo for maior que um, duas partículas serão transferidas como requerido. Portanto, as configurações iniciais são $\binom{0\ \ 0}{2\ \ 3}$, $\binom{0\ \ 2}{3\ \ 2}$ ou $\binom{1\ \ 2}{3\ \ 2}$; e a taxa por este caminho é

$$\frac{1}{2}2d\frac{1}{4d^2}\left[\binom{0}{2}\binom{2}{2}+\binom{0}{3}\binom{2}{2}+\binom{1}{3}\binom{2}{2}\right]=\frac{1}{4d}\binom{2}{2}\left[\binom{0}{2}+\binom{0}{3}+\binom{1}{3}\right], \quad (5)$$

com o fator $1/2$ representando a probabilidade de a altura limite do sítio ativo permanecer igual a dois. Por outro lado, as partículas podem se deslocar para sítios diferentes, sendo que estes devem ter ao menos uma posição vaga. As configurações iniciais requeridas são então $\binom{2^*\ \ 2\ \ 2^*}{2\ \ 2\ \ 2}$, $\binom{2^*\ \ 2\ \ 3^*}{2\ \ 2\ \ 3}$ ou $\binom{3^*\ \ 2\ \ 3^*}{3\ \ 2\ \ 3}$, onde 2^* e 3^* denotam, respectivamente, sítios com $z<2$ e $z<3$. A taxa de transição por este caminho é

$$\frac{2d-1}{4d}\binom{2}{2}\left[\binom{2^*}{2}+\binom{3^*}{3}\right]^2. \quad (6)$$

Calculando as taxas para as transições remanescentes e utilizando a equação (1), nós obtemos as equações de evolução dos estados dos sítios da rede. Para os estados $\binom{0}{2}$ e $\binom{2}{3}$ elas são dadas, respectivamente, por

$$\frac{d}{dt}\binom{0}{2} = \frac{1}{4d}\binom{2}{2}\left[\binom{0}{2} + \binom{0}{3} + \binom{1}{3}\right] + \frac{2d-1}{4d}\binom{2}{2}\left[\binom{2^*}{2} + \binom{3^*}{3}\right]^2 - \frac{4d-1}{2d}\binom{0}{2}\left[\binom{2}{2} + \binom{3}{3}\right], \quad (7)$$

e

$$\frac{d}{dt}\binom{2}{3} = \frac{1}{2d}\left[\binom{0}{3} + 2(2d-1)\binom{1}{3} - (4d-1)\binom{2}{3}\right]\left[\binom{2}{2} + \binom{3}{3}\right] + \frac{1}{4d}\left\{1 + 2(2d-1)\left[\binom{2}{2} + \binom{3}{3}\right]\right\}\left[\binom{1}{2} + \binom{2}{3}\right]\binom{3}{3}. \quad (8)$$

A solução das equações diferenciais acima, juntamente com as equações para $\binom{0}{3}$, $\binom{1}{2}$, $\binom{1}{3}$, $\binom{2}{2}$ e $\binom{3}{3}$, não é dada em termos de funções elementares. Porém uma solução numérica para elas é possível. Para fazer isso observamos primeiro que esse conjunto de equações diferenciais não é independente, em razão das equações (2) e (3). Logo o nosso conjunto de equações independentes é reduzido a um número de cinco equações. Considerações de homogeneidade da rede com a qual estamos tratando e da simetria das equações para $\binom{0}{2}$, $\binom{0}{3}$, $\binom{1}{2}$ e $\binom{1}{3}$ permitem obter todas as propriedades da pilha de areia restrita com altura limite variável pela solução de três equações diferenciais independentes para $\binom{2}{2}$, $\binom{2}{3}$ e $\binom{3}{3}$. As equações para estas três variáveis podem ser colocadas na seguinte forma:

$$\frac{d}{dt}\binom{2}{2} = \Gamma_1\left[\binom{2}{2}, \binom{2}{3}, \binom{3}{3}; \zeta; d\right], \quad (9)$$

$$\frac{d}{dt}\binom{2}{3} = \Gamma_2\left[\binom{2}{2}, \binom{2}{3}, \binom{3}{3}; \zeta; d\right], \quad (10)$$

e

$$\frac{d}{dt}\binom{3}{3} = \Gamma_3\left[\binom{2}{2}, \binom{2}{3}, \binom{3}{3}; \zeta; d\right], \quad (11)$$

onde Γ_i com $i = 1, 2$ e 3 representam as funções resultantes das exclusões de variáveis descritas acima. As equações (9), (10) e (11) são facilmente resolvidas numericamente por um algoritmo apropriado como o de Runge-Kutta de quarta ordem [26]. Considerando agora o caso unidimensional (i.e., $d = 1$) e definindo o parâmetro de ordem ρ como a probabilidade de encontrar sítios ativos na rede, dado por

$$\rho = \binom{2}{2} + \binom{3}{3}, \quad (12)$$

obtém-se que para certos valores de ζ e para $t \gg 1$ ρ vai a zero como mostra a Figura 1 abaixo.

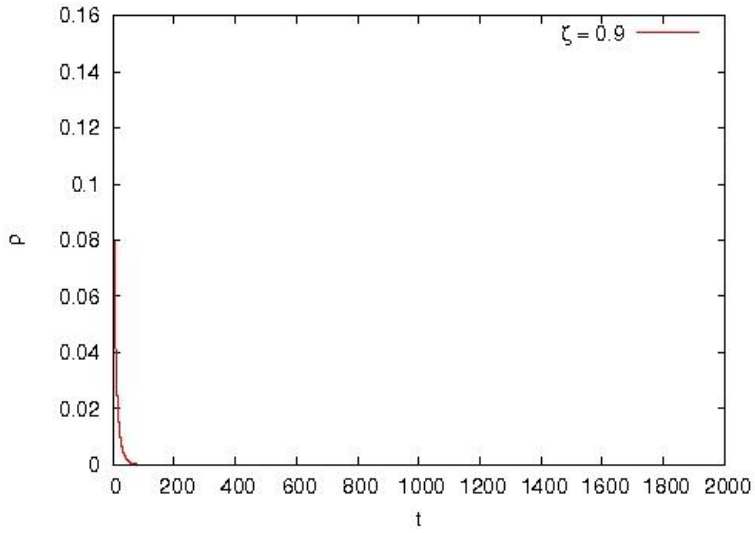


Figura 1: Parâmetro de ordem ρ em função do tempo t para ζ=0.9.

Pode-se perguntar qual a dependência de ρ com t quando este é relativamente pequeno. Isso pode ser respondido tomando o gráfico na Figura 1 na escala logarítmica para o eixo das ordenadas. Como se pode ver na Figura 2, ρ decresce exponencialmente com t, ou seja,

$$\rho \sim exp(-t/\tau). \quad (13)$$

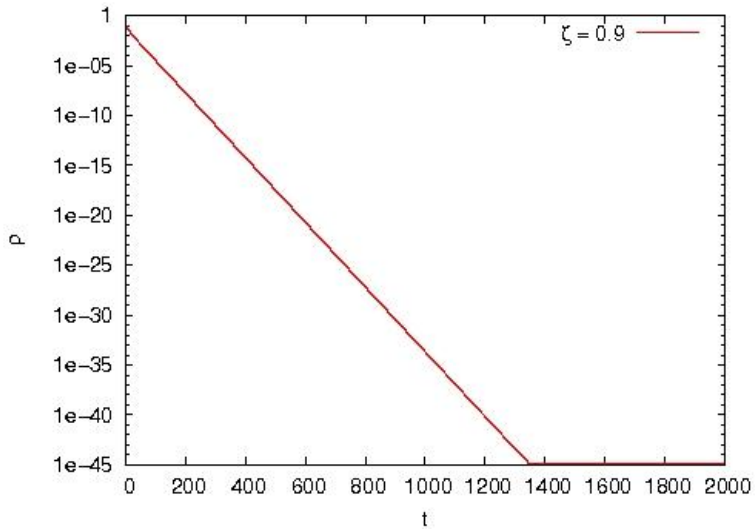


Figura 2: Comportamento de ρ na escala logarítmica em função de t quando ζ=0.9.

Há intervalos de valores de ζ, para os quais o parâmetro de ordem continua tendo um comportamento exponencial para t pequeno, mas não tende mais a zero quando se consideram tempos longos; contudo, seu valor ainda é estacionário (ver Figura 3). Esse comportamento de ρ é característico dos modelos de rede estuda-

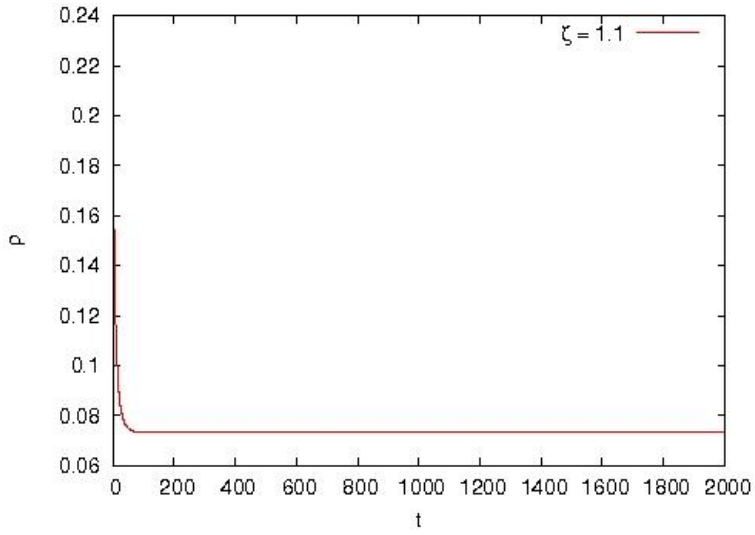


Figura 3: Parâmetro de ordem ρ em função do tempo t para ζ=1.1.

dos pela física estatística de sistemas fora do equilíbrio que apresentam uma transição de fase entre um estado absorvente e um estado ativo, como é o caso do processo de contato estudado inicialmente por Harris [27] ou a pilha de areia irrestrita [14,15]. Averiguando qual a dependência do parâmetro ρ com a densidade ζ para o estado estacionário (ver Figura 4), vemos que ela implica em uma transição de fase para a pilha de areia restrita com altura limite variável. O valor da densidade ζ onde

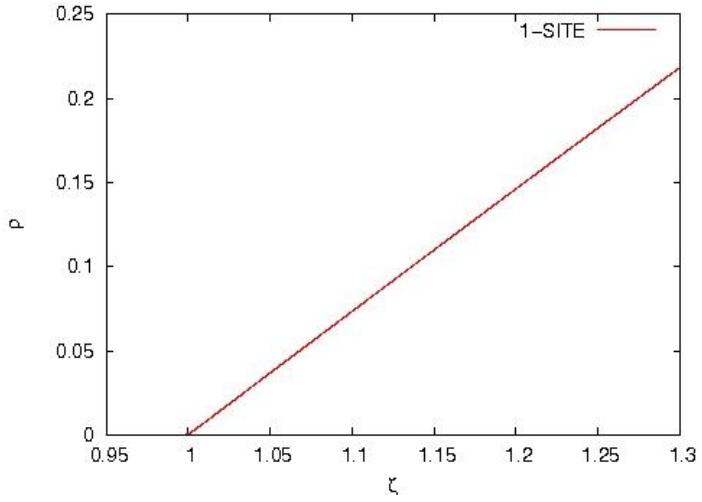


Figura 4: Comportamento do parâmetro de ordem ρ em função da densidade ζ, quando se considera uma aproximação por um sítio.

o parâmetro de ordem ρ deixa de ser diferente de zero, chamado de densidade crítica, pode ser calculado para esse modelo, fornecendo o valor $\zeta_c = 1.00$. A aproximação por um sítio também fornece o expoente crítico β, definido por $\rho \sim (\zeta - \zeta_c)^{\beta}$, como sendo $\beta = 1.00$. O mesmo acontece, no caso do expoente β, para o caso estudado por Dickman, Tomé e de Oliveira [16] para esse tipo de aproximação.

B. **Simulação computacional**

Nós fizemos simulação computacional da pilha de areia restrita estudada neste trabalho em uma dimensão. A configuração inicial é gerada pela distribuição aleatória de N partículas entre os L sítios, envitando que algum sítio seja ocupado por mais partículas que a altura limite z_c permite. Isto dá uma distribuição inicial es-

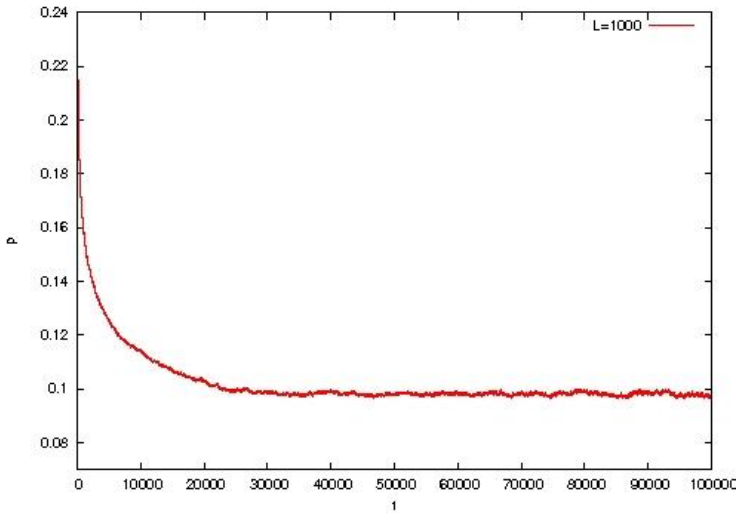


Figura 5: Comportamento obtido por simulação do parâmetro de ordem em função do tempo.

pacialmente homogênea e descorrelacionada. A dinâmica do modelo começa logo que todas as partículas são colocadas na rede. O número de partículas, como já foi dito, é conservado pela dinâmica.

O tamanho dos sistemas estudados vão desde $L = 100$ a $L = 2000$ sítios. Para cada L, estudamos um intervalo de densidades $\zeta = N/L$, onde N é o número de partículas na rede. Em todos os sistemas, foram usados $N_r = 2000$ realizações e o tempo máximo variou desde $t_m = 5 \times 10^4$ passos, para $L = 100$, a $t_m = 3 \times 10^5$ passos, para $L = 2000$.

Para determinar a densidade crítica ζ_c e os expoentes críticos β, $\beta/\nu_{\perp}$ e $\nu_{||}/\nu_{\perp}$ da pilha restrita em questão, nós estudamos a densidade temporal de sítios

ativos $\rho(t)$ (ver Figura 5) juntamente com a probabilidade de sobrevivência $P(t)$, que dá a taxa de sítios ativos presentes na rede. Tomando o gráfico de $lnP = lnP(t)$, como na Figura 6, vemos que P é do tipo

$$P(t) \sim exp(-t/\tau), \quad (14)$$

onde τ é chamado de tempo de sobrevivência. Para a aproximação por um sítio vista na seção anterior, a probabilidade de sobrevivência era definida como $P(t) = \binom{2}{2} + \binom{3}{3}$. O resultado em (14) está em acordo, ao menos qualitativamente, com o encontrado lá para essa grandeza, embora, como veremos, a aproximação por um sítio não forneça resultados numéricos exatos.

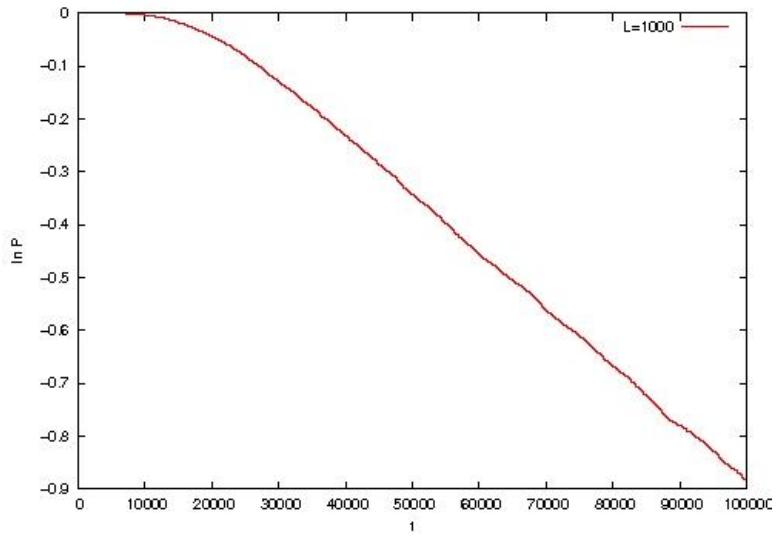


Figura 6: Evolução da probabilidade de sobrevivência para um sistema de tamanho L=1000 e ζ=1.630.

A densidade ζ (ou mesmo τ) em estudos simulacionais não pode assumir valores continuamente, pois para cada tamanho só podemos variá-la em submúltiplos deste. Desta forma, o que obtemos ao calcular os valores de ρ para o estado estacionário é um conjunto de pontos como aquele mostrado na Figura 7. Já que é razoável esperar que nenhuma descontinuidade esteja presente no comportamento do parâmetro de ordem ρ, fizemos uma interpolação quadrática (i.e., $\rho = a_1 + a_2\zeta + a_3\zeta^2$) com os pontos calculados através de simulação para dispor de valores que não são acessíveis para um determinado tamanho.

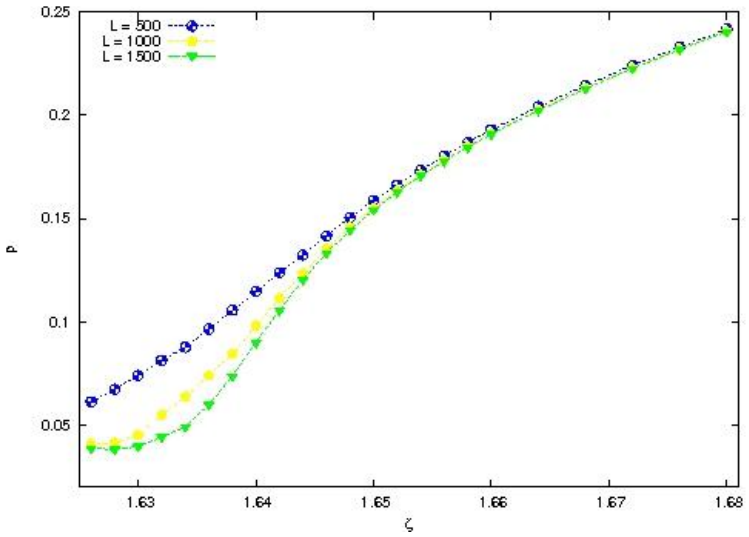


Figura 7: Comportamento do parâmetro de ordem ρ em função de ζ para L=500, 1000 e 2000.

De posse disso, calculamos a dependência do parâmetro de ordem ρ em função do tamanho L para diversos valores de ζ como mostra a Figura 8. Sabendo que ρ e τ são governados, respectivamente, pelas relações $\rho(\zeta, L) = L^{-\beta/\nu_\perp}\boldsymbol{C}\left(L^{1/\nu_\perp}\Delta\right)$ e $\tau(\zeta, L) = L^{\nu_{||}/\nu_\perp}\boldsymbol{R}\left(L^{1/\nu_\perp}\Delta\right)$ [21], onde $\Delta \equiv \zeta - \zeta_c$ e $\boldsymbol{C}$ e $\boldsymbol{R}$ são funções de escala; no ponto crítico ($\Delta = 0$) devemos ter $\rho(\zeta_c, L) \sim L^{-\beta/\nu_\perp}$ para o parâmetro de ordem, assim como $\tau(\zeta_c, L) \sim L^{\nu_{||}/\nu_\perp}$ para o tempo de sobrevivência. A partir disso determinamos, primeiramente, o valor de ζ_c e $\beta/\nu_\perp$ identificando a curva que tem o melhor comportamento de uma reta quando $\rho = \rho(\zeta_c, L)$ é representado em uma escala log-log.

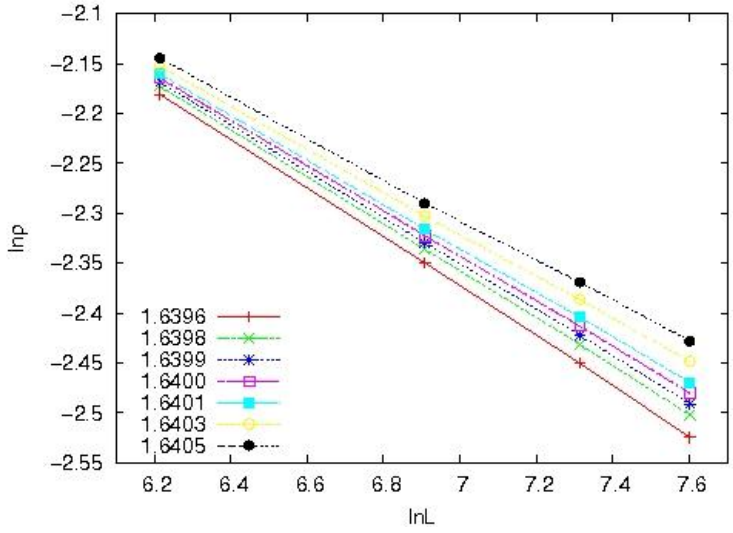


Figura 8: Densidade estacionária de sítios ativos versus tamanho de sistema para diversos valores de densidade.

Encontramos $\zeta_c = 1.6400$ e $\beta/\nu_\perp = 0.227(1)$, onde o número entre parênteses representa a barra de erros referente ao último algarismo significativo. Utilizando o

mesmo procedimento para τ calculamos o expoente relacionado a essa grandeza, para $\zeta = \zeta_c$, como sendo $\nu_{||}/\nu_{\perp} = 1.44(3)$. Esse expoente é o coeficiente angular da reta mostrada na Figura 9.

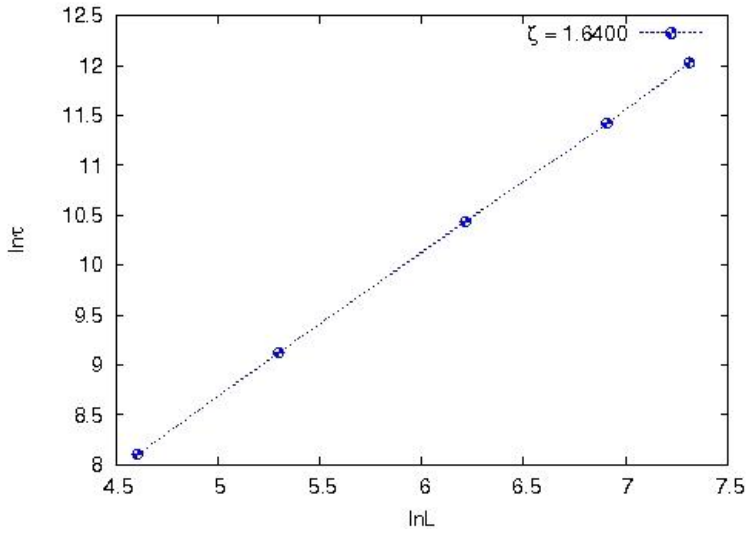


Figura 9: Comportamento em lei de potência do tempo de sobrevivência em função do tamanho do sistema para a densidade crítica.

Para determinar o expoente crítico β, procuramos encontrar primeiro o expoente $1/\nu_{\perp}$. Isso foi feito plotando $L^{\beta/\nu_{\perp}}\rho(\zeta, L)$ versus $L^{1/\nu_{\perp}}\Delta$ para vários tamanhos de sistema e tentando obter algum valor de $1/\nu_{\perp}$ onde se desse o melhor colapso de dados. Na Figura 10 ilustramos o bom colapso obtido para $1/\nu_{\perp} = 0.70(4)$. Com isso e de posse do valor de $\beta/\nu_{\perp}$, determinamos $\beta = 0.322(5)$.

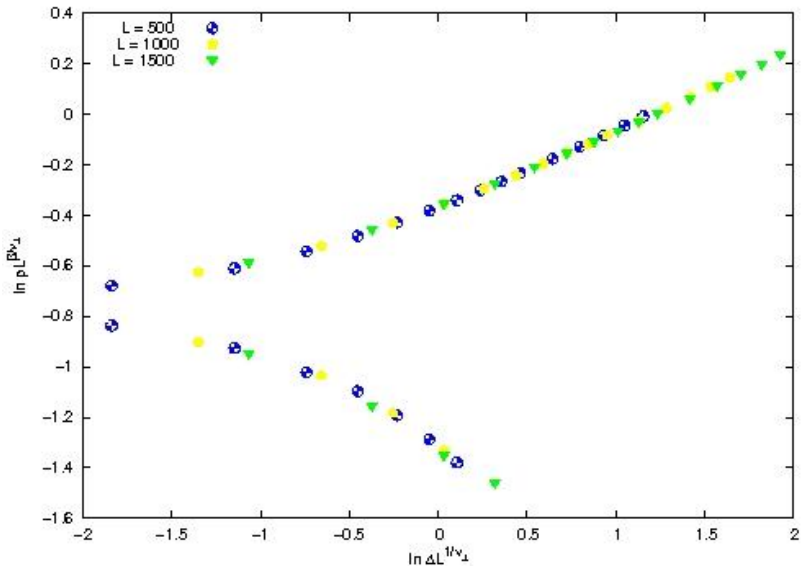


Figura 10: Curva de escala da densidade de sítios ativos para a pilha restrita com altura limite variável unidimensional.

Pela análise de aproximação por um sítio, a densidade crítica ζ_c e o expoente β tinham o valor da unidade, o que difere dos valores encontrados para eles através de simulação numérica, que deve dar os expoentes corretos. Isso ocorreu em razão de a aproximação por um ou mais sítios desprezar a correlação que há entre estes em um sistema como uma pilha de areia ou nos sistema com que a física estatística lida, como o modelo de Ising que pertence à classe dos sistemas estudados pela física estatística de equilíbrio [24]. Contudo a análise de aproximação por sítios não é de todo inútil, pois ela consegue captar as propriedades qualitativas dos modelos, como a transição de fase, além de indicar o valor inicial de ζ a partir do qual devemos iniciar a simulação para encontrar os possíveis expoentes críticos do sistema com o qual estamos lidando. A Tabela 2 abaixo traz uma comparação entre os expoentes críticos obtidos neste trabalho para a pilha de areia restrita com altura limite variável e outros expoentes de modelos de pilhas unidimensionais. É possível ver que os expoentes obtidos aqui parecem diferir muito, na maioria dos casos, daqueles encontrados para outros modelos.

Tabela 2: Expoentes críticos para vários modelos de pilhas de areia em 1D (uma dimensão) [16].

Modelo	$\beta/\nu_{\perp}$	$\nu_{\|\|}/\nu_{\perp}$	β
Independente 1D	$0.247(2)$	$1.45(3)$	$0.412(4)$
Cooperativo 1D	$0.245(5)$	$1.54(5)$	$0.417(1)$
Irrestrito 1D	$0.239(1)$	$1.66(7)$	$0.42(2)$
Presente trabalho	$0.227(1)$	$1.44(3)$	$0.322(5)$

VI. **Conclusão**

Nós estudamos o comportamento de uma pilha de areia unidimensional restrita de energia fixa que segue uma dinâmica semelhante à pilha de areia independente da referência [1], mas com uma altura limite $z_c \epsilon \{2,3\}$ variável. Como vimos, ela exibe uma transição de fase de um estado absorvente para um estado ativo para um determinado valor de densidade ζ_c. A aproximação por um sítio não forneceu um valor muito preciso para a densidade crítica ζ_c, mas predisse corretamente a natureza contínua da transição de fase de primeira ordem, já que ela se apresentou com uma descontinuidade na primeira derivada do parâmetro de ordem.

A comparação dos resultados para os expoentes críticos expressos na Tabela 2 atestam uma forte dependência das regras da dinâmica sobre o comporta-

mento crítico do modelo, como acontece para o modelo de BTW [1] e de Oslo. Esses resultados, somados a outros, parecem nos conduzir à conclusão de que modelos como a pilha de areia de Manna não possuem a mesma robustez de sua universalidade quanto aqueles da classe da percolação direcionada [28], que se mantêm mesmo com variações em sua dinâmica.

VII. **Bibliografia**

[1] P. Bak, C. Tang, and K. Wiesenfeld, Phys. Rev. Lett. 59, 381 (1987).

[2] D. Dhar, Physica A **263**, 4 (1999).

[3] R. Dickman, M. A. Muñoz, A. Vespignani, and S. Zapperi, Braz. J. Phys. **30**, 27 (2000).

[4] M. A. Muñoz, R. Dickman, R. Pastor-Satorras, A. Vespignani, and S. Zapperi, in *Modeling Complex Systems*, edited by J. Marro and P. L. Garrido, AIP Conf. Proc. 574 (AIP, Melville,NY, 2001); Phys A **306**, 90 (2002).

[5] R. Dickman, Physica A (2002).

[6] G. Grinstein, in *Scale Invariance, Interfaces and Nonequilibrium Dynamics*, Vol. 366 of *NATO Advanced Study Institute, Series B: Physics*, edited by A. McKane *et al.* (Plenum, New York, 1995).

[7] C. Tang and P. Bak, Phys. Rev. Lett. **60**, 2347 (1988).

[8] A. Vespignani and S. Zapperi, Phys. Rev. Lett. **78**, 4793 (1997); Phys. Rev. E **57**, 6345 (1998).

[9] R. Dickman, A. Vespignani, and S. Zapperi, Phys. Rev. E **57**, 5095 (1998).

[10] A. Vespignani, R. Dickman, M. A. Muñoz, and Stefano Zapperi, Phys. Rev. Lett. **81**, 5676 (1998).

[11] M. A. Muñoz, R. Dickman, A. Vespignani, and Stefano Zapperi, Phys. Rev. E **59**, 6175 (1999).

[12] A. Chessa, E. Marinari, and A. Vespignani, Phys. Rev. Lett. **80**, 4217 (1998).

[13] A. Montakhab and J. M. Carlson, Phys. Rev. E **58**, 5608 (1998).

[14] S. S. Manna, J. Phys. A **24**, L363 (1991).

[15] S. S. Manna, J. Stat. Phys. **59**, 509 (1990).

[16] R. Dickman, T. Tomé and M. J. de Oliveira, Phys. Rev. E 66, 016111 (2002).

[17] K. Christensen and N.R. Moloney. *Complexity and Criticality*, Imperial College Press, (2005).

[18] A. Vespignani, R. Dickman, M. A. Muñoz, and S. Zapperi, Phys. Rev. E **62**, 4564 (2000).

[19] R. Dickman, M. Alava, M. A. Muñoz, J. Peltola, A. Vespignani, and S. Zapperi, Phys. Rev. E **64**, 056104 (2001).

[20] M. Rossi, R. Pastor-Satorras, and A. Vespignani, Phys. Rev. Lett. **85**, 1803 (2000).

[21] P. Grassberger and A. de la Torre, Ann. Phys. (N.Y.) **122**, 373 (1979).

[22] W. G. Dantas, *Estudo de propriedades críticas para modelos com estados absorventes*. Dissertação apresentada ao Instituto de Física, UFF, (2006).

[23] T. Tomé e M. J. de Oliveira, *Dinâmica Estocástica e Irreversibilidade*, Edusp, São Paulo, 2001.

[24] Sílvio R. A. Salinas, *Introdução à Física Estatística*, Edusp, São Paulo, 1999.

[25] R. Dickman and M. M. de Oliveira, Phys. Rev. E **71**, 016129 (2005).

[26] Numerical Recipes Software, *Numerical Recipes*, Cambridge University Press, UK.

[27] T. E. Harris, *Ann. Probab.* **2**, 969 (1974).

[28] S. R. Broaddbent e J. M. Hammerley, *Proc. Camb. Phil. Soc.* **53**, 629 (1957).

Levantamento das alterações anatomo-patológicas do útero de mulheres autopsiadas

Janaina Valadares Guimarães, Maína Terra Comparini, Ruy de Souza Lino Junior, Vicente de Paula Antunes Teixeira
IPTSP – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – UFG
FEN – Faculdade de Enfermagem – UFG
e-mail: mainaterra@hotmail.com

Palavras Chaves: útero, autópsia, processos patológicos.

INTRODUÇÃO

São vários os processos patológicos gerais (PPG) que acometem o útero, exibindo diferentes tipos de lesões, isoladas ou associadas a outros PPG.

Os pólipos cervicais são processos inflamatórios relativamente inócuos, que se apresentam em forma de pêra ou lisos e arredondados. Surgem, em sua maioria, no interior do canal endocervical, e medem em torno de 1 a 2 cm de diâmetro, projetando-se através dos orifícios externos. Os pólipos são compostos por estroma endocervical e glândulas frequentemente distendidas pela presença de muco, e podem estar associados à hemorragia vaginal irregular, por apresentar erosões ou ulcerações (STEVENS; LOWE, 2002).

Acredita-se que o estrogênio tenha um papel importante na etiologia dos pólipos (TAYLOR *et al.,*2003), pois se observa um aumento progressivo da incidência dos mesmos com o avançar da idade sendo, porém, mais comum entre mulheres da quarta e quinta década de vida e duas vezes mais comuns entre as mulheres na pós menopausa em relação ao período da menacme (GANGLIONE *et al.,* 1996).

Hemorragias intermenstrual espontânea ou durante o coito são frequentemente associadas ao pólipo endocervical em mulheres no período de pós menopausa. Além

da hemorragia, as inflamações e a metaplasia escamosa também acompanham os pólipos frequentemente (CRUM *et al*., 2000).

Outros PPG também frequentemente encontrados são os cistos de retenção, ou cistos de Naboth, resultantes do crescimento exagerado do epitélio escamoso de regeneração que obstrui os orifícios das glândulas endocervicais na zona de transformação. Esses cistos são recobertos por epitélio colunar secretor de muco, e podem ser vistos ou sentidos durante um exame, além de serem indicativos de infecção passada ou recente, ou de inflamação da cérvix ou após a cauterização nessa região (KUMAR *et al.,* 2008).

A inflamação na cérvix também é comum, e está relacionada a exposição constante da microbiota vaginal, resultando em infecções por diversos microorganismos, alguns transmitidos sexualmente, enquanto outros podem ser introduzidos por corpos estranhos (RUBIN, 2006)..

Na cervicite aguda, macroscopicamente, a cérvix apresenta-se vermelha, edemaciada e com pus no orifício externo (RUBIN, 2006). A erosão na cérvix nesses casos pode ser observada na infecção com o vírus herpes simples (STEVENS; LOWE, 2002). Na microscopia observa-se que os tecidos exibem um infiltrado extenso de leucócitos polimorfonucleares e edema no estroma (RUBIN, 2006). É na maioria das vezes assintomática podendo, no entanto, causar fluxo vaginal anormal, sinusorragia e dispareunia (CHAMBO FILHO *et al*., 2003).

Na cervicite crônica a mucosa é hiperemiada, e algumas vezes apresenta erosões no epitélio. Microscopicamente, observa-se que o estroma apresenta infiltrado mononuclear (linfócito e plasmócito), podendo ser encontrada em associação com infecções vaginais por Trichomonas, Candida, Gardenerella e gonococos (STEVENS; LOWE, 2002). O epitélio escamoso metaplásico da zona de transformação pode estender-se para as glândulas endocervicais, formando aglomerados de epitélio escamoso com núcleos levemente aumentados que devem ser diferenciados de carcinoma (RUBIN, 2006).

As alterações do crescimento e da diferenciação celular estão entre os PPG mais descritos no útero e apresentam grande importância clínica, como é o caso da hiperplasia encontrada no endométrio. As hiperplasias podem ser simples ou

complexas, levando-se em consideração anomalias citológicas e arquiteturais. Geralmente ocorrem de modo difuso, não necessariamente envolvendo todo o endométrio, podendo ainda ser focais ou difusas (PONTES; TRAIMAN; FRANCO, 2000).

As hiperplasias endometriais resultam no excesso de estrogênio, quer exógeno ou endógeno, apresentam um espectro de proliferação arquitetural e atípia citológica, variando em hiperplasia simples, complexa e atípica, e algumas constituem precursores do carcinoma de endométrio (KUMAR *et al.,* 2008). Relaciona-se à perda da heterozigosidade, que é mais frequentemente encontrada em lugares com hiperplasia endometrial do que em lugares de adenocarcinoma endometrial (YASUDA *et al.,* 2005).

Em mulheres obesas no período pós menopausa, há uma tendência ao desenvolvimento de hiperplasias e carcinoma endometrial, por causa da baixa produção de progesterona e estrógeno e da alta produção de andrógenos (AGORASTOS *et al.,* 2004). Outros estudos têm sugerido que mulheres com mais de 40 anos podem estar sujeitas a um maior risco de neoplasia endometrial assintomática do que as mulheres mais jovens (BEAL; STONE; BECKMANN; McASEY, 2007).

Ainda como partes dessas alterações destacam-se os leiomiomas uterinos, que são neoplasias benignas originadas nas células musculares lisas do miométrio, especialmente de mulheres em período reprodutivo (KUMAR *et al.,* 2008).

Os sarcomas do útero são pouco comuns e apresentam rápida evolução clínica, pior prognóstico, recidiva local frequente e metástases. São divididos em: leiomiossarcoma, sarcoma do estroma endometrial, sarcoma müllerianos mistos homólogos (carcinossarcoma), sarcomas müllerianos mistos heterólogos e outros sarcomas do útero (HALBE *et al.,* 2003) como os carcinossarcomas que também tem classificados como um subtipo de carcinoma endometrial indiferenciado (KOIVISTO-KORANDER; BUTZOW; KOIVISTO; LEMINEN, 2008).

O carcinoma cervical é a neoplasia maligna mais comum e, na maioria dos casos, está associada a fatores extrínsecos, isto é, relacionados ao ambiente e aos hábitos de vida. Infere-se a possibilidade de se empregar meios que afastem estes fatores de risco e diminuam a incidência desse tipo de carcinoma (LIMA; PALMEIRA; CIPOLOTTI, 2006).

A relação entre o carcinoma cervical e os hábitos sexuais: promiscuidade, número de filhos, início precoce da atividade sexual e infecções ginecológicas repetidas levaram à identificação do Papillomavirus humano (HPV) como fator causal (MUÑOZ *et al.,* 2003). Diversos fatores do meio ambiente, destacando o estilo de vida, têm importância no favorecimento de condições propícias à prevalência do vírus. Cerca de 70 tipos de HPV acometem o trato genital pelo contato sexual e atualmente tem sido a infecção sexualmente transmissível mais freqüente (TROTTIER H; FRANCO EL, 2006). No entanto, a variação de sua prevalência nas diferentes populações é ampla (oscilando de 1,4% a 25,6%), assim como a variação da freqüência dos diferentes tipos virais (CLIFFORD; GALLUS; HERRERO; MUNÕZ; SNIJDERS; VACCARELLA *et al.,* 2005).

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi descrever os principais processos patológicos gerais que acometem o útero de mulheres autopsiadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) foram revisados, retrospectivamente protocolos de autópsias completas realizadas no Hospital Escola da (HE), em Uberaba (MG), de 1970 a 2004. Foram realizadas, sempre pelos mesmos observadores, aleatoriamente e de acordo com protocolo previamente estabelecido. Nesse estudo, foram excluídos os protocolos incompletos e os indivíduos do sexo masculino e menor de um ano de idade e as mulheres HIV positivas. Coletou-se a idade, a cor, o gênero e os PPG encontrados no trato genital feminino descrito nos protocolos de mulheres autopsiadas.

Os PPG avaliados foram Patologia da Célula; (necrose ou ulceração); Alteração Local da Circulação (hemorragia, hiperemia); Processo Inflamatório (inflamação aguda ou crônica); Distúrbio no Crescimento e Diferenciação Celular (hipotrofia, hiperplasia, metaplasia, neoplasia).

Para a análise estatística foi elaborado um banco de dados eletrônico. A ocorrência dos PPG foi verificada utilizando-se a estatística descrita. As variáveis idade e cor das mulheres com ou sem alterações no trato genital inferior foram verificadas através do teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o “p” foi menor que 5% ($p<0,05$).

RESULTADOS

Foram revistos 2954 laudos de autopsias completas, sendo que 2262 (76,57%) destes foram excluídos, 1423 (48,17%) por se tratarem de autopsias masculinas, 746 (25,25%) de menores de um ano de idade ou crianças e 56 (1,9%) por estarem incompletos e 37 (1,25%) por se tratarem de mulheres HIV positivas. As 692 (23,43%) restantes foram incluídas nesse estudo. Dessas, 378 (54,62%) residiam em Uberaba, 138 (19,94%) em Minas Gerais, 36 (5,20%) em outro estado e as 140 (20,23%) demais de localização desconhecida (tabela 2).

Os laudos das autópsias foram avaliados e os diagnósticos clínicos registrados.

Tabela 1: Análise dos protocolos, quanto ao gênero masculino e feminino; crianças, menores de 1 ano, ignorados e mulheres HIV positivas autopsiados no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro de Uberaba durante o período de 1970 a 2004.

	n	(%)
Masculino	1423	(48,17%)
Feminino	692	(23,42%)
Crianças e menores de 1 ano	746	(25,25%)
Ignorados	56	(1,90%)
Mulheres HIV positivas	37	(1,25%)
Total	2954	(100%)

Tabela 2: Origem das pacientes em que analisamos os laudos das autópsias realizadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro de Uberaba, no período de 1970 a 2004.

Origem	n (%)
Uberaba	378 (54,62%)
Minas Gerais	138 (19,94%)
Outros estados	36 (5,20%)
Desconhecidas	140 (20,23%)
Total	692 (100%)

A mediana de idade das mulheres sem alterações ou com alterações no trato genital foi de respectivamente 47,23 e 47,37 anos. Não houve diferença entre os grupos (T=86222,500; p>0,05).

Em relação à cor das mulheres, também não foi observada uma diferença significativa entre os grupos sem ou com alterações no trato genital (p = 0,667).

Das 692 mulheres selecionadas, 260 (37,57%) apresentaram algum tipo de alteração no útero, ovário, vagina, vulva ou tuba uterina. Os achados nos úteros representaram 226 (86,92%) das alterações descritas no trato genital dessas mulheres, sendo que 181 (80,01%) referem-se aos PPG (hemorragia, inflamação aguda e crônica, hipotrofia, hiperplasia, neoplasia benigna e maligna) e as demais se referem a outras ocorrências como útero gravídico, puerperal, ausente e a outros achados tais como prolapso, malformação e corpo estranho.

Tabela 3: Distribuição das alterações do trato genital inferior das mulheres em que analisamos os laudos das autópsias realizadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro de Uberaba, no período de 1970 a 2004.

Origem	n (%)
Uberaba	378 (54,62%)
Minas Gerais	138 (19,94%)
Outros estados	36 (5,20%)
Desconhecidas	140 (20,23%)
Total	692 (100%)

De um total de 181 PPG descritos no útero, as alterações do crescimento e da diferenciação celular foram as mais comuns com 130 (71,82%) registros.

Na cérvix uterina a inflamação foi o PPG mais descrito, sendo 29 (16,02%) casos de cervicite crônica e 05 (2,76%) de cervicite aguda. Em seis (3,31%) casos os cistos de retenção estavam associados a cervicite crônica

A hipotrofia foi encontrada em 45 (24,86%) casos e a hiperplasia em 33 (18,23%). A maioria dos casos de hipotrofia ocorreu devido ao processo fisiológico senil. Encontrou-se associação com cervicite crônica em quatro (2,21%) casos, leiomioma em três (1,66%) casos e pólipo endometrial em um (0,55%) caso.

No endométrio, a hiperplasia foi frequentemente associada aos pólipos, cistos de retenção e a hemorragia com 8 (4,42%), 4 (2,21%) e 3 (1,66%) casos respectivamente. Os pólipos foram mais comuns no endométrio do que na endocérvix com 05 (2,76%) casos. Houve ainda a associação dos pólipos a neoplasia benigna, como o leiomioma em 4 (2,21%) casos.

As neoplasias representaram 35,91% de todas as alterações descritas no útero, sendo 53 (29,28%) casos de neoplasia benigna e 12 (6,63%) de neoplasia maligna. Os leiomiomas uterinos foram as neoplasias benignas mais comuns sendo descritos de acordo com sua localização: 37 (20,44%) intramurais, 18 (9,94%) subserosos e três (1,66%) submucosos. Em cinco (2,76%) casos houve a presença de mais de um subtipo de leiomioma.

Tabela 4. Freqüência dos Processos Patológicos Gerais que acometeram o útero de mulheres autopsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro de Uberaba, no período de 1970 a 2004.

Faixa etária	Hem	Infl. A	Infl. C	hipo	hiper	Neo M	Neo B	total
10-20	1	0	2	2	0	0	0	5
21-30	3	2	2	2	2	1	2	14
31-40	3	2	9	5	3	3	13	19
41-50	1	1	10	5	3	2	11	33
51-60	3	0	2	9	4	2	12	32
61-70	2	0	1	5	4	2	7	65
71-80	3	0	2	12	3	2	6	28
81-90	0	0	1	2	1	0	2	6
≥90	0	0	0	3	1	0	3	34
Total	16	5	29	45	21	12	53	181

Hem: hemorragia, Inf A.: inflamação aguda, Inf C: Inflamação crônica, Hipo: hipotrofia; hiper: hiperplasia; neo b. neoplasia benigna; neo M: neoplasia maligna

As neoplasias malignas mais comuns foram os carcinomas do colo uterino com sete (3,87%) casos, um (0,55%) caso de leiomiossarcoma, um (0,55%) de coriocarcinoma, um (0,55%) de adenocarcinoma do endométrio. Houve dois (1,10%) casos de metástase para o útero.

Em relação a ocorrência desses PPG relacionados a faixa etária, observou-se que a hemorragia acomete mulheres em duas faixas etárias distintas que variam de 21 a 40 anos e de 51 a 80 anos. A hipotrofia foi comum nas mulheres em faixa etária mais avançada 71-80 anos. A hiperplasia acometeu o grupo de mulheres na quinta e sexta décadas de vida.

As neoplasias ocorreram em mulheres entre a faixa etária de 31 a 60 anos, sendo que as neoplasias malignas foram também comuns em mulheres em faixa etária mais avançada 61 a 80 anos.

DISCUSSÃO

Na literatura existem poucos relatos sobre o estudo sistematizado do útero em material de autopsia. Os estudos clínicos, apesar de mais avançados, nem sempre fazem uma concordância com os achados anatomo-patológicos.

No presente estudo, as alterações do crescimento e da diferenciação celular e as inflamações foram os PPG mais freqüentes no útero de mulheres autopsiadas.

Das alterações descritas no útero, os leiomiomas foram vistos como os mais freqüentes (29,28%), sendo dos tipos intramural, subseroso e submucoso, sendo mais freqüente em mulheres entre a faixa etária de 31 a 60 anos. Em concordância com os nossos achados, outros estudos descreveram o leiomioma como a neoplasia benigna mais frequente, acometendo entre 30 a 50% das mulheres com mais de 30 anos, podendo também ocorrer desde a adolescência até a menopausa (BOZZINI; LIAO; PEREIRA *et al.,* 1997; KUMAR *et al.,* 2008; BRASILEIRO FILHO, 2006).

Em relação aos casos de neoplasia maligna, este estudo revelou 6,63 % das alterações descritas, sendo que 0,55% correspondeu ao leiomiossarcoma uterino em mulher na faixa etária entre 71 a 80 anos. Em contrapartida, uma maior freqüência dessa neoplasia foi descrita correspondendo a 1,5% das neoplasias malignas do útero, e ocorre sobretudo em mulheres entre 40 e 60 anos de idade (BRASILEIRO FILHO, 2006). Este resultado se deve ao fato que a maioria dos casos dessa neoplasia é diagnosticada acidentalmente em cirurgia de leiomioma (STEFANI; MAILLARD; STEANI, 2001), não sendo um achado comum em autopsia.

O leiomiossarcoma é a principal neoplasia mesenquimal maligna encontrada no útero (40%), seguido do carcinossarcoma (40%) e do sarcoma do estroma endometrial (15%). Os 5% restantes são constituídos por um grupo de sarcomas vascular, linfático e heterogêneo (KOIVISTO-KORANDER; BUTZOW; KOIVISTO; LEMINEN, 2008).

Em nosso estudo, observou-se 07 casos (3,87%) de carcinoma cervical, as mulheres acometidas apresentaram faixa etária que variou de 31 a 80 anos. Sabe-se que existe forte correlação desse tipo de câncer com a infecção pelo HPV (NG *et al*., 2003). Segundo dados do Instituto Nacional do câncer a estimativa da taxa de incidência do carcinoma cervical para 2008 no Brasil é de 19,18 casos para 100 mil mulheres, acometendo principalmente mulheres entre 25 e 59 anos (BRASIL, 2008).

Os casos de hiperplasia (11,60%) e de hemorragia no endométrio (8,84%) também foram freqüentes, acometendo mulheres com idade entre 51 e 70 anos, sendo que hemorragia também foi freqüente em mulheres jovens concordando assim com o relato de que as hiperplasias do endométrio representam cerca de 15% das afecções ginecológicas, e que ocorrem predominantemente em mulheres na perimenopausa, podendo no entanto acometer mulheres jovens ou na pós-menopausa. A hemorragia do endométrio incide preferencialmente mulheres acima de 35 anos de idade, e adolescentes (BRASILEIRO FILHO, 2006).

Uma menor freqüência de hiperplasia foi identificada através de avaliação histopatológica do endométrio de 266 mulheres com média de 50 anos de idade, em que apenas duas (0,75%) apresentaram hiperplasia complexa do endométrio com atipia celular, e outras sete (2,63%) mulheres foram identificadas com hiperplasia endometrial sem atipia celular (BEAL; STONE; BECKMANN; McASEY, 2007).

Observou-se também em nosso estudo, a presença de cistos de retenção (2,21%), freqüentemente associados ao processo inflamatório e que acometeu mulheres na faixa etária entre 46 a 73 anos. Em contrapartida, há relatos de que os cistos são mais comuns em mulheres em idade reprodutiva, especialmente naquelas que já tiveram filhos (BRASILEIRO FILHO, 2006).

Ao contrário do presente estudo, que demonstrou uma ocorrência maior de pólipos endometriais versus endocervicais (3,86% vs 2,21%), há relatos de que a prevalência de pólipos em mulheres adultas (2 a 5%) ocorre em sua maioria, no interior do canal endocervical (KUMAR *et al*., 2008). Já outro estudo ao analisar 748 mulheres com queixa de sangramento genital após um ano de menopausa, detectou que 12,77% apresentaram como causa benigna o pólipo endometrial (NETO; SARTORI; BARACAT *et al*., 1995).

Os pólipos endometriais ou endocervicais foram mais freqüentes em mulheres com mais de 50 anos ou com idade entre 61 a 70 anos, respectivamente. Em contrapartida, outro estudo descreveu que ocorrência dos pólipos endometriais é m em mulheres entre 40 e 50 anos, raros antes da menarca e mais comuns após a menopausa, e os pólipos endocervicais são mais freqüentes em mulheres multíparas, entre 30 e 50 anos de idade (BRASILEIRO FILHO, 2006). Os pólipos endometriais

raramente se tornam malignos, mas as alterações hiperplásicas são mais comuns com o avançar da idade, do tempo de menopausa, podendo desta forma aumentar o risco de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas (MAIA, 2004; SAVELLI *et al*., 2003).

Os pólipos endometriais ainda permanecem como estruturas que suscitam dúvidas sobre sua patogênese, portanto tornam atuais as discussões sobre seu comportamento e sobre a conduta a ser tomada quando diagnosticados. No endométrio a neoplasia mais freqüente localizada em pólipo é o adenocarcinorna e a lesão precursora é a hiperplasia atípica, nos seus diversos graus de intensidade (LIMA *et al.,* 2003).

Talvez a ocorrência aumentada de pólipos endometriais em nosso estudo se deve ao fato do trabalho ter sido realizado em material de autopsia onde o acesso ao diagnóstico é facilitado. Além disso, a mulher pode não apresentar qualquer sintoma clínico associado, dificultando o diagnóstico. A localização desses pólipos dificulta o seu diagnóstico ao exame ginecológico de rotina. É possível que estes fatores associados, aliados à pequena procura das mulheres ao serviço de saúde, estejam dificultando o diagnóstico.

Neste estudo encontrou-se uma maior freqüência de cervicite crônica (16,02%) do que cervicite aguda (2,76%), sendo que a primeira acomete mulheres na terceira e quarta décadas de vida e a outra foi mais frequente em adolescentes e mulheres até 40 anos de idade. Contrariando os nossos resultados, uma ocorrência maior foi detectada através de estudo citopatológico que demonstrou que 63% das mulheres analisadas apresentaram cervicite, sendo 34,4% leve, 29,2% moderada e 0,3% acentuada (TAVARES *et al*., 2007). Estes dados estão de acordo com relatos de que a inflamação é uma alteração presente no epitélio cervical da maioria das mulheres (PRAKASH; PATTERSON; KAPEMBWA, 2001).

Com base no exposto, esse estudo descreveu e relacionou os principais PPG que acometem mulheres nas diversas faixas etárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGORASTOS, T., *et al*. Prolonged use of gonadotropin-releasing hormone agonist and tibolone as add-back therapy for the treatment of endometrial hyperplasia. Maturitas, v. 48, p. 125-132, 2004.

2. BEAL, H. N.; STONE, J.; BECKMANN, M. J.; McASEY, M. E. Endometrial cells identified in cervical cytology in women ≥ 40 years of age: criteria for appropriate endometrial evaluation. American Journal of Obstetrics & Gynecology, v.196, p. 568.e1-568.e.6, 2007.

3. BOZZINI, N.; LIAO, A. W.; PEREIRA, P. A. A.; POMPEI, L. M.; RAMOS, L. O. Análogos do GnRH no tratamento do leiomioma uterino Experiência de quatro anos. Femina (Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia), v. 25, p. 701-704, 1997.

4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/> Acesso em: 28/07/2009.

5. BRASILEIRO FILHO, G. (Org.). Bogliolo Patologia. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, v. 1, p. 1.472, 2006.

6. CHAMBÔ FILHO, A.; SCÁRDUA, E. F.; SOARES, E. P.; NEVES, G. P.; GUZZO, T. S. Cervicites agudas. Femina, v. 10, 2003.

7. CLIFFORD, G. M.; GALLUS, S.; HERRERO, R.; MUNÕZ, N.; SNIJDERS, P. J.; VACCARELLA, S.; *et al*., Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. Lancet, v. 366, p. 991-998, 2005.

8. CRUM, C. P. Aparelho genital feminino. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, U.; ROBBINS, S.L.; SCHOEN, F.J. Patologia Estrutural e Funcional. 6ª ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, p.939-945, 2000.

9. GANGLIONE, R.; VALENTINI, A. L.; PISTILLI, E.; NUZZI, N. P. A comparison of hysteroscopy and hysterosalpingography. Int J Obstet And Gyn, v. 52, 1996.

10. HALBE, H. W.; FONSECA, A. M.; HAYASHIDA, S. A. Y. Leiomioma uterino: manifestações clínicas. Sinopse de Ginecologia e Obstetrícia, São Paulo, v. 2, p. 29-31, 2003.

11. KOIVISTO-KORANDER, R.; BUTZOW, P.; KOIVISTO, A.; LEMINEN, A. Clinical outcome and prognostic factors in 100 cases of uterine sarcoma: Experience in Helsinki University Central Hospital 1990-2001. Gynecologic Oncology, v. 111, p. 74-81, 2008.

12. KUMAR, V.; ABBAS, A. V.; FAUSTO, N. In: COTRAN, R. S.; ROBBINS, S.L. Patologia: Bases patológicas das doenças. 7ª ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2008.

13. LIMA, C. A.; PALMEIRA, J. A. V.; CIPOLOTTI R. Fatores associados ao câncer do colo uterino em Propriá, Sergipe, Brasil. Cad. Saúde Pública, v. 22, 2006.

14. LIMA, G. P., BARACAT, E. C. Síndrome do climatério. Ginecologia Endócrina. 2003.

15. MAIA, H. J. R.; MALTEZ, A.; STUDARD, E.; ATHAYDE, C.; COUTINHO, E. M. Effect of previous hormone replacement therapy on endometrial polyps during menopause. Gynecol Endocrinol, v. 18, p. 299-304, 2004.

16. MUÑOZ, *et al*. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med., v. 348, p. 518-527, 2003.

17. NETO, L. C. A.; SARTORI, M. D. F.; BARACAT, E. C.; CASTELO, M. J. B.; LIMA, G. R. Postmenopausal genital bleeding. RPM., v. 113, p. 987-991, 1995.

18. NG, W. K.; LI A, S.; CHEUNG, L. K. Significance of atypical repair in liquid-based gynecologic cytology: a follow-up study with molecular analysis for human papillomavirus. Cancer, v. 99, p. 141-148, 2003.

19. PONTES, A.; TRAIMAN, P.; FRANCO, M.; NAHÁS, E. A. P.; DIAS, R.; DE LUCA, L. A. Tratamento Clínico e Seguimento das Hiperplasias de Endométrio. RBGO, v. 22, p. 325-331, 2000.

20. PRAKASH, M.; PATTERSON, S.; KAPEMBWA, M. S. Evaluation of the cervical cytobrush sampling technique for the preparation of CD45+ mononuclear cells from the human cervix. J Immunol Methods, v. 258, p. 37-46, 2001.

21. ROSSI, G.; BONACORSI, G.; LONGO, L.; ARTUSI, T.; RIVASI, F. Primary high-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphoma of the cervix presenting as a common endocervical polyp. Arch Pathol Lab Med., v. 125, p. 537-540, 2001.

22. RUBIN, E. Patologia do Sistema Reprodutor Feminino. In: Rubin Bases Clinicopatológicas da Medicina. 5ª ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2006.

23. SAVELLI, L.; DE IACO, P.; SANTINI, D.; ROSATI, F.; GHI, T.; PIGNOTTI, E.; BOVICELLI, L. Histopathologic features and risk factors for benignity, hyperplasia, and cancer in endometrial polyps. Am J Obstet Gynecol, v. 188, p. 297-331, 2003.

24. STEVENS, A.; LOWE, J. Patologia. 2ª ed. Rio de Janeiro. Editora Manole, 2002.

25. STEFANI, E. I.; MAILLARD, J. L.; STEANI, M. Relato de um caso de leiomiossarcoma. Rev. Cient. AMECS, v. 10, p. 75-79, 2001.

26. TAVARES, T. G.; KRUNN, P.; COSTA, E. I.; PADILHA, C. M. L.; PINTO, Á. P. Cervicites e seus agentes na rotina dos exames colpocitológicos. DST – J Bras Doenças Sex Transm, v. 19, p. 30-34, 2007.

27. TAYLOR, L. J.; JACKSON, T. L.; REID, J. G.; DUFFY, S. R. The differential expression of oestrogen receptors, progesterone receptors, bcl-2 and ki67 in endometrial polyps. BJOG, v. 110, p. 794-798, 2003.

28. TROTTIER, H.; FRANCO, E.L. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. Am J Manag Care, v. 12, p. s462-472, 2006.

29. YASUDA, M.; KOTAJIMA, S.; KAJIWARA, H.; TAKEKOSHI, S.; OSAMURA, R. Y.; YOSHITAKE, T.; MURAMATSU, T.; MIYAMOTO, T.; MURAKAMI, M.; SHINOZUKA, T. Loss of heterozygosity alterations associated with progesterone therapy in endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. Int J Gynecol Cancer, v. 15, p. 155-162, 2005.

Ausência de citotoxicidade e genotoxicidade de isoflavonas em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Elayne Miguel da Silva[1], Iara Lúcia Barbosa Fernandes Vieira[1], Vívian Ribeiro[1], Aline Kiara da Silva Ferreira[1], Camila Regina do Vale[1], Nayanna Fares da Silva[1], Leandro Prado Felício[1], Débora Cristina Silva Passos[1], Salvador de Carvalho[1]

[1] Laboratório de Mutagênese com Drosophila, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, UFG, Goiânia-GO.

Email: elayne_bio@hotmail.com

Palavras chaves: fitoestrógenos, isoflavonas, mutagênese, *Drosophila melanogaster.*

INTRODUÇÃO

O hipoestrogenismo, uma deficiência de hormônios esteróides, ocorre de maneira natural em mulheres com idade de aproximadamente 50 anos, fase conhecida como menopausa. Nessa fase a deficiência de estrogênios propicia sintomas desagradáveis que implicam num decréscimo da qualidade de vida (MASSE *et al.,* 2005), podendo causar distúrbios como: sintomas vasomotores, doenças cardiovasculares, osteoporose, alterações urogenitais e distúrbios psicológicos (NAVARRO *et al*., 2001).

Na tentativa de diminuir esses sintomas indesejáveis da falta de hormônios vem sendo utilizada à terapia de reposição hormonal (TRH) usando hormônios sintéticos, como esteróides sexuais. A TRH proporciona vários benefícios para a mulher tais como diminuição dos sintomas, melhora da atrofia genital e prevenção da osteoporose (GRADY *et al*., 2002). Mas, também apresenta aspectos negativos, como aumento do tromboembolismo, do risco relativo de algumas neoplasias hormônios-dependentes, como do endométrio e das mamas. (MANSON *et al*., 2003)

Devido a esses aspectos negativos da TRH, tem-se procurado tratamentos alternativos com a utilização de substâncias provenientes de plantas, denominadas fitoestrógenos (ALLRED *et al*., 2001). Dentro deste grupo, o fitoestrógeno mais comum são as isoflavonas, encontradas principalmente na soja, cuja estrutura molecular tem semelhança bioquímica com o 17 β-estradiol (hormônio sexual), podendo se ligar aos receptores estrogênicos. Dentre as isoflavonas, os principais

compostos são: genisteína, dadzeína, biochanina A e formononetina (SOMJEN *et al.*, 2003).

As ações das isoflavonas nos tecidos alvos parecem ocorrer por meio de dois mecanismos classificados como genômico e não genômico. Com isso as isoflavonas podem apresentar vários efeitos como: atividade estrogênica (nos sintomas da menopausa e da osteoporose) e melhora dos sintomas da tensão pré-menstrual (KAARI *et al.*, 2006); atividade antiestrogênica (WU *et al.*, 2000); atividades anti-hemolítica, antioxidante (ESAKI *et al.*, 1999); atividade antitumoral, tais como câncer de mama e próstata, que são hormônios-dependentes (ADLERCREUTZ *et al.*, 2000); reduzindo os níveis do estimulador de tais neoplasias (SCHLEICHER *et al.*, 1999).

Por outro lado, existem autores que contestam essas ações protetoras das isoflavonas, pois alguns fitoestrógenos podem exercer efeito agonista ou antagonista, dependendo da concentração (MUELLER *et al.*, 2004). Esses pesquisadores advogam que altas concentrações de isoflavonas poderiam promover a proliferação de lesões pré-malígnas e aumento de risco de câncer de mama, sendo que o tempo de exposição seria o fator determinante para esse efeito (FREY *et al.*, 2001). Outros já observaram algum grau de atividade mitótica endometrial durante o uso da isoflavonas em mulheres na pós-menopausa (WOLFF *et al.*, 2006).

A detecção de substâncias que possam modular os efeitos genotóxicos de agentes químicos e físicos é de grande importância, podendo auxiliar no entendimento dos mecanismos celulares de mutagênese, assim como fornecer informações para a prevenção das alterações gênicas que podem resultar no aparecimento de doenças (TAKEUCHI; TAKAHASHI, 2001).

A *Drosophila melanogaster (D. melanogaster)*, um organismo eucarionte, tem sido reconhecida como animal experimental ideal para estudos genéticos, devido ao seu reduzido tamanho, baixo custo de manutenção, prole numerosa, tempo de geração curto (cerca de 10 dias, a 25ºC e 60% de umidade), reduzido número de cromossomos (2n=8), presença de cromossomos politênicos nas glândulas salivares e um sistema de metabolização semelhante ao do Homem, além de apresentar uma variedade de marcadores genéticos (COOKSON *et al.*, 1997).

O teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation and Recombination Test – SMART) com *Drosophila melanogaster*, tem sido amplamente utilizado na detecção de efeitos genotóxicos e antigenotóxicos de

agentes químicos e misturas complexas (KAYA *et. al.,* 2002). O teste baseia no fato de que, durante o início do desenvolvimento embrionário da *D. melanogaster*, grupos de células (discos imaginais) se separam e proliferam mitoticamente durante o desenvolvimento larval até se diferenciarem, durante a metamorfose, em estruturas do corpo da mosca adulta (olhos, asas, patas, etc.). Caso ocorra uma alteração genética em uma das células do disco imaginal, tal alteração estará presente em todas as células descendentes, e formará um clone de células mutantes detectadas como uma mancha de pêlos mutantes na asa da mosca adulta (ITO *et al*., 1997).

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo verificar o potencial citotóxico e a ação genotóxica da isoflavonas em células somáticas de *Drosophila melanogaster* através do teste SMART/asa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Agentes químicos

O pó da isoflavonas (43,10%) foi importado por DEG Importação de Produtos Químicos LTDA, fornecido pela farmácia de manipulação Santa Efigênia. Este produto inclui-se na categoria de fitoestrógenos e contêm compostos como: a daidzina (8,93%), glycitina (3,84%), genistina (3,89%), daidzeína (25,75%), glyciteína (0,53%) e genisteína (0,16%).

As diferentes concentrações do pó de isoflavonas foram pesadas na hora do tratamento, e diluídas em 3 mL de água destilada. O controle negativo foi feito com água destilada (3 mL).

3.2 Meios de cultura e condições de cultivo

Para a manutenção das linhagens de *Drosophila melanogaster* e para a realização dos cruzamentos das moscas adultas, foi utilizado o meio de cultura banana-ágar (MARQUES *et al*., 1966) distribuído em garrafas estéreis de ¼ de litro (GRAF *et al*., 1984).

As linhagens foram mantidas em uma câmara com temperatura constante a 25ºC e umidade relativa de aproximadamente 60%, também usada na condução dos experimentos.

3.3 Linhagens de *Drosophila melanogaster*

Para a realização dos experimentos foram utilizadas três linhagens diferentes de *Drosophila melanogaster* que são portadoras de marcadores genéticos nos cromossomos (GRAF; VAN SCHAIK, 1992). As linhagens apresentam a seguinte constituição genética:

1) "Multiple wing hairs"(mwh): *mwh/mwh.*
2) "Flare-3" (flr^3): *flr^3/In(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S.*
3) "ORR; flare-3" (ORR; flr^3): *ORR; flr^3 /In(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S.*

3.4 Teste de recombinação e mutação somática (SMART/asa)

O teste SMART/asa com *Drosophila melanogaster* é capaz de detectar alterações genéticas como: mutação, deleção e recombinação mitótica. Essas alterações, durante as mitoses no desenvolvimento embrionário, contribuem para o surgimento de manchas de pêlos mutantes que, conforme o fenótipo, evidenciará a influência dos marcadores mwh ou flare (VOGEL *et al.,* 1999).

O tamanho das manchas pode revelar o início precoce ou tardio da ação da droga. Assim, manchas grandes indicam atuação nos primeiros ciclos de divisão celular durante a metamorfose (fase de pupa) e as manchas pequenas revelam atuação tardia na indução de mutações (SPANÓ *et al.,* 2001).

3.5 Cruzamentos com as linhagens de *Drosophila melanogaster*

Foram utilizados dois tipos de cruzamentos:

1) Cruzamento padrão (ST - “Standard Cross”): fêmeas virgens da linhagem marcadora *flr^3* foram cruzadas com machos *mwh/mwh* (GRAF *et al.*, 1989).
2) Cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB - “High Bioactivation Cross”), onde fêmeas *ORR; flr^3* foram cruzadas com machos *mwh/mwh.* Este cruzamento apresenta níveis elevados constitutivamente de enzimas de metabolização (Citocromo P-450) (GRAF; VAN SCHAIK, 1992).

O cruzamento teve a duração de 48 horas, em vidros contendo uma proporção de 80 fêmeas para 40 machos/garrafa, previamente preparados com meio de cultura banana-ágar. Posteriormente, os reprodutores foram transferidos para o meio de cultura de ovoposição, para obtenção de larvas. Esse meio consiste de uma base sólida feita de ágar (3% de ágar em água), coberta com uma camada de fermento biológico mais açúcar (GRAF *et al.,* 1984). Os reprodutores de ST e HB realizaram a ovoposição por um período de 8 horas. De ambos os cruzamentos foram obtidos dois tipos de descendentes: trans-heterozigoto marcado (MH), e heterozigoto balanceado (BH).

3.6 Tratamento Crônico

Após 72±4 horas as larvas de terceiro estágio dos dois cruzamentos foram coletadas e lavadas em água corrente com auxílio de uma peneira de malha fina. Para a realização da curva de sobrevivência foram estabelecidas 8 doses (16,6; 27; 40; 50; 80; 100; 150 e 200 mg/mL) de acordo com uso pela população. As larvas foram contadas (100 larvas/tubo) e colocadas em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) contendo 0,9 g de meio de purê de batata (Yoki Alimentos S.A.) e as diferentes concentrações de isoflavonas. Após a eclosão os emergentes foram contados e descartados. Com os dados obtidos através da curva de sobrevivência foram selecionadas 4 doses (40, 90, 150 e 200 mg/mL) a serem utilizadas no experimento de mutagênese. Para cada dose e o controle negativo (água destilada) no experimento da mutagênese foram colocadas cerca de 150 larvas/tubo de vidro, com os mesmos procedimentos feitos na curva de sobrevivência. As moscas adultas emergentes foram fixadas em etanol 70% e armazenadas.

3.7 Preparação e análise das lâminas

Das moscas estocadas no etanol foram retiradas as asas com o auxílio de duas pinças de relojoeiro, as asas foram distendidas e fixadas sobre a superfície de lâminas secas com a solução de FAURE. As lâminas foram mantidas a 40°C por um período mínimo de 24 horas. Posteriormente, foram colocadas lamínulas (24 x 32 mm), contendo uma gota da solução de FAURE, permanecendo por mais 24 horas a 40°C (GRAF *et al.,* 1984). Cada lâmina continha 20 asas, sendo 10 de machos e 10 de fêmeas. Para cada dose foram analisadas 80 asas.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com 400X de ampliação. A análise consistiu em registrar a freqüência, o tipo de manchas encontradas (simples ou gêmeas), bem como o tamanho das mesmas e a posição em que se encontravam na asa.

3.8 Análise estatística

A análise estatística de possíveis efeitos genotóxicos realiza um confronto entre os dados relativos aos tratamentos com o fitoterápico e o respectivo controle negativo. O procedimento utilizado baseia-se em duas hipóteses:

(I) **Ho**: a freqüência de mutações espontâneas e induzidas nas moscas tratadas não é maior que a freqüência de mutações no respectivo controle negativo.

(II) **Ha**: a freqüência de mutações induzidas nas moscas tratadas não é menor que m vezes a maior freqüência de mutações espontâneas observadas no controle negativo.

Para testar as hipóteses foi aplicado teste X^2 para proporções (FREI; WÜRGLER, 1988). Esse teste foi usado com nível de significância 5%. Com base nos resultados obtidos dessa análise estatística, podem ser consideradas as seguintes decisões:

(I) Aceita-se ambas as hipóteses; como elas não podem ser verdadeiras simultaneamente, nenhuma decisão pode ser tomada, tendo-se assim, **resultados inconclusivos**.

(II) Aceita-se a primeira hipótese e rejeita-se a segunda hipótese, o resultado será **negativo.**

(III) Rejeita-se a primeira hipótese e se aceita a segunda hipótese, o resultado será **positivo**.

(IV) Rejeitam-se ambas as hipóteses e o resultado será **fraco-positivo.**

O valor de m é fixado em no mínimo 2, devido á alta freqüência de mutação espontânea verificados em manchas simples pequenas e o total de manchas. Para a análise estatística, as manchas são agrupadas da seguinte forma: 1) manchas simples pequenas (MSP) - uma a duas células mutantes (mwh ou *flr*^{3}); 2) manchas simples grandes (MSG) - três ou mais células mutantes (mwh ou *flr*^{3}); 3) manchas gêmeas (MG) – células mutantes mwh e *flr*^{3} juntas. Os três tipos de manchas são avaliados separadamente e em conjunto, que é o total de manchas observadas na dose testada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da citotoxicidade

Para a determinação do potencial citotóxico da isoflavonas foram selecionadas oito doses para a realização de uma curva de sobrevivência. As doses escolhidas foram de 16,6 mg/mL; 27 mg/mL; 40 mg/mL; 50 mg/mL; 80 mg/mL; 100 mg/mL; 150 mg/mL e 200 mg/mL, ministradas em tubos que continham as larvas de terceiro estágio provenientes do cruzamento padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação (HB). Como controle negativo utilizou-se água destilada. Após a eclosão, os adultos foram contatos para análise da taxa de sobrevivência.

A Sociedade Norte Americana de Menoupausa (NAMS) sugere as seguintes doses e posologias para isoflavonas: 50mg/dia na redução do colesterol e no tratamento de fogachos usar 40-80mg/dia (NAMS, 2000). Já em uma metanálise de Kang (2002), a dose mais alta de isoflavonas administrada em pacientes foi de 132 mg. Portanto as doses estabelecidas para a curva de sobrevivência estão compreendidas entre as indicadas pela NAMS. Mesmo assim, as isoflavonas não apresentaram um potencial citotóxico, significante, para *Drosophila melanogaster* (Figuras A e B).

Os dados de citotoxicidade apresentados nas Figuras (A) e (B) revelam que não há um efeito citotóxico significativo das 8 doses testadas, pois os números de sobreviventes em ambos os cruzamentos HB e ST, não são estatisticamente significativos quando comparados com o controle negativo.

A presença de isoflavonas junto às células embrionárias em processo de multiplicação e diferenciação, não afetou seu desenvolvimento até a forma de adultos. Através desta mesma análise outros compostos já foram estudados tais como extrato da planta medicinal *Palicourea coreacea* (PASSOS, 2008) onde não foi observado efeito citotóxico em células somáticas de *Drosophila melanogaster,* resultado similar ao encontrado no presente trabalho. Já estudos realizados por Caldeira (2008), com o fármaco Dietilpropiona demonstraram uma potente ação citotóxica em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

Segundo Caldeira (2008), existe uma correlação positiva entre a concentração de Dietilpropiona e sua atividade citotóxica em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Assim, quanto maior a concentração menor o número de

sobreviventes; fato este não evidenciado no presente estudo onde não houve diferença na taxa de sobrevivência entre as doses testadas.

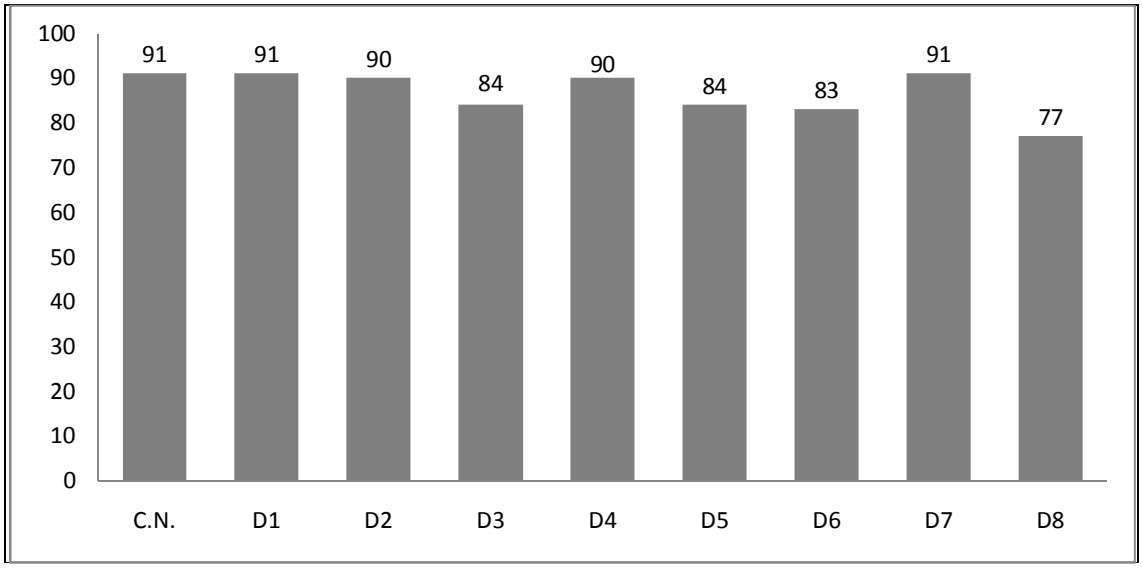


Figura A: Número de sobreviventes do cruzamento HB expostos ao controle negativo e às doses 16,6; 27; 40; 50; 80; 100; 150 e 200 mg/mL da isoflavonas, respectivamente.

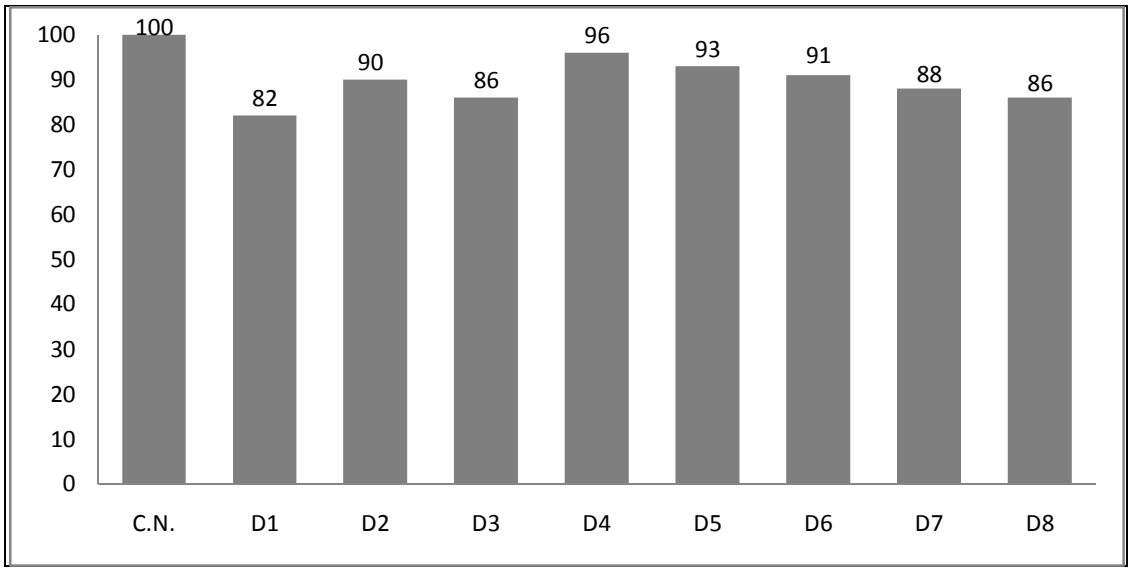


Figura B: Número de sobreviventes do cruzamento ST expostos ao controle negativo e às doses 16,6; 27; 40; 50; 80; 100; 150 e 200 mg/mL da isoflavonas, respectivamente.

4.2 Avaliação do efeito genotóxico

A partir da Curva de Sobrevivência foram selecionadas quatro doses para análise do efeito genotóxico das isoflavonas. O cruzamento padrão (ST) e o de alta capacidade de bioativação metabólica (HB) foram desenvolvidos em paralelo para

que as larvas fossem tratadas sob condições idênticas. Para a avaliação genotóxica da isoflavonas analisou-se os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) obtidos de ambos os cruzamentos, tratados com diferentes doses (40, 90, 150 e 200mg/mL) e o controle negativo (água destilada).

Os resultados obtidos nas análises de ambos os cruzamentos apresentados na Tabela 1, demonstram não haver aumento significativo no número total de manchas, nas quatro doses de isoflavonas, assim como na freqüência de manchas simples pequenas e manchas simples grandes quando comparados com o controle negativo. Os resultados foram inconclusivos para a freqüência de manchas gêmeas.

Não houve diferença estatisticamente significativa na freqüência total de manchas indicando que as doses testadas (40, 90, 150 e 200mg/mL) não apresentaram efeitos genotóxicos, tanto no cruzamento ST, como em HB.

As Figuras 1 e 2 apresentam a distribuição do tamanho de manchas mutantes simples (pequenas e grandes) por indivíduos provenientes do cruzamento ST e HB, respectivamente, tratados com as diferentes concentrações de isoflavonas e água destilada. A frequência de manchas com apenas uma célula mutante teve maior predominância em todas as doses utilizadas. Os resultados obtidos em ambos os cruzamentos tornam possível concluir que o composto isoflavona não apresentou efeito genotóxico direto através das análises dos descendentes provenientes do cruzamento ST, nem indireto através das análises dos indivíduos do cruzamento HB. No entanto, a frequência de manchas pequenas (1 e 2 células) foi maior entre os descendentes do cruzamento HB, como era de se esperar, pois este cruzamento possui elevados níveis de enzimas de metabolização (Citocromo P-450). Esses dados indicam uma atuação tardia do composto isoflavonas, no desenvolvimento embrionário da *D. melanogaster*.

A partir da análise dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH), provenientes dos cruzamentos (HB e ST) obteve-se resultados negativos, assim não houve a necessidade de analisar os descendentes heterozigotos balanceados (BH).

Tabela 1. Freqüência de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* provenientes do cruzamento padrão (ST) e do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com controle negativo (água destilada) e diferentes concentrações de isoflavonas.

Genótipos **e Conc. (mg/mL)**	**N°. de Indiv. (*N*)**	**Manchas por indivíduo (n°. de manchas) Diag. estatístico[a]**								**Total manchas mwh[c] (*n*)**
		MSP (1-2 céls)[b]		**MSG (>2 céls)[b]**		**MG**		**TM**		
		***m* = 2**		***m* = 5**		***m* = 5**		***m* = 2**		
HB										
mwh/ORR										
Contr. Neg.	40	0,20	(08)	0,10	(04)	0,05	(02)	0,35	(14)	12
40mg/mL	40	0,05	(02) -	0,03	(01) -	0,00	(00) i	0,08	(03) -	3
90mg/mL	40	0,13	(05) -	0,03	(01) -	0,03	(01) i	0,18	(07) -	6
150mg/mL	40	0,10	(04) -	0,03	(01) -	0,03	(01) i	0,15	(06) -	5
200mg/mL	40	0,08	(03) -	0,13	(05) i	0,03	(01) i	0,23	(09) -	8
ST										
mwh/flr^3										
Contr. Neg.	40	0,58	(23)	0,18	(07)	0,05	(02)	0,80	(32)	30
40mg/mL	40	0,03	(01) -	0,00	(00) -	0,03	(01) i	0,05	(02) -	1
90mg/mL	40	0,03	(01) -	0,03	(01) -	0,03	(01) i	0,08	(03) -	2
150mg/mL	40	0,10	(04) -	0,00	(00) -	0,00	(00) i	0,10	(04) -	4
200mg/mL	40	0,10	(04) -	0,03	(01) -	0,05	(02) i	0,18	(07) -	5

[a]Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância α=β=0,05.

[b]Incluindo manchas simples *flr*^{3} raras.

[c]Considerando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

MSP: manchas simples pequenas. MSG: manchas simples grandes. MG: manchas gêmeas. TM: total de manchas.

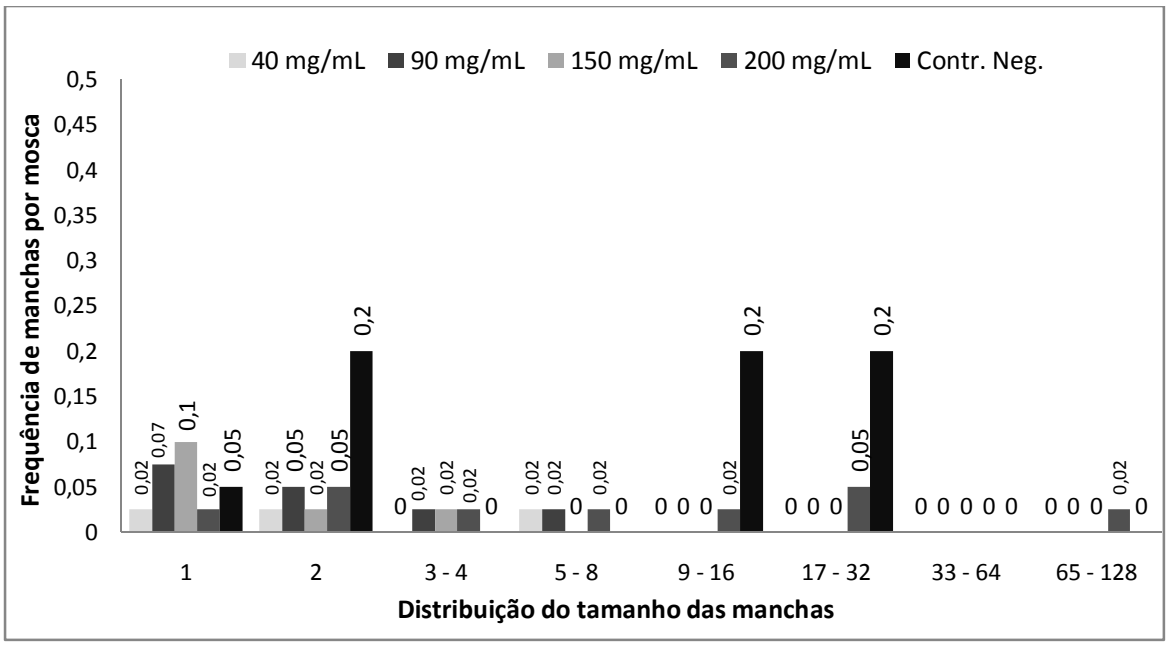


Figura 1. Distribuição do tamanho de manchas (números de células) observadas em asas de *Drosophila melanogaster*, dos descendentes MH, provenientes do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com diferentes concentrações de isoflavonas (40, 90, 150 e 200 mg/mL) e o controle negativo (água destilada).

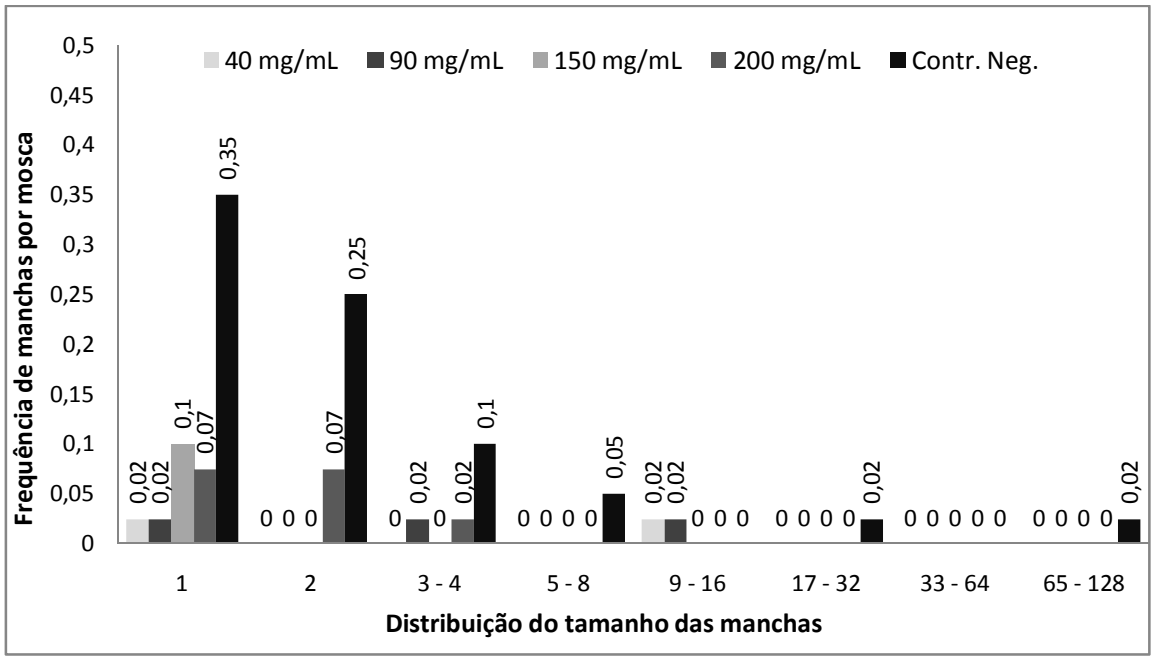


Figura 2. Distribuição do tamanho de manchas mutantes observadas em asas de *Drosophila melanogaster*, dos descendentes MH, provenientes do cruzamento ST (padrão), tratados com diferentes concentrações (40, 90, 150 e 200 mg/mL) de isoflavonas e o controle negativo (água destilada).

Muitos dos agentes potencialmente carcinogênicos estão presentes na nossa alimentação e no nosso ambiente. Existem algumas evidências de que o sítio de ação destes compostos é o material genético celular, sendo que muitos dos carcinogênicos atuam via mutações (MALUF *et al.,* 2003).

Segundo Wolf (2006), isoflavonas são consideradas fitoestrógenos podendo atuar por mecanismos genômicos se ligando com receptores nucleares específicos. Além disso, elas podem atuar por mecanismos não genômicos determinando ações de proliferação celular, inibição enzimática e da expressão e transcrição de alguns genes, diferenciação celular e apoptose celular.

Fato esse evidenciado em estudos realizados por Piovesan (2005), que indicaram que isoflavonas são formadas pela mistura de diferentes compostos destacando a genisteína. Essa por sua vez, pode estimular a proliferação de tumores estrogênicos dependentes, principalmente no aumento do risco de câncer de mama; sendo o tempo de exposição um fator determinante para o seu efeito. Ao passo que outros autores mostraram que a genistéina seria um preventivo para o desenvolvimento do câncer de mama por apresentar propriedades antiproliferativas (FRITZ *et al*., 1998).

No entanto, no presente estudo as concentrações utilizadas do fitoestrógeno não apresentaram ação genotóxica, sendo assim não produziu mutações em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tais resultados corroboram os experimentos de Fritz (1998) que apresentam as isoflavonas como protetores de danos genéticos às células. Fica claro a necessidade de novos estudos utilizando não só outras concentrações de isoflavonas bem como em outros organismos-teste que revelem seu real efeito sob o gene, para validar o seu uso.

Novos estudos acerca das isoflavonas que revelem suas atividades biológicas e quais as concentrações corretas a serem utilizadas seriam de suma importância, pois os fitofármacos além de causarem danos menores ao organismo possuem um custo mais baixo que os fármacos sintéticos possibilitando seu acesso a um maior número de pessoas.

5 CONCLUSÃO

Com os dados da curva de sobrevivência, verificou-se que todas as doses utilizadas de isoflavonas não apresentaram efeito citotóxico significativo em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, tanto no cruzamento HB como no ST.

Paralelamente, não se observou efeito genotóxico direto ou indireto nas concentrações selecionadas. Com base nos presentes dados, o uso do fitoterápico isoflavonas não acarreta riscos citotóxicos e genotóxicos às pessoas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W.; BARTELS, P.; ELOMAA, V.; WATANABE, S.; WAHALA, K.; LANSTROM, M.; LUNDIN, E.; BERGH, A.; DAMBER, J. E.; AMAN, P.; WIDMARK, A.; JOHANSSON, A.; ZHANG, J. X.; HALLMANS, G. Phytoestrogens and prostate disease. **J Nutr,** v. 130, p. 658S-659S, 2000.

ALLRED, C. D.; ALLRED, K. F.; JU, Y. H.; VIRANT, S. M.; HELFERICH, W. G. Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF–7) tumors in a dose-dependent manner. **Cancer Res**, 61: 5045-50, 2001.

CALDEIRA, K. S. **Avaliação citotóxica, genotóxica e moduladora do anorexígeno Dietilpropiona em células somáticas de *Drosophila melanogaster*: SMART/asa.** Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

COOKSON, C. **A powerful genetic punch: human moleules have much in common with the fruit fly**. Finacial Times, June 14. In: XU, T.; JOHN, M. Insigths From Model System – Understanding Human Cancer in a Fly? Am J Hun Genetic, 61: 1006-1010, 1997.

ESAKI, H.; KAWAKISHI, S.; MORIMITSU, Y.; OSAWA, T. New potent antioxidative O-dihydroxyisoflavones in fermented Japanese soybean products. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, n. 9, p. 1637-1639, 1999.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide wheter mutagenicity test data from Drosophila assays indicate a positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203: p. 297-308, 1988.

FREY, R. S.; LI, J.; SINGLETARY, K. W. Effects of genistein on cell proliferation and cell cycle arrest in nonneoplastic human mammary epithelial cells: involvement of Cdc2, $p21^{waf/cip1}$, $p27^{kip1}$, and Cdc25C expression. **Biochem Pharmacol**, 61(8): 979-89, 2001.

FRITZ, W. A.; COWARD, L.; WANG, J.; LAMARTINIERE, C. A. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. **Carcinogenesis**, 19(12): 2151-8, 1998.

GRADY, D.; YAFFE, K.; KRISTOF, M.; LIN, F.; RICHARDS, C.; BARRETT-CONNOR, E. Effect of postmenopausal hormone therapy on cognitive function: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. **Am J Med**, 113(7): 543-8, 2002.

GRAF, U; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A. J.; WÜGLER F. E. Thirty compounds tested in the Drosophila wing spot test. **Mutation Research**, 222: 359-373, 1989.

GRAF, U; VAN S. N. Improved high bioactivation cross for the wing mutation and recombination test in Drosophila melanogaster. **Mutation Research**, v. 271, n. 1, p. 59-67, 1992.

GRAF, U.; WÜRGLER, F. E., KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic Mutation And Recombination Test in *D. melanogaster.* **Environmental Mutagenesis***, v.*6, p. 153-88, 1984.

ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, H.; KAWADE, M. Antitumor effects of a new polysaccharideprotein complex (ATOM) prepared from Agaricus blazei (Iwade Strain 101) ''Himematsutake'' and its mechanisms in tumor-bearing mice. **Anticancer Research**, v. 17, p. 277-284, 1997.

KAARI, C.; HAIDAR, M. A.; JUNIOR, J. M.; NUNES, M. G.; QUADROS, L. G.; KEMP, C. Randomized clinical trial comparing conjugated equine estrogens and isoflavones in postmenopausal women: a pilot study. **Maturitas**, 53(1): 49-58, 2006.

KANG, H. J.; ANSBACHER, R.; HAMMOUD, M. M. Use of alternative and complementary medicine in menopause. **Int J Gynecol Obstet,** 79: 195-207, 2002.

KAYA, B.; CREUS, A.; VELÁSQUEZ, A.; YANIKOGLU, A.; MARCOS, R. Genotoxiciy is modulated by ascorbic acid studies the wing spot test in *Drosophila*. **Mutation Research**, 520, p. 93-101, 2002.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. **Biomonitorização do dano genético em humanos**. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance 183-203, p. 2003.

MANSON, J. E.; HSIA, J.; JOHNSON, K. C.; ROSSOUW, J. E.; ASSAF, A. R.; LASSER, N. L. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. **N Engl J Med**, 349(6): 523-34, 2003.

MARQUES, E. K.; NAPP, M.; WINGE, H.; CORDEIRO, A. R. A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila.* **Dros Inform Serv**, 41: 187, 1966.

MASSE, P. G.; TRANCHANT, C. C.; DOSY, J.; DONOVAN, S. M. Coexistence of osteoporosis and cardiovascular disease risk factors in apparently healthy, untreated postmenopausal women. **Int J Vitam Nutr Res**, 75(2): 97-106, 2005.

MUELLER, S. O.; SIMON, S.; CHAC, K.; METZIER, M.; KORACH, K. S. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor a (ERa) and b (ERb) in human cells. **Toxicol Sci**, 80: 14-25, 2004.

NAMS (North American Menopause Society). The role of isoflavones in menopausal health: Consensus Opinion of The North American Menopause Society. **Menopause**, 7(4): 215-29, 2000.

NAVARRO, P. A. A. S.; GOMES, F. M.; AZEVEDO, G. D.; COSTA, F. S.; FERRIANI, R. A.; IANNETTA, O. Fatores locais envolvidos na etiopatogênese da osteoporose pós-menopausa. **Reprod Clim**, 16: 167-72, 2001.

PASSOS, D. C. S. **Efeito modulador do extrato aquoso da *Palicourea coriacea* Cham. contra mutações e recombinações somáticas induzidas pela doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.** Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

PIOVESAN, A. C.; JÚNIOR, J. M. S.; MOSQUETTE, R.; SIMÕES, M. J.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C. Estudo morfológico e molecular da mama de ratas castradas tratadas com isoflavona ou estrogênios. **Rev Bras Ginecol Obstet,** 27(4): 204-9, 2005.

SPANÓ, M. A.; FREI, H.; WÜGLER, F. E.; GRAF, U. Recombinogenetic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. **Mutagenesis,** 16: 385-384, 2001.

SCHLEICHER, R. L.; LAMARTINIERE, C. A.; ZHENG, M.; ZHANG, M. The inhibitory effect of genistein on the growth and metastasis of a transplantable rat accessory sex gland carcinoma. **Cancer Lett**, 136(2): 195-201, 1999.

SOMJEN, D.; STERN, N.; KNOLL, E.; SHARON, O.; GAYER, B.; KULIK, T. Carboxy derivates of isoflavones as affinity carriers for cytotoxic drug targeting in adrenocortical H295R carcinoma cells. **J Endocrinol**, 179(3): 395-403, 2003.

TAKEUCHI, P. L.; TAKAHASHI, C. S. **A vitamina B6 e as aberrações cromossômicas induzidas pela doxorrubicina.** V Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese ambiental. Programas e resumos. Gramado – Rio Grande do Sul, 2001.

VOGEL, E. W.; GRAF, U.; FREI, H.; NIVARD M. M. J. The results of assay *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. In: The use of short and medium-term test for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic harzard evaluation (McGregor, D. B.; Rice, J. M.; Venenitt, S., eds.) **IARC Scientific Publications**. Lyon, 427-470, 1999.

WOLF, L. P. G.; MARTINS, M. R.; BEDONE, A. J.; MONTEIRO, I. M. U. Avaliação do endométrio em menopausas após uso de isoflavonas. **Ver Assoc Med Bras,** 52(6): 419-23, 2006.

WOLFF, L. P. G.; MARTINS, M. R.; BEDONE, A. J.; MONTEIRO, I. M. U. Avaliação do endométrio em menopausadas após uso de isoflavonas. **Rev Assoc Med Bras**, 52(6): 419-23, 2006.

WU, A. H.; STANCZYK, F. Z.; HENDRICH, S.; MURPHY, P. A.; ZHANG, C.; WAN, P. Effects of soy foods on ovarian function in premenopausal women. **Br J Cancer**, 82(11): 1879-86, 2000.

Desenvolvimento de biossensores para determinação e análise de pesticidas utilizando técnicas eletroanalíticas

Joicy Rocha dos Santos[a] (IC), Amarildo Otávio Martins[a,*] (PQ)

e-mail:amarildo@quimica.ufg.br

[a]*Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-Go 74001-970 Brasil*

Palavras-Chaves: Biossensor, lacase, polifenóis, voltametria cíclica.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente existe um consenso universal a respeito da necessidade de monitorar continuamente o teor de contaminantes químicos nos cursos de águas naturais e nos inúmeros efluentes industriais descarregados nestes recursos hídricos. Dentro deste contexto, é importante contar com novas metodologias de determinação e quantificação dos diversos tipos de poluentes, com rapidez, seletividade e sensibilidade, características estas, encontradas nos biossensores (ROSATTO *et al*., 2001).

Um biossensor pode ser definido como um sensor que utiliza material biológico conectado a um transdutor. O qual converte um sinal biológico em um sinal elétrico. Imobiliza-se o material biológico em um suporte adequado, que é acoplado junto à superfície do transdutor, o qual monitorará o desaparecimento de algum reagente ou o aparecimento de algum produto da reação do material biológico com o substrato de interesse (FATIBELLO-CAPELATO *et al*., 1991).

Para controle e monitoramento ambiental, biossensores podem fornecer dados rápidos e específicos de áreas contaminadas. Eles oferecem outras vantagens sobre métodos analíticos convencionais tais como: possibilidade de portabilidade e trabalho no local e habilidade de medir poluentes em matrizes complexas com abertura e preparação mínima da amostra. Além dissso os biossensores oferecem a possibilidade de não somente identificar substâncias químicas, mas também seus efeitos biológicos, como toxidade (RODRIGUEZ-MOZAZ *et al*., 2004).

Compostos fenólicos estão presentes em efluentes de diversas indústrias, tais como, de: óleo, tintas, polímeros, farmacêutica e agrícolas. Portanto sua determinação no meio ambiente é de grande importância para controle e

monitoramento ambiental e, pode ser efetuada através da utilização de biossensores os quais detectam estes compostos em baixas concentrações (10^{-6} – 10^{-10} $molL^{-1}$) (SEYDA *et al*., 2008; VAMVAKAKI e CHANIOTAKIS, 2007).

Vários compostos fenólicos são reconhecidos como substâncias tóxicas e desreguladores endócrinos. Estes compostos químicos são de origem natural ou sintética, os quais são capazes de interferir com o sistema endógeno, modulador ou imitador de hormônios naturais. O resultado desta interação para humanos e vida selvagem é a indução de sérias patologias tais como desenvolvimento de anormalidades e carcinogênese. Para estas reações, a determinação de compostos fenólicos em matrizes ambientais, incluindo águas superficiais, tornou-se uma matéria de grande importância (PORTACCIO *et al*., 2006).

Substratos polifenólicos do tipo: hidroquinona, catecol e resorcinol podem ser utilizados como padrões no intuito de avaliar a seletividade de enzimas polifenois- oxidase (GIL *et al.,* 2009).

A lacase é uma polifenoloxidase encontrada em fungos, plantas e bactérias, a enzima catalisa a oxidação de compostos fenólicos, tendo o oxigênio molecular como agente para regeneração da forma ativa da enzima. A especificidade pelos substratos varia dependendo da origem da enzima, portanto lacases de diferentes fungos oxidam diferentes substratos, com diferentes velocidades de reação (GIL *et al.,* 2009).

2 OBJETIVOS

Nesse trabalho a enzima lacase foi utilizada como biossensor fazendo-se o estudo da enzima em solução e em pasta de carbono, por voltametria cíclica, variando-se o potencial hidrogeniônico, a velocidade de varredura e a faixa de potencial.

Como existem muitos pesticidas que possuem grupamentos fenólicos, esse trabalho teve como objetivo simular estes pesticidas utilizando moléculas polifenólicas (hidroquinona e catecol) e observar como essas moléculas reagiriam em diferentes potencias hidrogeniônicos na presença do biossensor (enzima lacase).

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção da enzima lacase

Para a produção de lacase a partir do fungo *Pynoporus sanguíneus*, utilizou-se a linhagem do fungo *Pynoporus sanguíneus*, CCT-4518 cedido pelo laboratório de enzimologia da Faculdade de Farmácia (Prof. Telma Alves Garcia) da Universidade Federal de Goiás.

3.2 Estudo da enzima em solução

Foram preparadas soluções 0,1 mol L^{-1} acetato e fosfato utilizadas para fixar o potencial hidrogeniônico. Alíquotas de 20 mL das soluções tampões foram colocadas na cela contendo o eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo de referência Ag/AgCl e contra eletrodo de platina, utilizando um potenciostato MQPG-01 da microquímica com sinais de excitação por voltametria cíclica.

Foram otimizadas as faixas de potenciais de oxidação e redução em intervalos de -0,5 a 1; -0,8 a 0,8 e -1 a 1 Volt. As velocidades de varredura utilizadas foram de 100 e 500 mV s^{-1}. A observação dos picos anódicos e catódicos foi feita por adições de 500 μL da enzima lacase obtidas a partir do extrato bruto.

3.2 Estudo da enzima em pasta de carbono

Os biossensores foram preparados através da trituração do pó de grafite (300 mg) com adição de alíquotas do extrato bruto de lacase (200 μL), e óleo mineral nujol (50 μL), homogeneizou-se por 15 minutos em um vidro de relógio para a formação de uma pasta. Foram utilizadas porções adequadas da pasta, para preencher a cavidade do eletrodo de trabalho (Figura 1).

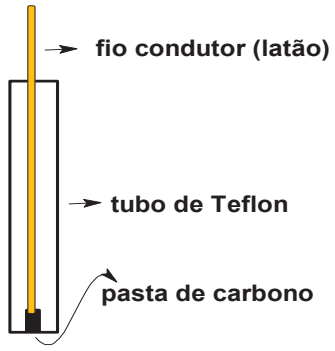


Figura 1: Eletrodo suporte para pasta de carbono.

O eletrodo de trabalho imobilizado com a enzima foi cuidadosamente colocado na cela juntamente com os eletrodos de referência e contra eletrodos e

posteriormente otimizado o sistema com relação a: velocidade de varredura, potencial de varredura, potencial hidrogeniônico e sensibilidade aos substratos hidroquinona (HQ) e catecol (CAT).

Os estudos a diferentes potenciais hidrogeniônicos foram feitos em soluções tampão acetato e fostato 0,1 mol L^{-1}. Os substratos catecol (CAT) e hidroquinona (HQ) com concentrações de 0,01 mol L^{-1} foram adicionados a cela, em alíquotas de 200 e 400 µL.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo da enzima lacase em solução

Inicialmente foram feitos estudos de oxidação e redução da enzima lacase em solução por voltametria cíclica, com o objetivo de avaliar possíveis picos característicos da enzima.

4.1.1 Otimização da faixa de potencial por voltametria cíclica

Os estudos envolvendo a faixa de potencial de oxidação e redução por voltametria cíclica com a solução tampão acetato a pH 5 com eletrodo de trabalho de carbono vítreo (Figura 2), abrangem uma faixa de potencial de -1 a 1 V, sem a presença de sinais interferentes e também limitada pelos potenciais de oxidação e redução do eletrodo de trabalho, entre as faixas de -0,8 a +1,1 V (HARRIS, 2001), sendo esse o potencial utilizado nas outras análises. Esse estudo também foi utilizado para tampão fosfato pH 7, obtendo-se os mesmos resultados.

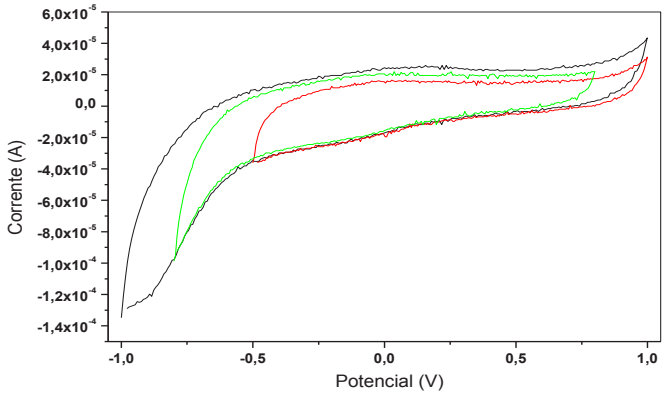


Figura 2: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de carbono vítreo imerso em solução tampão acetato 0,1 mol $L^{-1,}$ pH 5, velocidade de varredura 100 mV s^{-1} .

4.1.2 Otimização da velocidade de varredura

Foram feitos estudo por voltametria cíclica em velocidades de varredura de 100 mV s^{-1} e 500 mV s^{-1} (Figura 3), observou-se que a velocidade de varredura de 500 mV s^{-1} apresentou uma maior razão sinal-ruído, utilizando a maior velocidade de varredura para estudos posteriores.

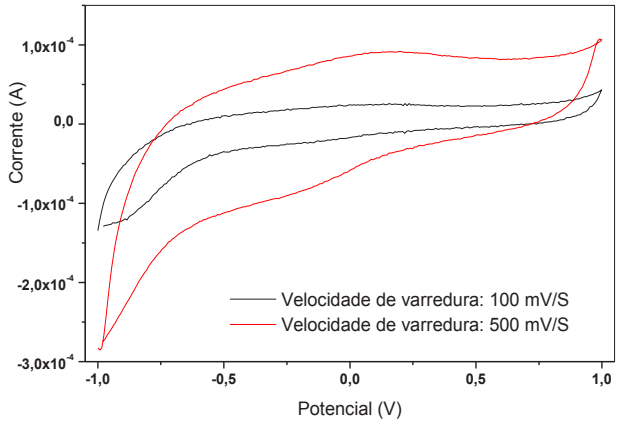


Figura 3: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de carbono vítreo imerso em solução tampão acetato 0,1 mol $L^{-1,}$ pH 5, a diferentes velocidades de varredura.

4.1.3 Estudo da adição da enzima em solução a pH 5 e pH 7

Os picos de oxidação e redução da enzima lacase apresentaram diferentes valores de potencial nos potenciais hidrogeniônicos estudados. A pH 5 (Figura 4) a enzima apresenta picos de oxidação acima de 0 V, no entanto a pH 7 (Figura 5) os potencias de oxidação da enzima lacase encontram-se abaixo de 0 V.

Verificou-se que com a adição da enzima em solução (Figuras 4 e 5) houve um aumento significativo nos sinais de corrente.

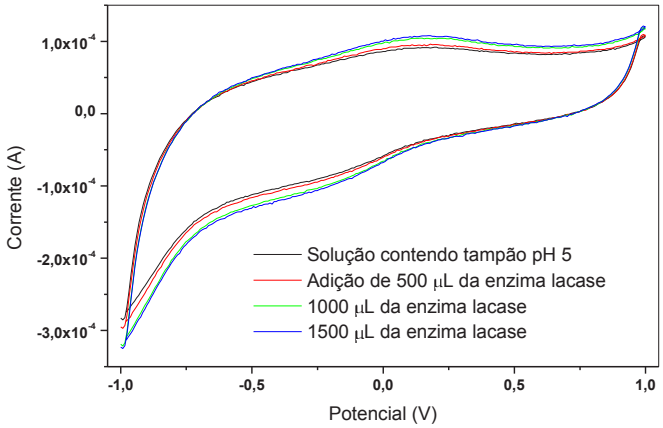


Figura 4: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de carbono vítreo imerso em solução tampão acetato 0,1 mol $L^{-1,}$ pH 5, velocidade de varredura 500 mV s^{-1} variando a concentração de enzima na solução.

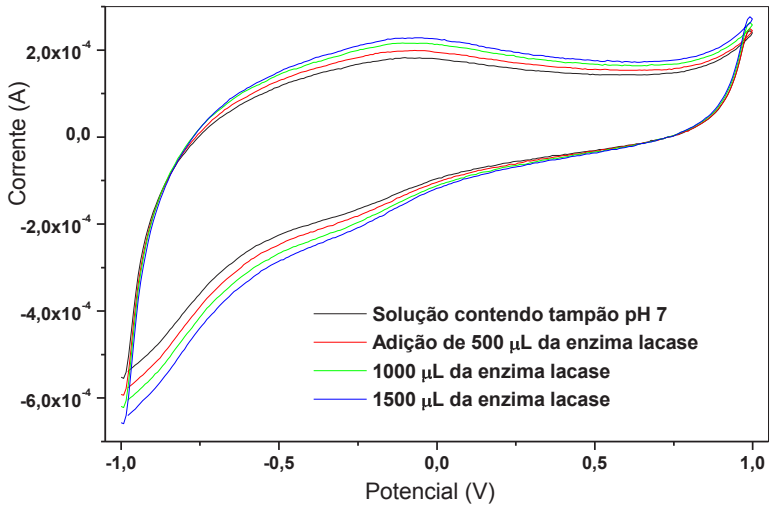


Figura 5: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de carbono vítreo imerso em solução tampão acetato 0,1 mol $L^{-1,}$ pH 7, velocidade de varredura 500 mV s^{-1} variando a concentração de enzima na solução.

4.2 Estudo da enzima lacase em pasta de carbono

4.2.1 Estudo dos substratos HQ e CAT variando o pH

O potencial hidrogeniônico para o substrato HQ apresentou perfis de voltamogramas cíclicos diferentes (Figuras 6 e 7). A pH 5 o voltamograma apresentou pelo seu aspecto uma característica mais reversível, com picos de oxidação e redução da molécula de HQ. Os picos catódicos e anódicos irreversíveis a pH 7 são alongados e mais separados para ambos os substratos, característicos de sistemas irreversíveis.

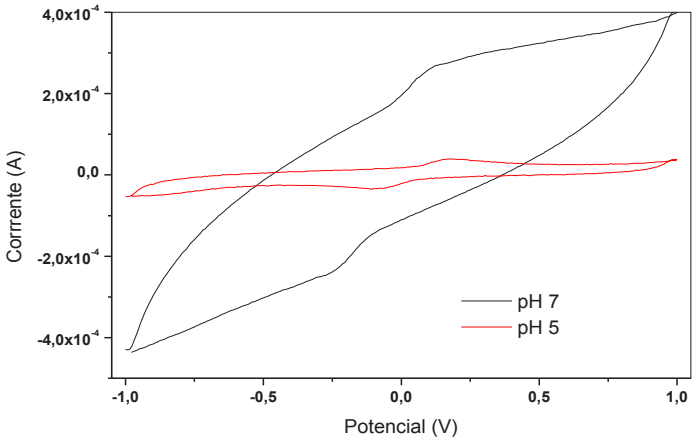


Figura 6: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de pasta de carbono imobilizado com a enzima lacase em solução tampão acetato 0,1 mol $L^{-1,}$ pH 5 e fosfato 0,1 mol L^{-1}a pH 7 com 1000 µL de HQ 10^{-2} mol L^{-1} a 500 mV s^{-1}.

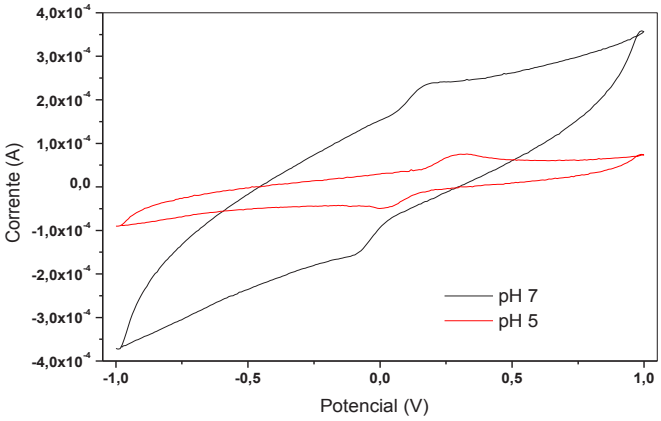


Figura 7: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de pasta de carbono imobilizado com a enzima lacase em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1}, pH 5 e fosfato 0,1 mol L^{-1} a pH 7 com 1000 µL de CAT 10^{-2} mol L^{-1} a 500 mV s^{-1}.

4.2.2 Estudo a pH 5 variando os substratos – HQ e CAT.

Verificou-se a pH 5 (item 4.2.1) os picos de oxidação e redução da enzima podem ser melhor observados.

A pH 5 os potenciais de oxidação e redução dos substratos HQ e CAT são diferentes, o que possibilita uma identificação qualitativa, verificando-se que para a o CAT o picos de oxidação e redução se encontram acima de 0 V (Figura 8).

Os picos de corrente anódico e catódico também são diferentes em cada um dos substratos, observando-se que no substrato CAT o sinal de corrente catódico é maior, o que é característico do substrato catecol com relação a enzima lacase.

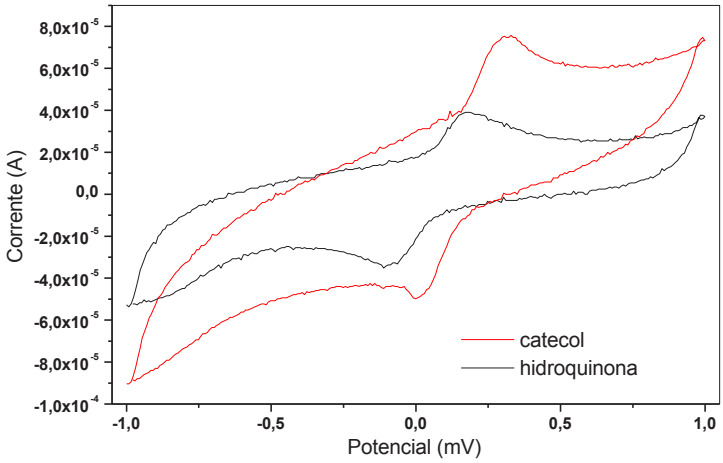


Figura 8: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de pasta de carbono imobilizado com a enzima lacase em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1}, pH 5 com 1000 µL de CAT e HQ 10^{-2} mol L^{-1} a 500 mV s^{-1}.

4.2.3 Estudo a pH 7 variando os substratos – HQ e CAT.

A pH 7 a identificação qualitativa dos substratos não pode ser verificada como a pH 5, pois os picos de oxidação e redução dos substratos são muito próximos, assim como os sinais de corrente catódica e anódica. Os voltamogramas (Figura 9) apresentaram um perfil de um sistema irreversível alongados e separados.

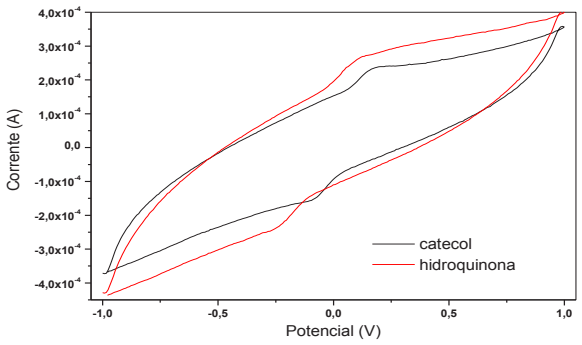


Figura 9: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de pasta de carbono imobilizado com a enzima lacase em solução tampão acetato 0,1 mol $L^{-1,}$ pH 7 com 1000 µL de CAT e HQ 10^{-2} mol L^{-1} a 500 mV s^{-1}.

4.2.4 Estudo a pH 5 variando a concentração dos substratos – HQ e CAT.

Os estudos envolvendo a variação da concentração dos substratos possibilitou observar a sensibilidade da enzima lacase imobilizada na pasta de carbono com pequenas adições de HQ e CAT (Figuras 10 e 11). O aparecimento de picos catódicos e anódicos, com relação ao eletrodo de trabalho de pasta de carbono sem a enzima, demonstra a seletividade e a sensibilidade se comparado a enzima imobilizada na pasta de carbono (Figura 10 e 11).

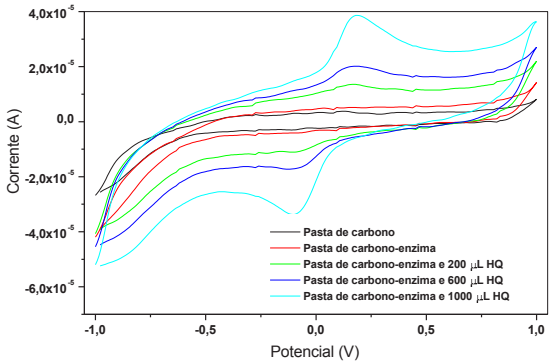


Figura 10: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de pasta de carbono imobilizado com a enzima lacase em solução tampão acetato 0,1 mol $L^{-1,}$ pH 5 com adição de HQ 10^{-2} mol L^{-1} a 500 mV s^{-1}.

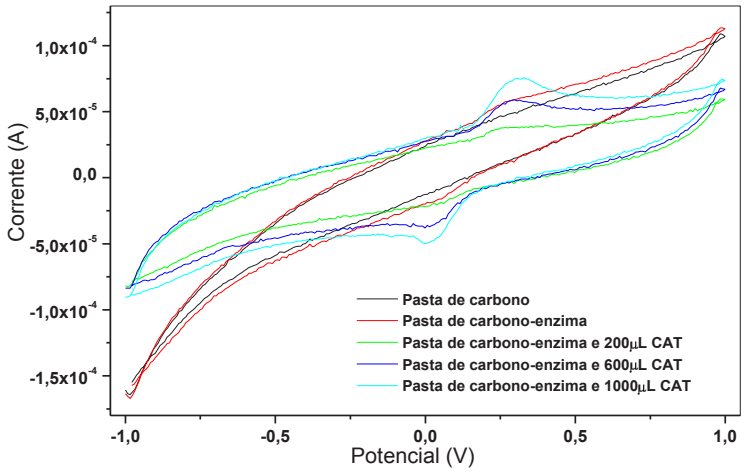


Figura 11: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de pasta de carbono imobilizado com a enzima lacase em solução tampão acetato 0,1 mol $L^{-1,}$ pH 5 com adição de CAT 10^{-2} mol L^{-1} a 500 mV s^{-1}.

4.2.5 Estudo a pH 7 variando a concentração dos substratos – HQ e CAT

Os estudos a pH 7 variando-se a concentração dos substratos apresenta um voltamograma cíclico de um sistema irreversível (Figuras 12 e 13), cuja sensibilidade com relação aos picos anódicos para uma mesma concentração de substratos é menor se comparada ao estudo em pH 5. Os picos anódicos e catódicos observados na pasta de carbono contendo a enzima são semelhantes aos picos encontrados no estudo em solução com eletrodo de carbono vítreo contendo a enzima em solução (Figura 5).

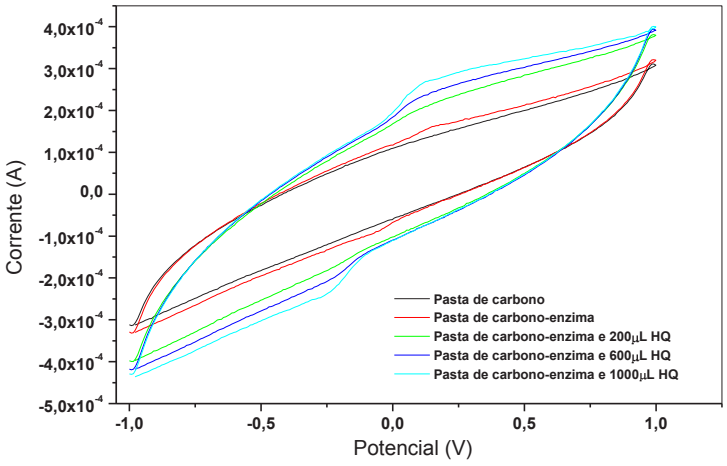


Figura 12: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de pasta de carbono imobilizado com a enzima lacase em solução tampão acetato 0,1 mol $L^{-1,}$ pH 7 com adição de HQ 10^{-2} mol L^{-1} a 500 mV s^{-1}.

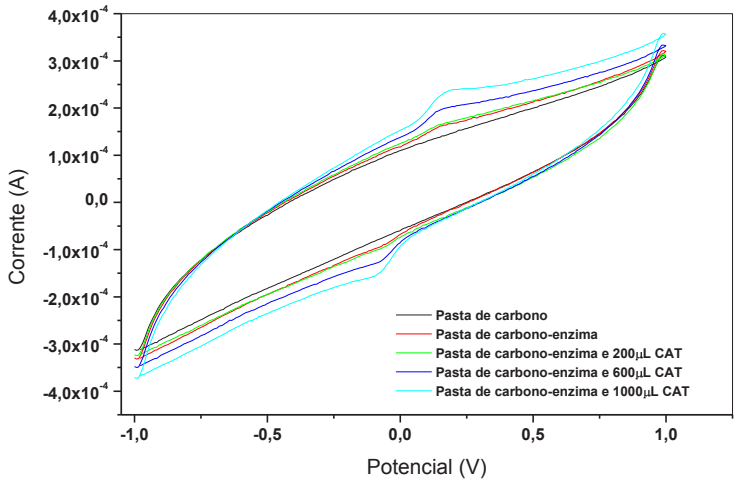


Figura 13: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de pasta de carbono imobilizado com a enzima lacase em solução tampão acetato 0,1 mol $L^{-1,}$ pH 7 com adição de CAT 10^{-2} mol L^{-1} a 500 mV s^{-1}.

5 CONCLUSÃO

Os estudos em solução da enzima lacase e da pasta de carbono com a enzima imobilizada possibilitaram a visualização de picos catódicos e anódicos característicos da enzima.

O melhor potencial hidrogeniônico observado para os diferentes substratos foi em pH 5 com voltamogramas cíclicos reversíveis e com picos catódicos e anódicos característicos dos diferentes substratos.

A enzima lacase apresentou uma melhor seletividade para o substrato catecol se comparado a hidroquinona, o que pode ser confirmado pela literatura.

Portanto o eletrodo de trabalho contendo a enzima imobilizada possibilitou distinguir os substratos HQ e CAT a diferentes potenciais hidrogeniônicos, o que possibilita ampliar os estudos em matrizes ambientais contendo pesticidas polifenólicos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FATIBELLO, O.; CAPELATO, M. D.; **Biossensores**. Química nova, 1992, Vol. 15, No 1, 28-39.

GIL, E. S.; MULLER, L.; SANTIAGO, M.F.; GARCIA, T. A.; Biosensor based on brut extract from Laccase (Pycnoporus sanguineus) for Environmental Analysis of Phenolic Compound. Portugaliae Electrochimica Acta, 2009, Vol. 27, No 3, 215-225.

HARRIS, D. C.; Análise **química qualitativa**, 2001, LTC, p. 418-419.

PORTACCIO, M.; DI MARTINO, S.; MAIURI, P.; DURANTE, D.; DE LUCA, P. LEPORE, M.; BENCIVENGA, U.; ROSSI, S.; DE MAIO, A. e MITA, D. G. **Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 41, 97–102.

RASOOLY, A. "**Biosensor technologies**", 2005, *Methods* 37: 1-3.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; MARCO, M-P; DE ALDA, M. J. L. e BARCELÓ, D. 74 **Biosensors for environmental applications: Future development trends**. Pure Appl. Chem., 2004, Vol. 76, No. 4, pp. 723–752.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N. e KUBOTA, L. T. **Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesses ambiental**. Quim. Nova, 2001, Vol. 24, No. 1, 77-86.

SEYDA, K.; BULET, K.; ELIF, E. **An amperometric biosensor based on multiwalled carbon nanotube-poly(pyrrole)-horseradish peroxidase nanobiocomposite film for determination of phenol derivatives**. Talanta 76 (2008) 1147–1152.

Materiais Óxidos Fotorrefrativos

Tárcio de Castro Silva, Thiago Martins Amaral e Jesiel Freitas Carvalho

Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-Go 74001-970, Brasil

E-mail: carvalho@if.ufg.br

Palavras Chaves: cerâmica, sillenita, BTO.

1 INTRODUÇÃO

Cerâmicas são materiais policristalinos com vasto uso tecnológico e de grande interesse científico, geralmente apresentando baixo custo de produção, fácil preparação e inúmeras propriedades [1]. A palavra cerâmica vem do grego Keramikos, que significa “matéria prima queimada”, indicando que as propriedades desejáveis desses materiais são normalmente atingidas através de um processo de tratamento térmico a alta temperatura conhecido por sinterização [2].

Nos últimos 50 anos, os materiais cerâmicos restringiam-se somente a materiais cuja finalidade era para uso em construção civil como telhas, tijolos e azulejos ou para uso doméstico como louça e porcelanas. Recentemente, houve um progresso significativo em relação à compreensão da natureza fundamental desses materiais e dos fenômenos que ocorrem neles e que são responsáveis pelas suas propriedades únicas [2]. Consequentemente, o conceito de cerâmica ganhou um significado mais amplo.

Esses novos materiais possuem um efeito consideravelmente dramático em nossas vidas, as indústrias de componentes eletrônicos, de computadores, de comunicação, a indústria aeroespacial e uma gama de outros segmentos industriais dependem do uso desses materiais [2].

O desenvolvimento de novas técnicas para obtenção de cerâmicas vem possibilitando a obtenção de materiais cerâmicos transparentes [6]. Tais materiais policristalinos transparentes visam a substituição dos monocristais em aplicações ópticas [6]. Desta maneira, podem ser obtidos componentes com formatos específicos, maior resistência mecânica e térmica e melhor desempenho óptico [6], podendo substituir os monocristais em, por exemplo, lasers de estado sólido.

Portanto, recentemente, grupos de pesquisas têm direcionados seus esforços para produzir cerâmicas transparentes para substituir cristais simples em suas aplicações ópticas, com resultados promissores [3-5].

A produção de cerâmicas transparentes consiste em eliminar centros espalhadores de luz. Isso significa maximizar a densidade do corpo sinterizado por minimização de aprisionamento de poros e suavização do contorno de grão, que são obtidos a partir de estudos relacionados à prensagem do material a verde, ao programa de sinterização e utilização de aditivos específicos para ajudar a obter as propriedades desejadas. Ainda não existe uma técnica consolidada sobre como fazer isto, mas os diversos trabalhos publicados indicam maneiras que podem ser aproveitadas em nossos próprios ensaios.

O Grupo de Física de Materiais da UFG, com sua vasta experiência em cristais de BTO, visa, com este trabalho, estudar a obtenção de cerâmicas transparentes deste material.

O $Bi_{12}TiO_{20}$ (BTO) é um cristal da família sillenita, de grupo espacial I23, com estrutura cúbica, é um cristal muito promissor devido as suas diversas propriedades como piezo-eletricidade, presença do efeito eletro e magneto óptico, fotocondutividade, atividade óptica e efeito fotorrefrativo.

No entanto o BTO é um cristal de trabalhosa e onerosa obtenção. Por apresentar ponto de fusão incongruente, o cristal requer crescimento por uma variação da técnica de Czochralski, a Top seeded solution growth (TSSG), na qual a solução de partida possui estequiometria diferente da do cristal. Além disso, deve-se tomar cuidados para evitar formação de defeitos de crescimento, como *core*, estrias, inclusões ou policristalização, que comprometem severamente a eficiência óptica final do cristal obtido e encarecem bastante o processo [8].

Recentes progressos em obtenção de nanopartículas, ciclos de sinterização em múltiplas etapas, e técnicas recentes de densificação, podem produzir cerâmicas extremamente densas. Cerâmicas livres de poros com grãos na faixa de tamanho nanométrico, prometem ter aplicações em componentes ópticos, mecânicos, elétricos e outras propriedades para o uso em lasers e dispositivos eletrônicos [7]. Por esse motivo, o grupo vem utilizando diferentes métodos para a obtenção de BTO nanométrico, para o posterior uso no

processamento de cerâmicas.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi a preparação de materiais policristalinos de $Bi_{12}TiO_{20}$ na forma de pós e cerâmicas.

3 METODOLOGIA

3.1. PREPARAÇÃO DO PÓ

Após a obtenção do pó de partida por síntese no estado sólido, este foi moído e peneirado para a moldagem dos corpos cerâmicos. Para a moagem do pó, foi utilizado um moinho rotatório mostrado na figura 1.



Figura 1: Moinho rotatório utilizado na moagem do pó obtido após a síntese no estado sólido.

O pó foi colocado em um frasco de polipropileno junto com esferas de zircônia de 5mm e preenchendo-o com álcool isopropílico. A moagem foi realizada durante 72 horas.

O pó resultante da moagem foi peneirado e homogeneizado em um almofariz utilizando álcool isopropílico. Utilizando um difratômetro automático SHIMADZU XRD – 6000, do instituto de química da UFG, foram realizadas difrações de raios x para confirmar se a amostras eram monofásicas, ou seja, se havia somente a fase monoclínica presente no pó analisado. As condições das análises utilizadas foram: intervalo de medida de 10^o a 80^o, com varredura contínua à velocidade de 2°/min, com passo de $0,02^o$.

3.2. PREPARAÇÃO E PRENSAGEM DOS CORPOS CERÂMICOS

As pastilhas a verdes foram obtidas a partir de uma mistura de pó de BTO aos quais foram adicionados 0,5% em massa de Bi_2O_3 como aditivo. Espera-se que este excesso de Bi_2O_3 vá formar uma fase líquida na região de contorno de grãos durante o processo de sinterização, facilitando difusão de material e, consequentemente, favorecendo eliminação de poros. Além disso, o BTO também é obtido com excesso de Bi_2O_3, portanto, nas regiões de contorno de grão espera-se também obter esta fase, suavizando o espalhamento de luz devido à diferença de índice de refração entre os grãos e seu contorno.

Os corpos a verdes foram moldados com pressão uniaxial de 250MPa, utilizando uma prensa convencional e um pastilhador a vácuo, mostrada na Figura 2, lubrificado com vaselina.



Figura 2 - Pastilhador a vácuo.

Desta maneira foram obtidas 7 pastilhas denominadas de BTO 05.0X, onde 05 representa o excesso de 0,5% em massa de Bi_2O_3 e X recebe valores de 1 a 7, indicando cada uma das cerâmicas produzidas.

3.3. SINTERIZAÇÃO DAS CERÂMICAS

No processo de sinterização observa-se difusão de massa através da superfície, do volume e dos contornos de grãos. Este processo faz com que as

partículas unidas durante a prensagem, se soldem e cresçam até formar uma massa compacta, de alta densidade, esperando-se que seja livre de poros. A sinterização é dependente das condições de temperatura e do tamanho dos grãos, entre outros fatores.

As cerâmicas de BTO foram sinterizadas em programas diferentes a fim de estudar qual seria o mais indicado para a continuidade dos trabalhos. As amostras BTO 05.01, BTO 05.02, BTO 05.03 fundiram no processo devido à alta temperatura atingida, restando apenas as cerâmicas BTO 05.04, BTO 05.05, BTO 05.06 e BTO 05.07. O programa de sinterização mostrado na figura 3 a seguir, foi utilizado para as cerâmicas BTO 05.04, BTO 05.05, BTO 05.06 e BTO 05.07, diferenciando-se apenas quanto ao tempo que permaneceram na temperatura de 810ºC (t_h) e ao tempo que passaram a 730ºC (t_1).

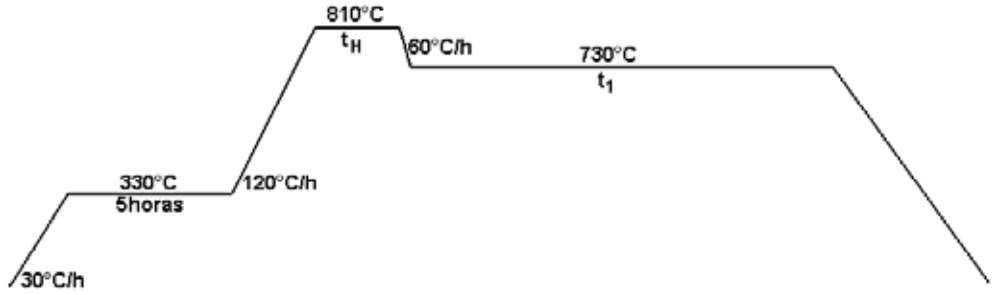


Figura 3: Programa de sinterização das cerâmicas.

As duas primeiras rampas de aquecimento foram idênticas para as cerâmicas citadas acima, ou seja, o sistema aqueceu até 300°C a uma taxa de 30°C/h, mantendo-se nesse patamar durante 5 horas. Na segunda rampa, a temperatura foi elevada até 810°C a uma taxa de 120°C/h. Neste patamar, o tempo de repouso variou para cada cerâmica. As cerâmicas BTO 05.05 e 05.07 foram deixadas nesta temperatura durante 5 minutos e para as cerâmicas BTO 05.04 e 05.06, 10 minutos. As cerâmicas foram então resfriadas até a temperatura de 730°C a uma taxa de 60°C/h. Neste patamar, o tempo de permanência das cerâmicas na temperatura de 730°C variou. As cerâmicas BTO 05.06 e BTO 05.07 foram mantidas durante 10 horas nesta temperatura e as cerâmicas BTO 05.04 e BTO 05.05 foram deixadas durante 5 horas nesta temperatura. Na última rampa, as cerâmicas foram resfriadas até a temperatura ambiente a uma taxa de 60°C/h. O processo de sinterização foi feito em um

forno resistivo com controlador microprocessado que pode chegar a 1200°C. A tabela 1 a seguir, mostra o tempo utilizado na sinterização de cada cerâmica na temperatura de t_H e t_1, visto que são as variáveis nos programas utilizados.

Tabela 1: Tempo de sinterização das cerâmicas BTO 05.04, BTO 05.05, BTO 05.06 e BTO 05.07, na temperatura de 810°C (t_H) e 730°C (t_1).

Amostra	Tempo em t_H (minutos)	Tempo em t_1 (horas)
05.04	10	10
05.05	5	10
05.06	10	5
05.07	5	5

3.4. CARACTERIZAÇÃO

3.4.1. DENSIDADE RELATIVA

As amostras tiveram suas densidades calculadas pelo método de Arquimedes, que consiste em medir o empuxo nas amostras ao mergulhá-las em um líquido de densidade conhecida (no caso, água) e calcular sua densidade. Então, compara-se a densidade obtida por este método com a densidade teórica do BTO (9,08g/cm^3) para obter a densidade relativa dos corpos sinterizados.

3.4.2. IMAGENS DE MEV

Por falta de tempo hábil optou-se por fazer imagens das fraturas das cerâmicas. Desta maneira, economiza-se o tempo gasto em polí-las e revelar termicamente seus contornos de grãos. No entanto há a necessidade de quebrá-las para ter acesso aos grãos de seu interior. Logo, provocou-se uma fratura nas quatro amostras estudadas e utilizou-se tinta de prata para prendê-las no porta amostras e servir de condutor para se retirar acúmulos de carga na superfície que poderiam comprometer a fidelidade das imagens. Fixadas nos respectivos porta-amostras, elas receberam uma fina camada de ouro,

depositada por *sputtering*, no laboratório de microscopia eletrônica da USP de São Carlos. Neste laboratório, também foram obtidas as imagens desejadas utilizando o microscópio eletrônico disponível.

3.5. OBTENÇÃO DO BTO

3.5.1. PROCESSO HIDROTERMAL

Em um bécher de 100ml, foram dissolvidos quantidades estequiométricas de $Bi(NO_3)_3.5H_2O$ e isopropóxido de titânio na proporção de 6:1 utilizando HNO_3 (65%), sob constante agitação e à temperatura ambiente. Após a total dissolução, a solução foi diluída com a adição de água destilada. Foi adicionado na solução, Isopropanol de modo a completar 20% do volume total da solução. Utilizando uma solução NaOH (5M) já preparada, o pH da solução foi ajustado até 12. A solução de NaOH foi adicionada lentamente e sob constante agitação.

A solução logo foi transferida para um copo de teflon, este por sua vez, foi colocado dentro de uma autoclave pertencente ao Instituto de Química da UFG. A autoclave foi corretamente fechada para evitar a perda de gases durante o processo de aquecimento, e também, para evitar algum acidente devido à alta pressão desejada. O reator foi deixado durante 3 horas à 140ºC no forno do laboratório de Crescimento de Cristais por Solução Aquosa, no Grupo de Física dos Materiais da UFG.

Após o tempo de aquecimento, a autoclave foi retirada do forno, o precipitado foi separado do sobrenadante e lavado 10 vezes com água destilada em um sistema a vácuo, montado dentro do próprio laboratório. Logo em seguida, o precipitado foi secado dentro de um forno a uma temperatura de 80ºC durante 3 horas para retirar o resíduo de água.

Com o sólido totalmente isento de água, foi feito um teste de raios x, utilizando um difratômetro automático SHIMADZU XRD – 6000 do instituto de química da UFG, usando as seguintes condições: intervalo de 10^o a 80^o, varredura contínua com velocidade de 1^o/min. Verificou-se a síntese produziu a fase monoclínica do α-Bi_2O_3, e não a fase sillenita do BTO.

Para testar a correta estequiometria do pó obtido por reação hidrotermal, ele foi submetido a um tratamento térmico em cadinho de ouro utilizando o

programa mostrado na figura 4. O sistema foi inicialmente aquecido até a temperatura de 700ºC a uma taxa de 60ºC/h, o pó foi mantido nessa temperatura durante 12 horas. Logo após, o sistema foi aquecido até a temperatura de 800ºC a uma taxa de 60º/h e mantido nessa temperatura durante 12 horas. Após esse tempo, o pó foi resfriado até a temperatura ambiente.

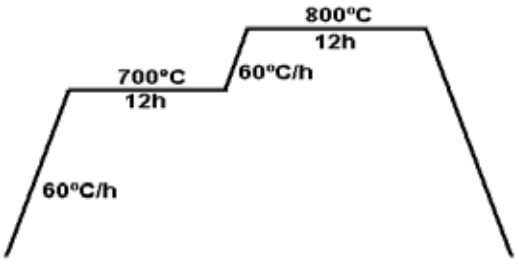


Figura 4: Programa de síntese para o BTO

Após a síntese no estado sólido, o pó resultante foi pulverizado em um almofariz e levado para fazer outra medida de DRX, onde foram usadas as mesmas condições já descritas acima, tendo-se confirmado a formação do BTO, demonstrando que a estequiometria de partida estava correta e a não obtenção da fase desejada está relacionada com a rota sintética.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como citado anteriormente, as cerâmicas BTO 05.01, BTO 05.02, BTO 05.03, fundiram no processo de sinterização, portanto, essas pastilhas foram descartadas para estudos posteriores. A tabela 2 mostra as características das pastilhas BTO 05.04, BTO 05.05, BTO 05.06 e BTO 05.07 como: massa utilizada para moldar a pastilha, altura da pastilha, diâmetro, densidade a verde (densidade medida antes do processo de sinterização), densidade final e a densidade relativa.

Tabela 2: Dados das pastilhas BTO 05.04, BTO 05.05, BTO 05.06 e BTO 05.07. As medidas de altura (h), diâmetro (d) e densidade a verde (ρ_v), foram feitas antes do processo de sinterização e a densidade final (ρ_f) e relativa (ρ_r), foram feitas após o processo de sinterização.

Amostra	m (g)	h (mm)	d (mm)	ρ_v (g/cm^3)	ρ_f (g/cm^3)	ρ_r (%)
05.04	0,5549	1,66	9,10	5,14	8,83	97,5
05.05	0,5507	1,61	9,10	5,26	8,80	97,1
05.06	0,5503	1,63	9,10	5,19	8,85	97,7
05.07	0,5560	1,62	9,10	5,23	8,98	99,1

A figura 5, a seguir, mostra a microestrutura revelada por MEV (Microscopia de Varredura Eletrônica), realizada no Instituto de Física da Universidade de São Carlos em São Paulo para as amostras BTO 05.04, BTO 05.05, BTO 05.06 e BTO 05.07.

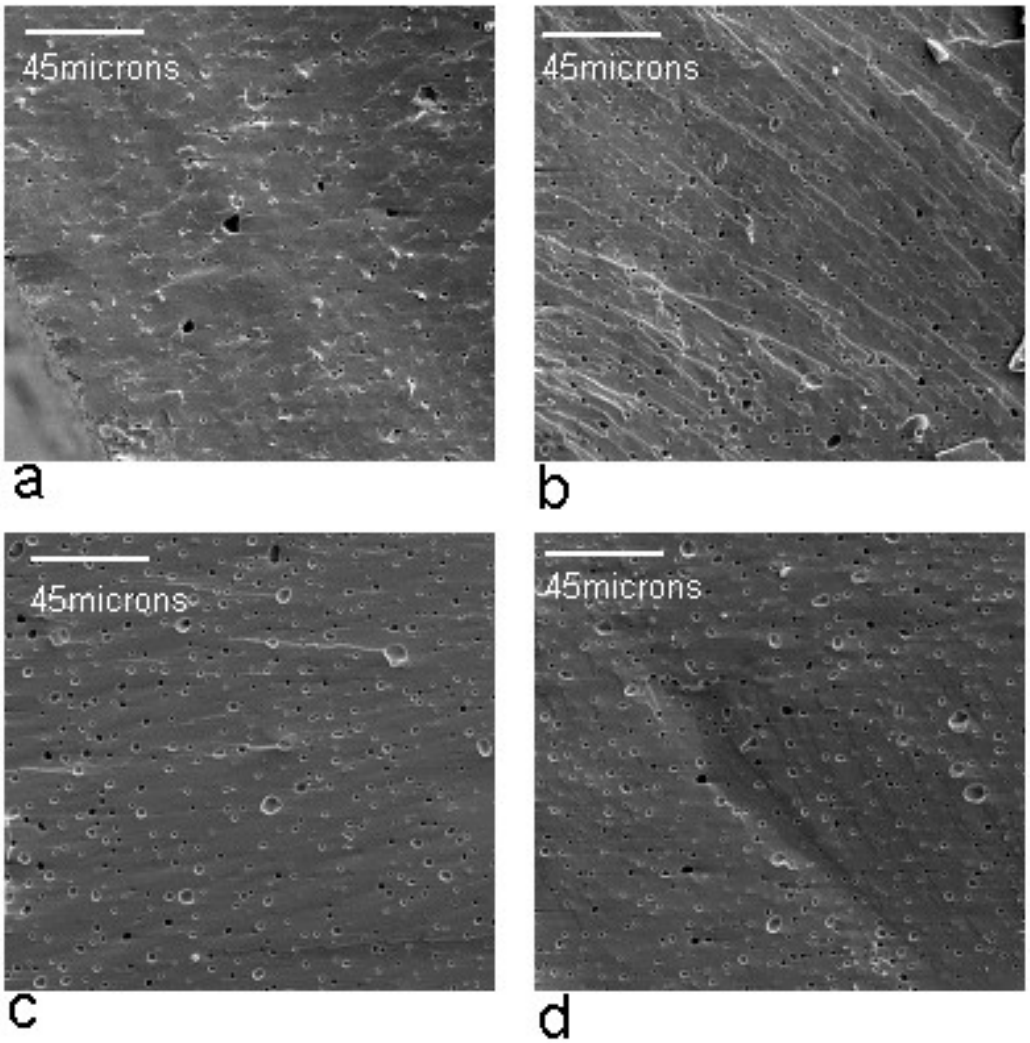


Figura 5: Imagens de microscopia de varredura eletrônica (MEV) para as cerâmicas BTO 05.04 (a), BTO 05.05 (b), BTO 05.06 (c) e BTO 05.07 (d), todas ampliadas em 500X.

A figura 5 mostra a grande quantidade de poros presentes nas cerâmicas BTO 05.04, BTO 05.05, BTO 05.06 e BTO 05.07, em consequência da grande quantidade de poros, percebe-se a baixa densidade relativa ρ_r (%) obtida para essas cerâmicas, como pode ser vista na tabela 2.

A figura 6, a seguir, mostra as imagens reveladas por microscopia óptica das cerâmicas BTO 05.04, BTO 05.05, BTO 05.06 e BTO 05.07. As imagens de microscopia óptica na figura 6, mostram um grande e acelerado crescimento dos grãos, a ponto de haver massa suficiente para se perceber o hábito cristalino nas cerâmicas, representadas pelas formas regulares presentes no corpo cerâmico.

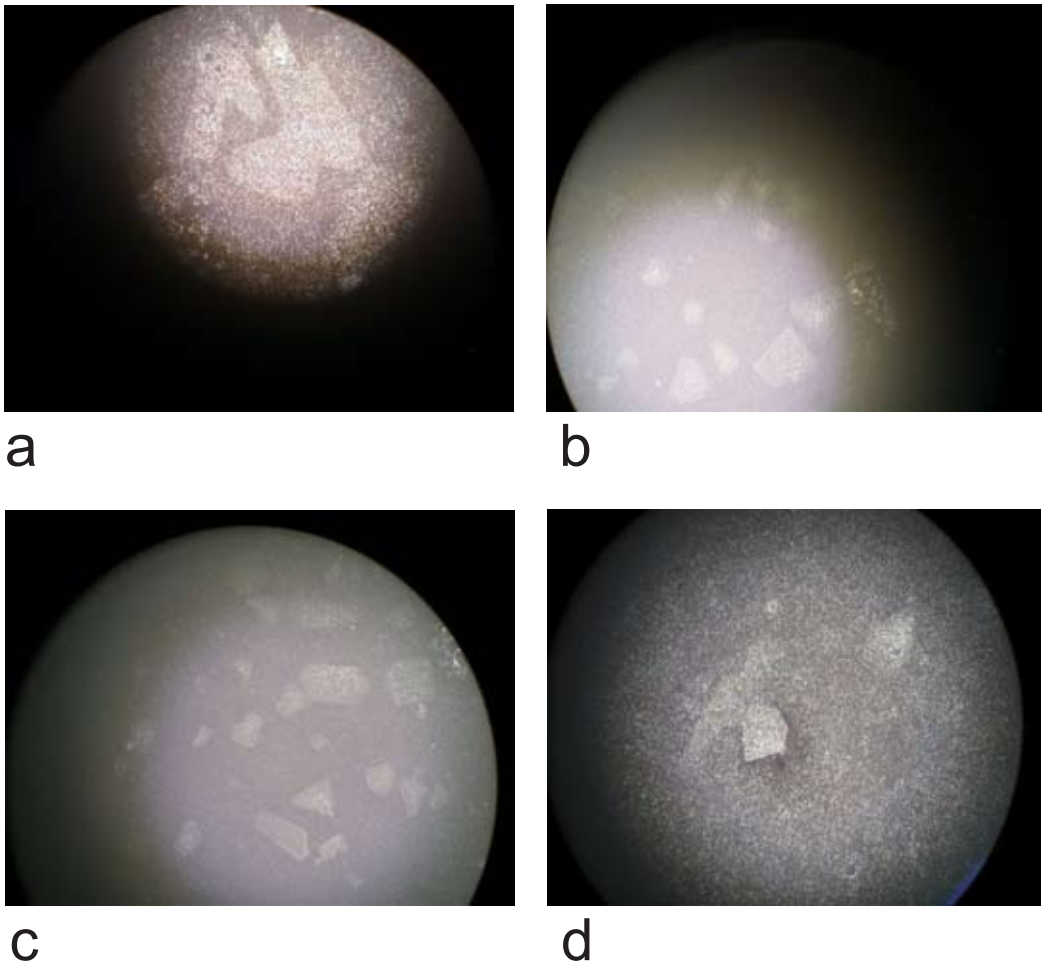


Figura 6: Imagens de microscopia óptica para as cerâmicas BTO 05.04 (a), BTO 05.05 (b), BTO 05.06 (c) e BTO 05.07 (d), todas aumentadas em 100X.

Apesar de não ter obtido o BTO no processo hidrotermal, que foi confirmado pelo resultado de DRX, havendo somente o α-Bi_2O_3, não houve

perda da estequiometria durante as etapas do procedimento, ou seja, toda a massa de $Bi(NO_3)_3.5H_2O$ e $C_{12}H_{28}O_4Ti$ se dissolveu em HNO_3 (65%) e não houve perda da solução ao transferí-la de recipiente (bécher para a autoclave).

O gráfico a seguir, figura 7, mostra o resultado obtido pela difração de raios x (DRX), realizado após a síntese do pó feita no programa mostrado na figura 4. O gráfico em vermelho mostra o resultado do teste de DRX realizado após a síntese no estado sólido do pó obtido após o processo hidrotermal, percebe-se neste, comparando com o gráfico BTO cristalino (gráfico de referência), que foi obtido o BTO utilizando o processo hidrotermal seguido pela síntese no estado sólido.

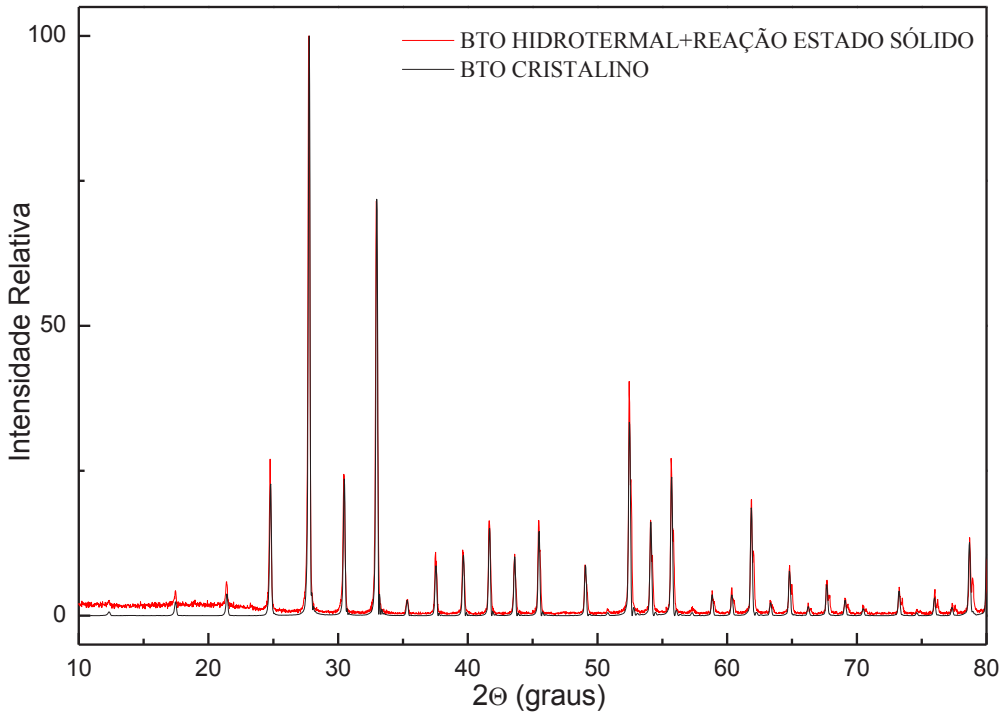


Figura 7: Difratogramas de raios x do pó sintetizado e simulação utilizando o programa mostrado na figura 4.

5 CONCLUSÃO

Os testes iniciais com Bi_2O_3 como aditivo foram insatisfatórios, resultando em cerâmicas de baixa densidade. A utilização do aditivo nas cerâmicas causou a formação de uma fase líquida, o que provocou o rápido crescimento dos grãos da cerâmica, e por conseqüência, ocorreu o

aprisionamento dos poros. Novos testes envolvendo mudança na concentração do aditivo e outros programas de sinterização serão ainda testados.

A tentativa de obtenção do BTO pelo método hidrotermal, não deu resultado satisfatório. Novos testes para obtenção de BTO nanométrico, serão realizados com a mudança de reagente e utilizando outros métodos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] KYNGERY, W.D.; BOWEN, H.K.; UHLMANN, D.R. Introduction to Ceramics. Ed. Wiley Blacwell, 2nd Edition, 1976.

[2] CALLISTER, W.D; WILEY, J.J. Materials Science and Engineering an Introduction. New York, NY, 1991.

[3] RABINOVITCH, Y.; TETARD, D.; FAUCHER, M.D.; PHAM-THI, M. Optical Materials, v. 24, p. 345-351, Feb 2003.

[4] CHENG, C.; AGRAWAL, D.; ZHANG, Y.; ROY, R. Materials Latters, USA, v. 56, p. 587-592, Jan 2002.

[5] YAGI, H.; YANAGITANI, T.; TAKAICHI, K.; UEDA, K.; KAMINSKII, A.A. Optical Materials, Japan, v. 29, p. 1258-1262, Sep 2006.

[6] YAGI, H., YANAGITANI, T.; TAKAICHI, K.; UEDA, K.; KAMINSKII, A.A. Characterizations and laser performances of highly transparent Nd^{3+}:$Y_3Al_5O_{12}$ laser ceramics. Optical Materials, Japan, v. 29, p. 1258-1262, Sep 2006.

[7] MESSING, G.L.; STEVENSON. A.J.; Toward Pore-Free Ceremics. Science. Vol. 322, p. 383-384, Oct 2008.

[8] FERREIRA, K.D., Estudo de fases e crescimento de monocristais no sistema Bi2O3-TiO2-ZrO2, Dissertação de mestrado, UFG, 2008.

ANÁLISE DAS ANOTAÇÕES DE ENFERMAGEM EM PRONTUÁRIOS DE PACIENTES ATENDIDOS NA CLÍNICA MÉDICA DE UM HOSPITAL ESCOLA[1]

Queiliene Rosa dos Santos[2], Maria Márcia Bachion[3]

Faculdade de Enfermagem/UFG, Goiânia-GO 74605-080, Brasil

E-mail: queiliene@hotmail.com, mbachion@gmail.com.

Palavras-chave: avaliação em enfermagem, diagnóstico de enfermagem, processos de enfermagem, registro de enfermagem.

INTRODUÇÂO

O processo de enfermagem (PE), como forma de organização do trabalho, é importante ferramenta de gestão do cuidado (FONTES, CRUZ, 2007), favorecendo atendimento individualizado (SANTOS et al, 2008) e de qualidade (AMANTE, ROSSETTO, SCHNEIDER, 2009). Seu uso é obrigatório no Brasil (COFEN, 2002) e preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2001).

A enfermagem tem se preocupado em qualificar o atendimento prestado nas instituições de saúde mediante implantação do PE (VARGAS, FRANÇA, 2007), que sistematiza e dinamiza os cuidados prestados ao cliente (GUEDES et al, 2009) e possibilita aos enfermeiros o planejamento e a análise da assistência (PELLISON, FRANCA et al., 2006). Para avaliar o grau de utilização dessa metodologia de assistência, podem ser examinadas as anotações de enfermagem.

Estudos revelam que nem sempre os dados que a enfermagem dispõe estão devidamente registrados nos prontuários dos pacientes (MULLER-STAUB, et al. 2007), o que compromete o atendimento e a avaliação dos mesmos. Os registros tornaram-se um dos temas mais desafiadores na enfermagem, pois denotam a qualidade de cuidado prestado (MATSUDA, et al., 2006). Nesse contexto, as ações de educação permanente ganham especial importância (LEE, CHANG, 2004; SILVA, SELFFERT, 2009).

[1] Esta pesquisa contou com o apoio do Cnpq, e foi desenvolvida junto ao Núcleo de Estudos e Pesquisas de Saúde Integral, da Faculdade Enfermagem (FEN) da Universidade Federal de Goiás.
[2] Bolsista de iniciação científica do PIBIC/Cnpq/UFG, aluna do 7º período de graduação da Faculdade de Enfermagem FEN/UFG. Email: queiliene@hotmail.com
[3] Doutora em Enfermagem. Professora Titular da FEN/UFG. Orientadora.

Um hospital escola da região centro-oeste, onde a pesquisadora está inserida como aluna, tem desenvolvido uma estratégia abrangente e inovadora de educação permanente, com a finalidade de qualificar os trabalhadores para a implantação do PE. Assim, a realização da presente pesquisa, possui a finalidade de produzir subsídios para novas ações no contexto da estratégia de educação permanente anteriormente mencionada, visando à melhoria da qualidade dos registros de enfermagem.

OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa foi analisar as anotações de enfermagem em prontuários de pacientes atendidos no setor de clínica médica de um Hospital Escola, na perspectiva do processo de enfermagem, no ano de 2008.

Constituíram objetivos específicos identificar: os temas das anotações de enfermagem; a participação das diferentes categorias profissionais de enfermagem nas anotações; a freqüência percentual de cada etapa do processo de enfermagem contemplada nas anotações; a proporção entre a identificação de condições que requerem intervenções de enfermagem e o planejamento expresso da assistência de enfermagem correspondente; a proporção entre a identificação de condições que requerem intervenções de enfermagem e a respectiva declaração de implementação da assistência; a proporção entre as anotações relativas à implementação da assistência em relação às anotações respectivas de avaliação do cuidado prestado; a pertinência das fases entre si. Além disso, pretendemos comparar os dados obtidos em relação aos anos de 2004, 2006 e 2008.

METODOLOGIA

Trata-se de estudo descritivo, de análise documental, que foi desenvolvido no setor de Clínica Médica de um hospital escola da região centro-oeste, no período de agosto de 2008 a julho de 2009.

Os documentos analisados foram prontuários dos pacientes que estiveram em atendimento no cenário de estudo no ano de 2008. Os dados que foram coletados compreendem os registros de enfermagem. Para a realização do estudo foi

selecionado por conveniência o segundo semestre para extrair a amostra, excluindo-se os meses de julho e dezembro. Assim, foi considerado para o estudo o período de agosto a novembro de 2008. Foram extraídos de modo aleatório, 60% dos prontuários dos pacientes internados no período, que atenderam os seguintes critérios de inclusão para as anotações: as mesmas deveriam referir-se à paciente que tivesse sido admitido no setor, com idade maior ou igual a 18 anos, permanecendo sob atendimento de enfermagem no mínimo por 48 horas. Foram adotados os seguintes critérios de exclusão: anotações cujo autor fosse docente ou discente, ou ainda cujo autor não pudesse ser identificado ou não fizesse mais parte do quadro de trabalhadores da UFG, ou estivesse afastado de suas atividades.

No ano de 2008, nos meses de agosto a novembro foram realizadas na clínica medica 505 admissões de pacientes. Foram solicitados ao Serviço de Arquivo Médico e Informações em Saúde (SAMIS) os prontuários e verificados os critérios de exclusão e inclusão. Desse montante foram excluídos 32 devido a idade dos pacientes ser menor de 18 anos, 64 foram excluídos por não terem anotações referentes a um período de internação de no mínimo 48h ou não estava claro o momento da admissão. Dos 409 prontuários elegíveis foram incluídos 247 na amostra. Aqueles incluídos tiveram as anotações digitadas, utilizando-se a ficha de coleta de dados, que classifica os registros de acordo com as fases do PE. As anotações foram agrupadas por similaridade, de acordo com os eixos temáticos, que emergiram na análise dos registros. A análise dos registros foram realizadas por 2 pesquisadoras, as quais receberam devido treinamento, até alcançar confiabilidade inter-pesquisadores igual ou maior de 95%. Para acompanhar a confiabilidade das analises inter-pesquisadores foram realizados cálculos do índice de concordância, que variou de 82,07 a 100%, sendo que a média desse equivale a 97,65%. Esta avaliação da confiabilidade foi realizada periodicamente, inicialmente em intervalos de 5 prontuários e posteriormente, a cada 10 prontuários.

As etapas do PE foram analisadas descritivamente, considerando a freqüência percentual de cada etapa contemplada nas anotações, a proporção entre as mesmas. A sua pertinência foi analisada qualitativamente.

O projeto do pesquisador foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (protocolo 078/2006) e atende às diretrizes nacionais sobre ética.

RESULTADOS

O processo de enfermagem possibilita sistematizar e dinamizar o cuidado, tornando-o mais eficiente (ALFARO-LEFEVRE, 2005). No cenário desta pesquisa, no entanto, não foi implementado, de acordo com os registros analisados.

Foram identificados nos 247 prontuários analisados 21.526 unidades de registro (Tabela 1), prevalecendo os relativos à implementação da assistência (64,20%), realizada em atendimento a prescrição, em atendimento a prescrição de enfermagem ou independente de prescrição, seguida da coleta de dados (34,33%). As demais etapas do PE foram registradas com freqüência entre 0,04 e 0,88%.

Em 2004 as proporções encontradas foram respectivamente de 65,52% na implementação da assistência, seguida de 32,23% na coleta de dados e as demais etapas obteve-se freqüência de 0,45 a 1,02%.

Tabela 1 - Distribuição do número de temas e freqüência de registros encontrados nas anotações conforme as etapas do Processo de Enfermagem. Clínica Médica. ago-nov. 2008.

Etapas do PE	**N° Temas**	**Registro**	
		f	***%***
Coleta de dados	43	7.389	34,33
Condição ou problema que requer intervenção de enfermagem	34	189	0,88
Planejamento da Assistência – Prescrição	2	8	0,04
Implementação da Assistência	80	13.821	64,20
Avaliação da Assistência	11	119	0,55
Total	172	21.526	100

No ano de 2008 os trabalhadores da clínica médica já haviam passado pelas atividades de ação educativa referente à sistematização da assistência por meio do processo de educação permanente. Pode-se depreender que tinham o conhecimento e o preparo necessário para operacionalizar e registrar as etapas do processo de enfermagem. Estudos indicam que embora a equipe de enfermagem possua conhecimento acerca do processo de enfermagem, (FREITAS, QUEIROZ, SOUZA, 2007) por meio de atividades de educação continuada, ou até mesmo durante o ensino-aprendizagem na graduação e escolas técnicas, não o utiliza

integralmente, focalizando nas etapas que podem ser integradas com a rotina do serviço. Além disso, o grupo de trabalhadores em especial o de enfermeiros mudou substancialmente em comparação ao período de 2004, indicando que a atividade de registro parece estar ligada a atitude e valores pessoais, mais do que conhecimentos propriamente ditos.

Conforme pode ser observado na tabela 1, houve aproximadamente 31 anotações relativas a coleta de dados para cada anotação de condição ou problema que requer intervenção de enfermagem. A equipe de enfermagem realiza a coleta de dados, como uma rotina, mais do que uma possibilidade de identificar informações relevantes sobre o estado de saúde do usuário, culminando com o julgamento clínico.

Houve 23,62 anotações relativas à condição ou problema que requer intervenção de enfermagem para cada prescrição. Isso denota um contexto em que as situações identificadas estão sendo resolvidas pela equipe de enfermagem, porém não ligadas a um planejamento anterior e/ou estão sendo resolvidas por prescrições de outros profissionais. Essa percepção é reforçada pelo achado de 0,006 anotações relativas ao planejamento da assistência (prescrição) para cada registro de implementação da assistência realizada. A implementação da assistência, dessa forma é realizada mais em função de rotinas e da prescrição médica, do que propriamente decisão autônoma do enfermeiro.

Foram identificadas 116,14 anotações relativas à implementação da assistência para cada registro de avaliação da assistência. Este resultado indica que os profissionais executaram as atividades incumbidas e não retornaram para avaliarem os resultados de suas ações.

Em 2004 as proporções encontradas foram respectivamente de 31,53 de anotações relativas a coleta de dados para cada anotação de condição ou problema que requer intervenção de enfermagem, 2,30 anotações relativas à condição ou problema que requer intervenção de enfermagem para cada prescrição, 0,006 anotações relativas ao planejamento da assistência (prescrição) para cada implementação da assistência realizada e 85,01 de anotações relativas à implementação da assistência para cada registro de avaliação da assistência.

O processo de enfermagem é um método de grande importância para a organização de ações da equipe de enfermagem (LONGARY, ALMEIDA, CEZARO,

2008; RAMOS, CARVALHO, CANINI, 2009), porém durante a análise dos registros deparamos com lacunas significantes, em que todas as etapas estão continuamente comprometidas. Baseado nisso surge reflexões acerca do quê dificulta sua utilização na prática.

Segundo a literatura entre os fatores que dificultam a aplicação do PE no cotidiano, estão: falta de tempo, déficit de recursos humanos, excesso de atribuições do enfermeiro, falta apoio administrativo, entre outros (TAKAHASHI, 2008).

Considerando os temas dos registros de cada uma das etapas do PE (tabela 2), as categorias de tema de registro mais contempladas foram a alimentação (8,03%) e estado de consciência (8,01%). Os registros classificados na categoria alimentação envolvem anotações sobre aceitação da dieta, administração de dieta por SNG, apetite. O estado de consciência revelou a capacidade do cliente ater-se a acontecimentos imediatos e da capacidade psíquica.

Na categoria de comunicação (7,43%) os registros encontrados reportavam a capacidade presente ou ausente de verbalização. Os registros encontrados na condição de mobilidade (7,12%) aludiam à capacidade de deambulação e de mobilidade no leito, com ou sem auxílio do uso de suportes físico ou pessoal.

A avaliação das condições de temperatura corporal (7,04) foi referenciada por meio da avaliação de temperatura corporal, se o cliente estava ou não com a temperatura alterada. Observou-se que nem sempre o profissional da saúde utilizava-se de um equipamento para mensurar a temperatura corporal do cliente.

Na categoria eliminação urinária (6,78%) foram encontrados registros sobre presença de eliminação vesical, também referenciada como “eliminações fisiológicas”; características da urina (coloração), uso de dispositivos auxiliares para eliminação urinária, tais como sondas, coletores.

Na avaliação das condições respiratórias (6,43%), os registros reportavam-se ao padrão de normalidade ou dificuldade da respiração. A avaliação do estado geral (5,64%) foi referenciada por meio da informação sobre presença de alterações do quadro de saúde do paciente e evolução do estado de saúde durante o período. Na categoria queixa: dor (5,31%) tem-se registros relacionados à presença e/ou ausência de dor.

Os 9 temas descritos anteriormente englobam 61,78% das anotações encontradas na etapa de coleta de dados, sendo importante ressaltar a freqüência

numérica dos demais temas (34), que por sua vez, englobam 38,22% das anotações. Dentre as categorias temáticas em 2004, a alimentação foi a categoria mais contemplada (14,45%), seguida de eliminação urinária (9,26%), presença/ausência de queixas (7,73%), comunicação (6,90%), condição de mobilidade (6,80%), avaliação do estado geral (6,64%), avaliação das condições respiratória (6,47%), avaliação das condições de temperatura corporal (5,64%), estado de consciência (4,98%). Estes temas englobam 68,57% das anotações encontradas na etapa de coleta de dados, sendo que a freqüência numérica dos demais temas (31) englobam 31,43% das anotações.

Tabela 2- Distribuição de temas e respectivas freqüências da etapa de coleta de dados do PE. Clínica Médica, ago-nov, 2008.

Categoria de temas da coleta	**Técnico/auxiliar de enfermagem**		**Enfermeiro**		**Total**	
	f	**%**	***F***	**%**	***f***	**%**
Alimentação	592	8,12	1	0,98	593	8,03
Estado de consciência	589	8,08	3	2,94	592	8,01
Comunicação	547	7,51	2	1,96	549	7,43
Condição de mobilidade	520	7,14	6	5,90	526	7,12
Avaliação das condições de temperatura corporal	519	7,12	1	0,98	520	7,04
Eliminação urinária	483	6,63	18	17,65	501	6,78
Avaliação das condições respiratórias	473	6,49	2	1,96	475	6,43
Avaliação do estado geral	415	5,69	2	1,96	417	5,64
Queixa: dor	388	5,32	4	3,92	392	5,31
Outros *	2.761	37,89	63	61,76	2.824	38,22
Total	7.287	100	102	100	7.389	100

*Administração de alimentação por SNE/SNG, agitação psicomotora, alergia, avaliação abdominal, avaliação da acuidade auditiva, avaliação da acuidade visual, avaliação da integridade da pele e mucosas, avaliação da massa corporal, avaliação das condições de hidratação corporal, avaliação do grau de energia física, avaliação do padrão de sono,avaliação dos parâmetros vitais/glicêmicos, eliminação intestinal, estado de contenção, estado de orientação, higiene oral, localização do paciente, medida de diurese parcial, preparo para exames,

presença de acompanhante, presença/ausência de eventos sugestivos de alteração da saúde, presença de dispositivos de apoio para eliminações urinária/intestina, queixa: anorexia, azia, calor, cansaço, dificuldade para deambular, dispnéia, diurese diminuída, dor, dormência, fraqueza, gástrica, incontinência urinária, mal estar, tontura, flatulência, câimbras, tosse, diarréia, prurido, náuseas, vômitos.realização de procedimentos por outros profissionais, registro no momento da admissão, verificação do peso/estatura

Durante o estudo observou-se que a alimentação é descrita após a cada refeição fornecida pela instituição, na qual a equipe coleta a aceitação ou rejeição parcial ou total da dieta. As demais categorias aparecem durante todo o período de internação, especialmente no início ou término dos plantões. Contudo, o conjunto das categorias estado de consciência, comunicação, condição de mobilidade, avaliação das condições de temperatura corporal, eliminação urinária, avaliação das condições respiratórias, avaliação do estado geral, queixa: dor, avaliação das condições cardiovasculares, presença/ausência de queixa, se fazem no momento da admissão e/ou evolução dos cuidados prestados pela equipe de enfermagem.

Considerando as categorias profissionais, a ênfase na temática de coleta de dados mostrou-se diferente. Enquanto que a alimentação, estado de consciência, comunicação, condição de mobilidade, avaliação das condições de temperatura corporal, eliminação urinária, avaliação das condições respiratórias perfizeram 52,09%, do total de anotações realizadas pelos técnicos/auxiliares, quando se trata do enfermeiro, a ênfase recaiu sobre eliminação urinária, presença/ausência de queixas, condição de mobilidade, queixa: dor, estado de consciência, com percentual de 45,12%. No estudo referente a 2004 a alimentação, eliminação urinária, presença/ausência de queixas, comunicação, avaliação do estado geral e avaliação das condições respiratórias, perfizeram 58,35%, do total de anotações realizadas pelos técnicos/auxiliares e os registros realizados pelo enfermeiro focalizaram o momento da admissão, condição de mobilidade, avaliação da coloração da pele e mucosas, eliminação urinária, presença/ausência de queixas e estado de consciência, com 57,11%.

Dentre as temáticas abordadas na etapa de identificação de condição ou problema que requer intervenção de enfermagem (Tabela 3), a mais freqüente foi a dor (46,03%), seguida de hipertermia (12,17%), e referiam-se a anotações de técnicos/auxiliares de enfermagem. No estudo referente ao período de 2004 essas temáticas também foram as mais prevalentes (53,12 e 20,31%, respectivamente).

A dor é considerada por alguns estudiosos, como o quinto sinal vital, e o controle é muito importante para manutenção da saúde. No estudo de Fontes e Cruz

(2007), no domínio de conforto a dor foi o diagnóstico mais freqüente (66,7%). Já a hipertermia enquadrada no domínio de segurança/proteção obteve a sétima colocação com percentual de (13,3%).

Tabela 3 - Distribuição de temas e respectivas freqüências das condições ou problemas que requer intervenção de enfermagem do PE. Clínica Médica, ago-nov, 2008.

Condições ou problemas que requerem intervenção de enfermagem	**Técnico/auxiliar de enfermagem**		**Enfermeiro**		**Total**	
	f	**%**	***f***	**%**	***f***	**%**
Dor	86	46,74	1	20,00	87	46,03
Hipertermia	23	12,50	0	0,00	23	12,17
Náusea	12	6,52	0	0,00	12	6,35
Hipertensão	8	4,35	1	20,00	9	4,76
Diarreia	8	4,35	0	0,00	8	4,23
Emese	5	2,72	0	0,00	5	2,65
Hipoglicemia	5	2,72	0	0,00	5	2,65
Outros*	37	20,10	3	60,00	40	21,16
Total	184	100	5	100	189	100

* Perda de acesso venoso periférico/central, melena, agitação, desconforto abdominal, hipotensão, hipotermia, obstrução, vias aéreas, recusa de medicação pelo paciente, sudorese/pele fria, taquicardia, alergia, ausência de ingestão hídrica, ausência de prescrição, convulsão, desobediência ao regime terapêutico, dormência, emagrecimento, fadiga, fraqueza, hiperglicemia, mal estar após medicação I obstrução SNE, presença de sangramento, risco para retirada indevida de dispositivos terapêuticos, saturação do oxigênio, taquipnéia, tonteira.

Dentre todas as anotações realizadas na etapa de condições ou problemas que requer intervenção de enfermagem, coube aos enfermeiros somente 5 registros, perfazendo aproximadamente 0,03% em relação ao total de registros encontrados nessa categoria. Já em 2004 não obtivemos registros realizados pelos enfermeiros. Possivelmente este profissional tem estado afastado da assistência, para dedicar-se as atividades administrativas. A atividade de cuidado direto por parte do enfermeiro parece ser uma lacuna, considerando-se os registros. A instituição onde foi realizada a pesquisa poderia rever sua estrutura organizacional, de modo a priorizar recursos humanos voltados para o cuidado aos usuários. Outra possibilidade é número

insuficiente de profissionais (enfermeiros, técnicos, auxiliares) para atender a demanda de usuários.

A identificação do diagnóstico de enfermagem é prerrogativa do enfermeiro, não podendo ser delegada. Este profissional, pelo menos teoricamente, apresenta possibilidade de intervir no processo saúde-doença de modo significativo, colaborando com evolução de um prognóstico positivo, além disso, o enfermeiro pode aplicar processo de enfermagem utilizando-se da sua autonomia para dinamizar e avaliar a efetividade do cuidado de enfermagem.

O registro das condições que demandavam atendimento de enfermagem não utilizou qualquer sistema de classificação ou taxonomia, emergindo no contexto da própria coleta de dados. Assim, não foi possível proceder analise da pertinência entre a coleta de dados e o diagnóstico de enfermagem.

A fase de planejamento da assistência de enfermagem é descrita na literatura como o estabelecimento de um plano de ação para o atendimento às necessidades de saúde dos usuários. Inclui a elaboração de metas, objetivos e prescrição (ALFARO-LEFEVRE 2005). Nos registros analisados (Tabela 4), constatamos que os enfermeiros se limitaram à prescrições de enfermagem para construírem o planejamento de cuidados. As temáticas presentes foram ordem relativa à coleta de material para exame (75,00%) e ao preparo do paciente para exames (25,00%).

Tabela 4 - Distribuição de temas e respectivas freqüências da Prescrição de Enfermagem do PE. Clínica Médica, ago-nov, 2008.

Temas das Prescrições de Enfermagem	**Técnico/auxiliar de enfermagem**		**Enfermeiro**		**Total**	
	f	**%**	***F***	**%**	***f***	**%**
Ordem relativa à coleta de material para exame	0	0	6	75,00	6	75,00
Ordem relativa à preparo do paciente para exames	0	0	2	25,00	2	25,00
Total	0	0	8	100	8	100

Se nos reportarmos à lista de temas identificados na tabela 3, percebe-se que as prescrições não estavam relacionadas às condições registradas que indicavam a necessidade de intervenções, ou seja, a pertinência nesse caso, entre essas etapas foi de 0%. Isto denota que as intervenções realizadas ocorreram no contexto de

atendimento à intercorrências, não sendo objeto de um plano de ação mais elaborado.

As ações prescritas pelo enfermeiro não podem ser concebidas como registros da utilização do processo de enfermagem. Em um outro estudo foi identificado a realização das prescrições de forma rotineira (LONGARY, ALMEIDA, CEZARO, 2008) contendo algo já pré-estabelecido e não cuidados específicos para o cliente, emanados de um processo de decisão e julgamento clínico.

A implementação da assistência é o momento em que a equipe de enfermagem oferece ao cliente os cuidados necessários e específicos para o atendimento de agravos instalados, prevenção de riscos e promoção da saúde. Neste contexto as intervenções e atividades de enfermagem (McCLOSKEY, BULECHEK, 2008), representam a iniciativa da própria categoria e das demais.

De acordo com os registros analisados, prevaleceram ações ou atividades determinadas por outros profissionais (Tabela 5). O montante de ações mais freqüente representa a execução de prescrições médicas, entre elas administração de medicamento via oral (14,83%), administração de medicação via endovenosa (12,36%), verificação da pressão arterial (11,24%), verificação da temperatura axilar (10,24%), verificação da freqüência de pulso (9,51%), verificação da freqüência respiratória (8,62%), preparo de solução composta endovenosa (6,77%), administração de soroterapia (4,36%), verificação de HGT (3,37%), perfazendo 81,3% do total de registros identificados.

A maioria dos registros identificados nessa etapa (99,96%) foram executados pelos técnicos/auxiliares sendo que grande parte das ações registradas não ocorreu a partir de uma prescrição de enfermagem. Por outro lado as raras prescrições realizadas pelo enfermeiro foram acompanhadas de implementação pertinente em 100% das vezes.

Embora seja a categoria que mais registrada, a enfermagem ainda não tem conseguido dar visibilidade à todo o seu agir (MATSUDA, *et al.* 2006). Pode-se dizer que, as anotações no prontuário não refletem a atuação do enfermeiro e das demais categorias de enfermagem, que executam muito mais ações do que aquelas que estão registradas.

Tabela 5 - Distribuição de temas e respectivas freqüências da Implementação da Assistência do PE. Clínica Médica, ago-nov, 2008.

Temas das Intervenções de Enfermagem	Técnico/auxiliar de enfermagem		Enfermeiro		Total	
	f	%	*f*	%	*F*	%
Administração de medicação via VO	2050	14,84	0	0	2050	14,83
Administração de medicação via EV	1708	12,36	0	0	1708	12,36
Verificação PA	1553	11,24	0	0	1553	11,24
Verificação T	1415	10,24	0	0	1415	10,24
Pulso	1314	9,51	0	0	1314	9,51
Respiração	1192	8,63	0	0	1192	8,62
Preparo de solução composta EV	935	6,77	0	0	935	6,77
Soroterapia	602	4,36	0	0	602	4,36
Verificação HGT	466	3,37	0	0	466	3,37
Administração de aerossolterapia	365	2,64	0	0	365	2,64
Administração de medicação via SC	356	2,58	0	0	356	2,58
Registro de não administração de medicação e justificativa	340	2,46	0	0	340	2,46
Avaliação da necessidade de administração de medicação SOS	260	1,88	0	0	260	1,88
Medida de diurese parcial para controle de 24h	206	1,50	0	0	206	1,49
Registro de não administração de medicação	185	1,34	0	0	185	1,34
Outros	868	6,28	6	100	874	6,32
Total	13815	100	6	100	13821	100

Em nossa atuação como acadêmica no cenário estudado podemos observar freqüentemente o enfermeiro prestando cuidados, sem que os mesmos fossem posteriormente registrados. Presenciamos o enfermeiro realizando orientações ou instruções sobre o cuidado a pacientes, sem o devido registro na forma de prescrição.

Quanto a etapa de avaliação, de acordo com o que se pode observar na tabela 6, as temáticas mais presentes foram: resposta à intervenção de oferecimento de

alimentação (67,37%) e resposta à intervenção para dor (11,58%). Por estas duas categorias de registros depreende-se que há situações em que os pacientes precisam ser estimulados ou ajudados para se alimentar. Estas situações não foram descritas nos registros de condições que requerem intervenção de enfermagem. A abordagem da aceitação da alimentação apresenta com elevado índice percentual, contudo a avaliação dessa intervenção não decorre de uma ação previamente planejada e sim ações rotineiras.

O mesmo não ocorreu em relação à dor e hipertermia, que são condições registradas que denotam necessidade de intervenção de enfermagem, para as quais se anotam as avaliações, embora com freqüência bem menor.

Tabela 6 - Distribuição de temas e respectivas freqüências da Avaliação da Assistência do PE.Clínica Médica, ago-nov, 2008.

Temas das Prescrições de Enfermagem	**Técnico/auxiliar de enfermagem**		**Enfermeiro**		**Total**	
	f	**%**	***f***	**%**	***F***	**%**
Resposta à intervenção de oferecimento de alimentação	88	76,52	0	0	88	73,95
Resposta à intervenção para dor	10	8,70	0	0	10	8,40
Resposta à intervenção para hipertermia	6	5,22	0	0	6	5,04
Outros*	11	9,57	4	100	15	12,61
Total	115	100	4	100	119	100

* Resposta à intervenção para dispnéia: oxigenoterapia, resposta à intervenção de instalação de dispositivos terapêuticos, resposta à avaliação para deambulação, resposta à intervenção para hipoglicemia: medicação, resposta à intervenção para hipertermia: medicação, resposta à intervenção para náuseas, resposta à intervenção ao serviço de nutrição: solicitação de dieta, resposta à diálise peritoneal.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados, podemos concluir que no ano de 2008 as anotações de enfermagem nos prontuários da Clínica Médica no hospital estudado denotam a não utilização do Processo de Enfermagem, de modo semelhante ao que foi verificado em relação ao ano de 2004. Prevalece a coleta de dados e a implementação da assistência. Os temas revelados na coleta de dados mostram o

enfoque pautado nas atividades de vida diária: alimentação, movimentação, higiene, eliminação urinária e intestinal; e as funções vitais básicas: respiração e temperatura corporal. Os temas identificados na implementação revelam que o atendimento de enfermagem foi direcionado quase que exclusivamente pela equipe médica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido ao limite de páginas desse relatório, privilegiou-se a apresentação detalhada dos dados relativos ao ano de 2008 e comparação com os resultados obtidos em relação ao período de 2004. Para publicação dos resultados serão apresentados os dados referentes aos anos de 2004, 2006 e 2008, atendendo ao previsto nos objetivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFARO-LEFEVRE, R. **Aplicação do Processo de Enfermagem**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

COFEN**.** Resolução 272/2002. Dispõe sobre a Sistematização da Assistência de Enfermagem - SAE - nas Instituições de Saúde Brasileiras. Disponível em <http://www.portalcofen.com.br/_novoportal/section_int.asp?InfoID=1114&EditionSectionID=15&SectionParentID=> Acesso em: 19 mar. 2007.

FONTES, C. M. B.; CRUZ, D. A. L. M. Diagnósticos de enfermagem documentados para pacientes de clínica médica. **Rev. esc. Enf. USP**, v.41, n.3, p.395-402. 2007.

FREITAS, M. C.; QUEIROZ, T. A.; SOUZA, J. A. V. O Processo de Enfermagem sob a ótica das enfermeiras de uma maternidade. **Rev. Bras. Enferm**, v.60, n.2 p. 207-12, 2007.

LEE, T. T.; CHANG, P. C. Standardized care plans: experiences of nurses in Taiwan. **J Clin Nurs**, v. 13, n. 1, p. 33-40, 2004.

LONGARY, V. K.; ALMEIDA, M. A.; CEZARO, P.. Processo de Enfermagem: Reflexões de Auxiliares e Técnicos. **Texto Contexto Enferm**, Florianópolis, v. 17, n. 01, p. 150-7, 2008.

MATSUDA, L. M., et. al Anotações/Registros de Enfermagem: Instrumento de Comunicação e Qualidade do Cuidado? **Rev Eletr. de Enf**, v.8, n.3, p.415-21, 2006.

McCLOSKEY, J.C.; BULECHEK, G. **Classificação das Intervenções de Enfermagem** (NIC). Porto Alegre: ARTMED, 2008.

OPAS/OMS – **Building Standard-Based Nursing Information Sistems**. Washington: PAHO. 2001.

TAKAHASHI, A. A., *et al*. Dificuldades e facilidades apontadas por enfermeiras de um hospital de ensino na execução do processo de enfermagem. **Acta paul. enferm**., v.21, n.1, p.32-38, 2008.

GUEDES, H. M., et al. Identificação de diagnósticos de enfermagem do domínio segurança/proteção em idosos admitidos no sistema hospitalar. **Rev. Eletr. Enferm**, v. 11, n2, p.249-56, 2009.

RAMOS, L.A.R; CARVALHO, E.C.; CANINI, S.R.M.S. Opinião de auxiliares e técnicos de enfermagem sobre a sistematização da assistência de enfermagem. **Rev. Eletr. Enferm**, v.11, n.1, p.39-44, 2009.

SANTOS, A. S. R. et al. Caracterização dos diagnósticos de enfermagem identificados em prontuários de idosos: um estudo retrospectivo. **Texto contexto - enferm.** v.17, n.1, pp. 141-49, 2008.

AMANTE, L. N; ROSSETTO, A. P; SCHNEIDER, D. G. Sistematização da Assistência de Enfermagem em Unidade de Terapia Intensiva sustentada pela Teoria de Wanda Horta. **Rev. esc. Enf. USP**, v.43, n.1, pp. 54-64. 2009.

SILVA, G. M; SEIFFERT, O. M. Educação continuada em enfermagem: uma proposta metodológica. **Rev. bras. Enferm***,* v.62, n.3, pp. 362-66. 2009.

PELLISON, F., et al. Aplicação prática do processo de enfermagem a uma adolescente portadora de doença crônica. **Rev. esc. Enf. USP**, p. 513 -17, 2006.

VARGAS, R. S.; FRANÇA, F. C. V. Processo de Enfermagem aplicado a um portador de Cirrose hepática utilizando as terminologias padronizadas NANDA, NIC e NOC. **Rev. Bras. Enferm.**, p. 348-52, Brasília, mai-jun, 2007.

MULLER-STAUB, M., et al. Improved Quality of Nursing Documentation: Results of a Nursing Diagnoses, Interventions, and Outcomes Implementation Study. **International Journal of Nursing Terminologies and Classifications**. v. 18, p. 5-17, 2007.

Formação do Psicólogo: a produção em dissertações e teses no campo da Psicologia e da Educação

Kelly Coelho Costa, Dr.Anita Cristina Azevedo Resende
Faculdade de Educação/UFG
e-mail: kellynhageminha@hotmail.com,azzeres@uol.com

Palavras chaves: Formação, dissertações/teses e Educação/Psicologia.

Introdução

O sub-projeto Formação do Psicólogo: A produção em dissertações e teses no campo da Psicologia e Educação pretende investigar a Formação do Psicólogo tomada como emblema dos processos formativos que ocorre atualmente e a questão das crenças que estão relacionadas com essa formação teórica e profissional. Buscando entender como os alunos de psicologia estão sendo formados para a atuação na sociedade. Está vinculado ao projeto Razão e Des-razão: suas contrafaces no psicólogo em formação" e é desenvolvido no Núcleo de Estudos e Pesquisas em Psicologia, Educação e Cultura – NEPPEC (FE-UFG), sob a coordenação da Profa. Anita Cristina Azevedo Resende. Esse projeto surgiu através de pesquisas anteriores (Resende, 1994) e da criação do Curso de Graduação em Psicologia na Faculdade de Educação na Universidade Federal de Goiás em 2006. O projeto originário propõe:

> investigar quais são e como se articulam os processos subjetivos que permitem aos alunos do Curso de Psicologia vincular ciência, religião e crenças à sua formação teórica e profissional; as concepções e argumentos que eles manejam para justificar (ou não) essa vinculação; e a relação entre adesão às praticas irracionalistas e as características da personalidade autoritária. (RESENDE, 2006).

Assim, o presente sub-projeto se inscreve no conjunto de investigações que subsidiam a pesquisa de investigação do psicólogo,

> uma maneira de enfrentar a adesão ao irracionalismo e os desafios da formação é compreender os processos pelos quais essa adesão vai se efetivando nos processos de socialização (ADORNO, 1986) e quanto a

> formação em psicologia oferece um anteparo a essas demandas subjetivas. Para tanto, é necessário agüir como, no mundo contemporâneo vão sendo forjadas as condições de adesão a essas explicações irracionalistas. Com base em uma fundamentação orientada pela psicanálise e pela teoria critica da Escola de Frankfurt (JAY, 1986), partindo da hipótese de que o estudo dos processos subjetivos pelos quais os alunos de Psicologia tendem a vincular ciência, religião e misticismo permitirá evidenciar mediações psico-sociais que indicam derivações e resoluções psíquicas marcadamente narcisistas e imediatistas. Essa estrutura subjetiva é solidária e contemporânea de um certo tipo de instrumentalização da racionalidade, havendo, portanto uma relação entre racionalidade instrumental, narcisismo e adesão a práticas irracionalistas e autoritárias (RESENDE, 2008).

De acordo com Adorno “A exigência que Auschwitz não se repita é a primeira de todas para a educação”.Na qual essa educação seja orientada para uma auto-relfexão critica, sendo necessário o poder da automonia e autodeterminação e é fundamental que a reflexão esteja clara em sua finalidade humana. Educação deve contribuir para o desenvolvimento da formação e emancipação, contribuindo para criar condições em que os indivíduos, socialmente, conquistem a autonomia, através do processo coletivo, pois dificilmente poderá ser realizada isoladamente. A educação deve, simultaneamente, evitar a barbárie e buscar a emancipação humana. Para Adorno a barbárie se revela como:

> *“Suspeito que a barbárie existe em toda a parte em que há uma regressão à violência física primitiva, sem que haja uma vinculação transparente com objetivos racionais na sociedade, onde exista portanto a identificação com a erupção da violência física. Por outro lado, em circunstâncias em que a violência conduz inclusive a situações bem constrangedoras em contextos transparentes para a geração de condições humanas mais dignas, a violência não pode sem mais nem menos ser condenada como barbárie” (ADORNO, 1995, p. 159-160).*

Adorno aponta duas questões importantes em relação a “Educação após Auschwitz", a primeira é a educação na primeira infância e a segunda é o processo de esclarecimento da população que constrói um clima intelectual, cultural e social, para que não se repita o mesmo. A razão e o esclarecimento aparecem como possíveis mediadores na relação entre indivíduo e sociedade, proporcionando a manutenção do atendimento à condição humana. “Quanto ao *programa de esclarecimento*, Adorno e Horkheimer afirmam que a sua principal meta era a dissolução dos mitos, a substituição da imaginação pelo saber" (Lastória, 2001 p.64). Desta forma uma educação formativa é concebida sendo, algo importante e um compromisso político.

Objetivo

Trata-se de uma pesquisa bibliográfica que pretende mapear as dissertações e teses produzidas nos últimos 5 anos (2003 a 2007) nos Programas de Pós – Graduação*(stricto sensu)* em Psicologia e em Educação no Brasil, que tratam da formação do psicólogo e analisar como essa temática tem sido discutida no campo.

Metodologia

Foi realizado um mapeando no portal da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/MEC) e identificadas as universidades que oferecem Pós – Graduação na área de Psicologia e Educação (mestrado e doutorado), com avaliação igual ou acima de 4. Foram totalizadas 33 universidades na área de Psicologia e 63 na área de Educação. Em seguida através do portal da CAPES, obteve-se a "Planilha Trienal 2007", constando 31 universidades na área de Psicologia e 66 na área de Educação que correspondiam aos critérios estabelecidos. Foi feita a comparação entre as duas bases de informação, do que resultou o total de 32 universidades com pós-graduação (mestrado e doutorado) na área de Educação e 20 universidades (mestrado e doutorado) na área de Psicologia. Eliminados os Programas de Pós-Graduação que não disponibilizam, no *site* da CAPES ou em seus próprios *sites,* o número de dissertações e teses defendidas, definiu-se 23 universidades na área da Educação com 9878 resumos e 19 na área de Psicologia com 2907 resumos.

Tabela: Número de resumos de dissertações e teses de Programas de Pós-graduação em Educação por regiões

Região	Resumos dissertações	Resumos teses	Total
Centro Oeste	529	98	627
Sudeste	3626	1659	5285
Nordeste	1298	419	1717
Sul	1811	438	2249
Total	7264	2614	**9878**

Fonte: Portal CAPES (www.capes.gov.br)

Tabela: Número de resumos de dissertações e teses de Progrma de Pós-graduação em Psicologia por regiões

Região	Resumosdissertação	Resumos tese	Total
Norte	40	6	46
Centro Oeste	128	39	167
Nordeste	144	38	182
Sudeste	1630	882	2512
Total	1942	965	**2907**
Fonte: portal da CAPES (www.capes.gov.br)			

Esse levantamento inicial exigiu definir critérios de seleção com base na região e no quantitativo da produção. Assim foram selecionados, por região, os Programas com menor e maior quantidade de resumos de teses e dissertações disponibilizadas:

Tabela: Programas de pós-graduação em Educação por região com as universidades que possuem maior e menor produtividade de dissertações e teses

		Resumos				
		Número de dissertações		Número de dissertações		Total
Região	Universidade	Maior	Menor	Maior	Menor	
Centro Oeste	UNB	363		72		435
	UFG		166		26	192
Noredeste	UFPE	404		63		467
	UFB/J.P		234		25	259
Sudeste	USP	830		566		1396
	UFES		176		3	179
Sul	UFRGS	424		226		650
	UNISINOS		144		28	172
						3750

Fonte: portal CAPES (www.capes.gov.br)

Tabela: Programas de pós-graduação em Educação por região com as universidades que possuem maior e menor produtividade de dissertações e teses

		Resumos				
		Número de dissertações		Número de dissertações		Total
Região	Universidade	Maior	Menor	Maior	Menor	
Centro Oeste	UNB	128		39		167
Noredeste	UFPE	47		6		53
	UFB/J.P		44		6	50
Sudeste	UFRJ	93		49		142
	UFES		42		7	49
	USF		47		2	49
Sul	UFRGS	124		55		179
	UFSC		136		14	150
Norte	UFPA	40		6		46
Total						**885**

Fonte: portal CAPES (www.capes.gov.br)

Posteriormente, frente ao universo dos resumos, foram selecionadas as universidades que maior e menor produção e com avaliação CAPES-5, o que permitiu determinar o total de 6 universidades na área de Educação, com 2970 resumos de teses e dissertações; e 8 universidades na área de Psicologia, com 1989 resumos de teses e dissertações.

Tabela: Programa de pós-graduação em Educação por região com as universidades que possuem maior e menor produtividade de dissertações e teses e avaliação CAPES 5

		Resumos				
		Número de dissertações		Número de dissertações		Total
Região	Universidade	Maior	Menor	Maior	Menor	
Centro Oeste	UFG	166		26		192
Noredeste	UFRN	227		122		349
Sudeste	USP	830		566		1396
	UFU		206		5	211
Sul	UFRGS	424		226		650
	UNISINOS		144		28	172
						2970

Fonte: portal CAPES (www.capes.gov.br)

Tabela: Programa de pós-graduação em Psicologia por região com as universidades que possuem maior e menor produtividade de dissertações e teses e avaliação CAPES 5

		Resumos				
		Número de dissertações		Número de dissertações		Total
Região	Universidade	Maior	Menor	Maior	Menor	
Centro Oeste	UNB	128		39		167
Noredeste	UFPE	47		20		67
	UFB/J.P	44		6		50
Sudeste	USP	779		499		1278
	UFES		42		7	49
	USF		47		2	49
Sul	UFRGS	124		55		179
	UFSC		136		14	150
						1989

Fonte: portal CAPES (www.capes.gov.br)

Todos os 4959 foram lidos e selecionados aqueles trabalhos que se referiam à temática da formação de psicólogos: 15 dissertações/teses da área de Psicologia e 1 tese da área de Educação. Esses trabalhos são analisados a partir de uma planilha de identificação que compreende enfoque teórico, metodologia utilizada,

concepção de formação, de psicologia, de profissionalização, concepção de curso, enfoque disciplinar, objetivo do artigo entre outros. (Em anexo)

Resultados

A fase de sistematização e análise do material selecionado a partir da planilha encontra-se em desenvolvimento e já é possível apontar algumas tendências tais como: a pouco significativa repercussão da temática da formação no campo da produção nos programas de pós-graduação em psicologia e educação, a concentração da produção na região sudeste do país e em universidades específicas, a tendência de tomar a formação do psicólogo enquanto profissionalização e preparação para o atendimento às demandas e exigências do mercado de trabalho e, ainda, uma tendência de resolver a questão da relação entre teoria e prática no privilegiamento da prática, especialmente a clínica. O desenvolvimento da pesquisa permitirá esclarecer as mediações que constituem essas tendências e apontar outras que estejam em causa.

Referências Bibliográficas

ADORNO, Theodor. Educação e emancipação. Rio de Janeiro: Paz e Terra, 1995.

LASTÓRIA, Luiz A. Calmon Nabuco Ethos sem ética: a perspectiva crítica de T. W. Adorno e M. Horkheimer. *Educação e Sociedade*, v.22, n 76, p. 63-75, out., 2001.

RESENDE, Anita. *Razão e Des-razão*: suas contrafaces no psicólogo em formação. Faculdade de Educação, Universidade Federal de Goiás , 2006 (Projeto de pesquisa)

RESENDE, Anita. *Formação do Psicólogo: a produção em dissertações e teses no campo da Psicologia e da Educação.* Faculdade de Educação, Universidade Federal de Goiás , 2008 (Plano de trabalho).

Anexo

PESQUISA: RAZÃO E DESRAZÃO

Planilha de análise e documentação dos artigos publicados em revistas e periódicos

Responsável pela planilha: _____

1. Dados de identificação do artigo:

Autor: _____ Instituição: _____

Título: _____

Periódico: _____ Vol: _____ Data: _____ Pags: _____

Palavras Chave: _____

2. Dados de Coleta e análise:

1.. Objetivo do artigo:
( )Abordar as implicações pedagógicas/educacionais da formação no trabalho do psicólogo
( )Abordar as implicações pedagógicas/educacionais nos/de cursos de graduação
( )Abordar as implicações teóricas de temática.
( )Propor uma nova prática pedagógica
( )Problematizar e criticar as implicações teóricas e/ou pedagógicas de abordagens na psicologia.
( )Relatar uma experiência pedagógica/pesquisa
( )Outros:

1.2. **Definição dos objetivos: (Referências do texto)**

2. Procedimento metodológico explicitado pelo autor
( ) Entrevista
( ) Estudo de caso

( )Observação
( )Pesquisa Teórica
( )Qualitativo
( )Quantitativo
( )Questionário
( ) Outros

( ) Não está claramente explicitado mas pode ser identificado.

3. Enfoque disciplinar predominante explicitado pelo autor
( ) Educação
( )Filosofia
( )História
( )Psicologia
( )Sociologia
( )Não é possível Identificar
( ) Não está explicitado mas é possível identificar. Qual:_____
( ) Outros: (Quais)

4. Enfoque teórico explicitado pelo autor
( ) Construcionismo
( ) Construtivismo
( ) Dialética
( ) Experimental/Cognitivo
( ) Histórico social
( ) Humanismo/Existencialismo
( ) Psicanálise
( ) Representações Sociais
( ) Não é possível Identificar
( ) Não está explicitado mas é possível identificar.
( ) Outros: (Quais)

4.1 Autores de base explicitados pelo autor.
( ) Não é possível identificar
( ) Identificados Quais:

4.2 Autores mais citados

5.O conceito de formação explicitado pelo autor.

( )está claramente explicitado
( )não está claramente explicitado mas pode ser identificado
( )não pode ser identificado

5.1 A vinculação do conceito de formação com profissionalização **explicitado pelo autor**

( )está claramente explicitado
( )não está claramente explicitado mas pode ser identificado
( )não pode ser identificado

5.2 Conceito de Formação: (Referências do texto)

5.3 A vinculação com a formação de psicólogo

( ) está claramente explicitado
( )não está claramente explicitado mas pode ser identificado
( )não pode ser identificado

Outra resposta: (Qual)

5.4Especificidade da formação de psicólogos: (Referências do texto)

6. **Com relação à concepção de curso de psicologia, o posicionamento do autor:**

( ) está claramente explicitado
( )não está claramente explicitado mas pode ser identificado
( ) não pode ser identificado

6.1 Concepção de curso (Referencias do texto)

6.2Com relação à concepção de mercado de trabalho, o posicionamento do autor:

6.3 Referencias conceituais ao mercado de trabalho: (Referências do texto)

7. Outros:

PURIFICAÇÃO DE FENOLOXIDASES PROVENIENTES DE GUARIROBA (Syagrus oleracea).

Pedro Henrique Ferreira Procópio, Ivan Torres Nicolau de Campos
Instituto de Ciências Biológicas – UFG
Email: ivan@icb.ufg.br

Palavras-chave: purificação, lacase, polifenoloxidase

INTRODUÇÃO

Biotecnologia tem sido definida como aplicação de princípios científicos ao processamento de materiais por agentes biológicos. As enzimas são os instrumentos mais freqüentemente usados para o aprimoramento de processos industriais, permitindo o uso de novos materiais através da melhora de suas propriedades físicas e químicas. Uma das vertentes na área de biotecnologia é o desenvolvimento de biossensores, acoplando a eletrônica às moléculas orgânicas como enzimas, esperando-se obter sensores com alta sensibilidade, seletividade e atividade catalítica, bem como alta estabilidade mecânica, térmica e química o que possibilita que os mesmos possam ser reutilizados em sucessivas operações (NEW 2000, SACHER 2001, BEAUSSE 2004, ANDREU 2004). Dentre os biossensores em grande destaque na literatura estão aqueles que contêm lacases (fenoloxidases), que apresentam grande potencial de utilização em monitoramento de processos industriais e ambientais (DURAN 2002, BEAUSSE 2004). Os principais entraves no desenvolvimento de biossensores são a desnaturação, a estabilidade e o acoplamento eletrônico ineficiente entre enzima e eletrodo. Na literatura, os caminhos trilhados para contornar tais obstáculos são as modificações e otimização no processo de imobilização enzimática, e a utilização e caracterização de enzimas de diferentes fontes, em especial as provenientes de fungos. No presente projeto pretendemos aproveitar a biodiversidade exclusiva do Cerrado para isolar e caracterizar fenoloxidases de origem vegetal e assim subsidiar o estudo e desenvolvimento de biossensores.

OBJETIVO E METAS

Purificar lacases provenientes de guariroba (*Syagrus oleracea*).

Para tal algumas metas deverão ser alcançadas:

1. Obtenção dos espécimes.
2. Avaliação preliminar das atividades enzimáticas.
3. Extração e purificação das enzimas de interesse.
4. Caracterização e estudo das atividades enzimáticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material – Para a purificação de fenoloxidases utilizou-se o broto terminal de guariroba (*Syagrus oleracea*). Para tal, parte do tronco da árvore foi obtida em feiras de comércio popular. O broto terminal foi isolado, retirando-se as partes folhosas e as cascas mais externas. O material foi homogenizado em uma proporção 1:10 (P/V) em liquidificador com os tampões abaixo relacionados:

Fosfato de Sódio 50 mM pH 4,0 – 7,5

Tris-HCl 50 mM pH 8,0 – 9,0

Fosfato-Citrato 50mM pH 3,5 - 6,5

Alternativamente foi realizada a maceração manual do material com pistilo e almofariz.

Teste de estabilidade enzimática à estocagem – Após o preparo do homogenato, o mesmo foi centrifugado a aproximadamente ~11000 g por 10 minutos. O material precipitado foi descartado e o sobrenadante foi fracionado em alíquotas. As

alíquotas foram estocadas a – 20°C, 4°C e temperatura ambiente. Uma alíquota de cada temperatura foi dosada com relação à atividade de polifenoloxidase a cada 24 hs. Este experimento foi realizado com homogenatos de 3 partidas diferentes.

Atividade das enzimas – A atividade de lacase foi determinada pela oxidação do catecol a 420 nm, durante 10 min. A reação enzimática foi realizada adicionando-se 20 uL do material a 580 uL de catecol 46 mM em tampão Mellvaine´s (ácido cítrico 50 mM – fosfato de sódio 100mM pH 6.5). A solução foi prontamente misturada com o auxílio de uma pipeta e a absorbância em 420 nm foi medida a cada 30 s (CARNEIRO 2004). Alternativamente utilizou-se hidroquinona como substrato.

Purificação da lacase – Para a purificação da lacase, foi utilizada uma cromatografia de troca iônica em coluna Hitrap SP 5ml (GE Healthcare). Para tal, o material foi previamente centrifugado a aproximadamente 11000 g por 10 minutos, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi recentrifugado nas mesmas condições e o sobrenadante foi utilizado para a cromatografia. A coluna foi previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,5 e o material filtrado em filtro com poros de 25 micra. A cada cromatografia, foi aplicado 5 ml do material. Após a aplicação do material, a coluna foi lavada com 25 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,5 e alíquotas de 5 ml foram recolhidas. Em seguida a coluna foi eluída com 15 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,5 acrescido de 150 mM de NaCl e foram coletadas alíquotas de 3 ml. O material ligado à coluna foi ainda eluído seqüencialmente com os tampões fosfato de sódio 50 mM pH 5,5, fosfato de sódio 50 mM pH 5,5 + 300mM NaCl, fosfato de sódio 50 mM pH 5,5 + 600 mM NaCl e fosfato de sódio 50 mM pH 5,5 + 1 M NaCl, mantendo se os

mesmos volume e tamanho de fração descritos para o tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,5. A contendo 150 mM NaCl. A cromatografia foi realizada manualmente com o auxílio de uma seringa, tentando-se manter um fluxo não maior que 3 ml por minuto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A guariroba, palmeira típica do cerrado, possui em se interior um palmito amargo que é muito apreciado na culinária típica do Centro-Oeste. Uma das características da guariroba é que a mesma, quando cortada para a exposição do palmito apresenta um rápido escurecimento da parte comestível. Dentre os compostos que causam o escurecimento estão as enzimas peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PPO) (VIGYÁZO-VÁMOS 1981; ARSLAN 1997) e a presença de compostos fenólicos, que são, ao mesmo tempo, substratos dessas enzimas e responsáveis pelo sabor adstringente e amargo característico da guariroba (SHIMOKOMAKI 1975; UZELAC 1976). Desta forma, e baseado na literatura e conhecimentos disponíveis, decidimos utilizar a mesma como fonte para a obtenção de polifenoloxidases.

Nas primeiras preparações, notou-se que o homogenato apresentava um rápido escurecimento e tal característica estava correlacionada com a quantidade de atividade enzimática medida. Desta forma, os extratos que apresentavam maior atividade de polifenoloxidase, apresentavam também um rápido escurecimento. Uma característica observada foi que materiais originários de plantas de tamanhos diferentes não apresentavam correlação com a atividade enzimática. Um fator que nos chamou atenção foi que as amostras com maior quantidade de polifenoloxidase também apresentavam uma rápida perda de atividade (diminuição de 30 a 40 % de

atividade após 3 horas). Em função dessa observação, passamos a explorar diversos tampões e concentrações de NaCl bem como diferentes pHs para o preparo do homogenato no intuito de minimizar a perda de atividade. Inicialmente a extração foi realizada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 contendo NaCl 150 mM (tampão padrão) e posteriormente o pH bem como o composto tamponante foram alterados.

A extração com pHs mais elevados com Tris ou fosfato como substância tamponante apresentou uma maior perda de atividade quando comparada com o tampão padrão. A acidificação do tampão fosfato apresentou uma melhor manutenção da atividade em comparação com o tampão padrão, mantendo-se maior atividade em pH 5,5. Posteriormente, utilizou-se o tampão fosfato-ácido cítrico em pH 5 e este apresentou a melhor manutenção de atividade.

A alteração das concentrações das soluções-tampão não apresentou efeito na manutenção da atividade. A concentração de 50 mM para o tampão fosfato bem como fosfato-citrato foi suficientemente alta para evitar uma alteração significativa durante o preparo do homogenato, e foi significantemente baixa para não interferir no pH das dosagens enzimáticas. Apesar da diminuição na perda da atividade enzimática a mesma foi apenas minimizada, sendo portanto significativa quando levada em conta períodos de tempo maiores, e o material apresentava perda total de atividade após 48 horas. Testes de estabilidade mostraram que o congelamento causa a perda de quase a totalidade da atividade enzimática, independente do tempo que o material permaneceu congelado. A manutenção do material a 4^{o}C reduziu a perda de atividade, apesar da atividade ser completamente abolida após um ou dois dias.

Um aspecto que proporcionou uma melhora na manutenção da atividade inicial foi a maceração do caule com pistilo e almofariz, mas no entanto, tal homogenização é lenta e difícil em função da textura do material. Assim, a melhor alternativa obtida para a homogenização foi o preparo do extrato no liquidificador utilizando-se a menor velocidade e tempo possível para homogenização utilizando-se um grande volume de amostra a fim de minimizar a dissolução de oxigênio na preparação.

Neste ponto, hipotetizamos que parte da perda da atividade enzimática está correlacionada com a atividade de polifenoloxidase nos substratos fenólicos presentes na planta. Assim, foram realizadas preparações contendo PVP (polivinilpirrulidona), um quelante de compostos fenólicos. No entanto, o PVP presente na praparação interferiu nas dosagens subseqüentes. Assim, preparamos como estratégia a produção de homogenato, seguida de uma rápida retirada de segmentos e filtração para aplicação em uma coluna de troca iônica. A estratégia consistia em imobilizar a enzima na resina e através da lavagem da mesma retirar os compostos fenólicos bem como parte dos demais contaminantes. Para a cromatografia, utilizamos uma coluna Hitrap SP cujo pH de trabalho é compatível com o pH de estabilidade do material. Como resultado, não foi observada atividade enzimática no material não retido na resina, bem como nas frações eluídas. Assim, propomos que o material fica retido na resina, mas é eluído com concentrações de sal na qual o material perde sua atividade enzimática. Como perspectiva para a resolução de tal problema temos a utilização de precipitação cetônica fracionada como primeiro passo de purificação a fim de eliminar os compostos fenólicos ou mesmo realizar uma diálise logo após o preparo do homogenato com a presença de

PVP, o que será realizado por outra estudante que está iniciando como iniciação científica voluntária.

REFERÊNCIAS

ANDREU, V.; PICO, Y., Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods, TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 23 (10-11), p. 772-789, 2004.

ARSLAN, O.; TEMUR, A.; TOZLU, I., Polyphenol-Oxidase from Allium sp. J. Agric. Food Chem., Washington, DC, v. 45, n. 8, p. 2861-2863, 1997.

BEAUSSE, J., Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances, Trends Anal. Chem., v. 23(10-11), p. 753-61, 2004

Caramori, S.S.; Lima, C.S.; Fernandes, K.F., Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian Savannas, Braz. Arch. Biol. Technol., v. 47 (2), p. 253-259, 2004.

DURAN, N.; ROSA, M.A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L., Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review, Enz. Microb. Tech., v. 31, p. 907-31, 2002.

NEW, A.P.; DOS SANTOS, L.M.F.; LO BIUNDO, G.; SPICQ, A., Analytical techniques used for monitoring the biodegradation of fluorinated compounds in waste streams from pharmaceutical production, J. Chromatog. A. v. 889, p. 177-84, 2000.

SACHER, F.; LANGE, F.T.; BRAUCH, H.J.; BLANKENHORN, I., Pharmaceuticals in groundwaters analytical methods and results of monitoring program in Baden-Württemberg, Germany, J. Chromat. A, v. 938, p. 199-210, 2001.

SHIMOKOMAKI, M.; ABDALA, C. ; FRANCO, J. F. ; DRAETTA, I. S. ; FIGUEIREDO, I. B. ; ANGELUCCI, E., Estudo comparativo entre os palmitos de sabor doce (palmito-juçara - Euterpe edulis Mart. e açaí - Euterpe oleracea Mart.) e de Sabor

Amargo (guariroba - Syagrus oleracea Becc.). 1 Composição química, péptides e aminoácidos livres. Coletânea do Ital., Campinas, v. 6, p. 69-80, 1975.

UZELAC, M.; ABDALA, C.; FRANCO J.F., Estudos Comparativos entre os palmitos de sabor doce (palmito-juçara - Euterpe edulis Mart. e açaí - Euterpe oleracea Mart.) e de sabor amargo (guariroba - Syagrus oleracea Becc.). 2 Compostos fenólicos. Coletânea do Ital., Campinas, v. 7, p. 371-382, 1976.

VIGYÁZO-VÁMOS, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., Boca Raton, v. 20, p. 49-127, 1981.

Análise Estrutural de derivados de Tiouréais bioativas

Rosane de Paula Castro, Carlito Lariucci

Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, 74.001-970, Brasil

Email: rosane.fisica@gmail.com, lariucci@if.ufg.br

Palavras-chave: difração de raios X, compostos orgânicos, tiouréia

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais obtidos de plantas de interesse na medicina popular têm despertado a atenção de pesquisadores na tentativa de isolar substâncias bioativas, ou que sirvam de modelo para a síntese de derivados com ação biológica elevada, definida e apresentando toxidade reduzida.

O Brasil possui uma grande diversidade vegetal. O cerrado possui flora muito rica e pouco estudada. Um estudo dos produtos naturais envolve colaboração entre diversos grupos de pesquisa com competências diferentes nas diversas áreas do conhecimento. A ênfase é o estudo de substâncias com propriedades antiinflamatórias, anticonvulsivante, antibacteriana, entre outras.

Nos últimos anos, tem-se observado o interesse no estudo das tiouréias e seus derivados. Isto se deve ao fato de que estes compostos apresentam potencial para numerosas aplicações químicas e farmacêuticas. Algumas tiouréias apresentam potencial para atuar no combate a um número considerável de doenças inflamatórias ou cardiovasculares. A atividade antimicrobiana tem atraído a atenção, devido a resistência desenvolvida por importantes agentes patogênicos ter aumentado nas últimas décadas e este é reconhecido como um sério problema de saúde pública.

A doença de Chagas, a malária e a Leishmaniose são as maiores doenças parasitárias nos países em desenvolvimento. A primeira é a causa de um número considerável de mortes na América Latina. Pelo menos 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas com o Trypanosoma Cruzi, parasita causador da doença de Chagas, resultando em mais de 50.000 mortes a cada ano[8]. Esta doença é transmitida ao ser humano através da corrente sanguínea pela picada de barbeiro e introdução do protozoário parasita T. Cruzi. Verifica-se que algumas

tiouréias exibem potencial atividade no combate ao Trypanosoma Cruzi. A natureza não peptídica destes compostos, adicionado ao seu baixo custo de síntese, faz desta classe de inibidores covalentes, candidatos promissores para o desenvolvimento de novas drogas eficazes no combate a doença de Chagas.

Tiouréias são compostos orgânicos que apresentam em sua constituição o grupamento uréia, em que o átomo de oxigênio é substituído por um átomo de enxofre. A Figura 1 ilustra o grupamento uréia e a correspondente tiouréia derivada. Observa-se que os átomos de nitrogênio presentes no grupamento tiouréia são capazes de formar ligações de hidrogênio inter-moleculares do tipo N - H ···· S e C - H ···· O. É conhecido que a atividade biológica desta classe de substâncias esta associada a presença deste tipo de ligação.

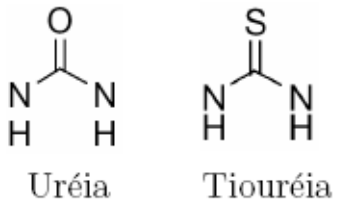


Figura 1 – Representação do grupamento uréia e tiouréia.

Os compostos mostrados na Figura 2 são ativos no combate ao T. Cruzi. Foram identificadas nestas tiouréias as características necessárias para a atividade biológica[4].

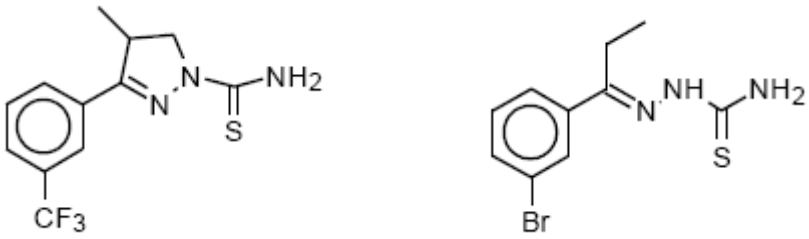


Figura 2 – Tiouréias ativas biologicamente.

Para se analisar tais substâncias é necessário que se conheça sua estrutura cristalina e molecular e, para tal fim, a técnica de difração de raios X tem sido correntemente utilizada.

RAIOS X

Os raios X, descobertos em 1895 pelo físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen, são produzidos quando um feixe de raios catódicos (elétrons) com alta energia é rapidamente desacelerado pela colisão com um alvo metálico. Elétrons são ejetados por um filamento de tungstênio aquecido e acelerados em direção ao alvo metálico dentro de um tudo evacuado, a radiação liberada pelo alvo consiste de uma mistura de um espectro contínuo e de diferentes linhas intensas de comprimentos de onda bem definidos que depende do material do alvo metálico, variando de 0,5 a 3,0 Å, no intervalo de interesse da cristalografia estrutural.

Os raios X são ondas eletromagnéticas de mesma natureza que a luz, porém com comprimentos de onda muito menores, os da luz visível são da ordem de 6000 Å. Sendo ondas eletromagnéticas, exibem propriedades tais como velocidade de propagação igual a 300.000 km/s no vácuo, propriedades de reflexão, refração, difração, interferência e polarização. Os aspectos ondulatório e corpuscular dos raios X são ligados pelas relações clássicas:

$$\lambda = c/\nu \; ; \quad E = qV = eV \; ; \quad E = h\nu = hc/\lambda \; ; \quad \lambda = hc/eV = 12400/V$$

As propriedades da difração e da interferência que decorre do espalhamento dos raios X por monocristais são utilizadas para se obter informações sobre a estrutura dos sólidos. A razão de utilizar raios X para obter detalhes estruturais está na ordem de grandeza semelhante entre os comprimentos de onda dos raios X e as dimensões atômicas que analisamos. Quando raios X encontram qualquer tipo de matéria são em parte transmitidos e em parte absorvidos. Os experimentos mostram que, quando um feixe incide sobre um objeto de espessura x, tendo intensidade incidente I_o, a intensidade transmitida será dada por:

$$I = I_o e^{-\mu x} \qquad (1)$$

Em que μ é o coeficiente de atenuação linear total e depende da substância irradiada, sua densidade e do comprimento de onda dos raios X.

O espalhamento ocorre quando a radiação eletromagnética interage com a matéria. As possíveis interações dos fótons de raios X com a matéria são o efeito fotoelétrico, o espalhamento Thomson e Compton. Na absorção fotoelétrica, quando um fóton de raios X interage com o átomo absorvedor, ele é absorvido

completamente. Em seu lugar, um fotoelétron é ejetado por uma das camadas mais internas do átomo.

No espalhamento Thomson o campo elétrico oscilante, associado ao feixe de raios X que incide sobre os elétrons, obriga-os a executar um movimento oscilatório. Sabemos que toda partícula carregada acelerada emite radiação, o elétron submetido ao campo elétrico oscilante emite uma onda eletromagnética, que possui o mesmo comprimento de onda da radiação incidente (espalhamento elástico ou coerente). A intensidade do feixe de raios X espalhado por um elétron de carga -e e massa m a uma distância r do elétron é dada por

$$I = I_o \frac{e^4}{r^2 m^2 c^4}\left(\frac{1 + \cos^2 2\theta}{2}\right). \qquad \textbf{(2)}$$

em que I_o é a intensidade do feixe incidente e 2θ o ângulo de espalhamento da radiação em relação à direção do feixe incidente, para a onda eletromagnética não-polarizada. Na equação (2), o termo entre parênteses na expressão da direita chama-se fator de polarização. Por esta razão, a onda não-polarizada é decomposta em um campo perpendicular e outro paralelo ao plano de incidência (veja Fig. 3).

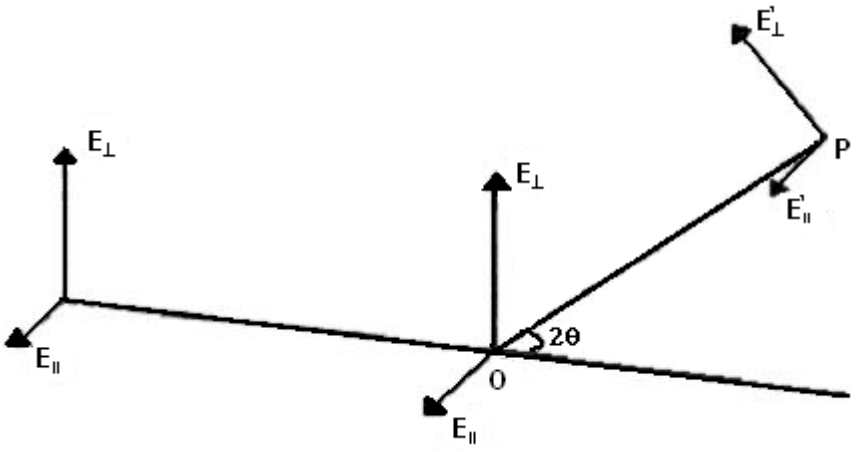


Figura 3 – Relação entre as componentes do campo elétrico da radiação eletromagnética espalhada no ponto P e as componentes do campo elétrico da radiação incidente no ponto O.

O efeito Compton ocorre quando raios X incidem sobre elétrons livres ou fracamente ligados, somente parte da energia do fóton é transferida ao elétron. Assim, partindo da conservação do momento linear e da energia na colisão do fóton com o elétron, obtém-se a expressão abaixo

$$\Delta\lambda = 0.0243(1-\cos 2\theta)(\text{Å}) \qquad \textbf{(3)}$$

em que 2θ é o ângulo de espalhamento e $\Delta\lambda$ é a diferença entre os comprimentos de onda das radiações incidente e espalhada. Dessa maneira, a radiação espalhada possui um comprimento de onda maior que o da radiação incidente (espalhamento inelástico) devido à transferência de energia do fóton para o elétron.

SISTEMAS CRISTALINOS

Um cristal pode ser definido como um sólido composto de átomos arranjados num padrão periódico em três dimensões. Esta divisão periódica do espaço produz um conjunto de celas idênticas em tamanho, forma e orientação. Como as celas são idênticas, seleciona-se uma, denominada cela unitária. O tamanho e forma desta cela podem ser representados por três vetores **a**, **b**, **c** desenhados a partir de uma origem comum. Também podem ser descritos em termos de seus comprimentos (a, b, c) e dos ângulos entre eles (α, β, γ), conhecidos como *parâmetros da cela.*

Há muitas maneiras de selecionar uma cela unitária e todas elas permitem obter a rede por operações sucessivas de translação, veja Fig. 4. Um dos critérios para selecionar uma cela unitária é exigir que ela tenha a mais alta simetria pontual da rede.

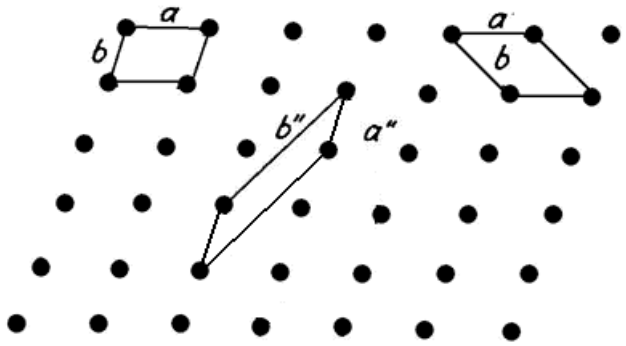


Figura 4 – Algumas escolhas para os vetores da cela unitária.

Dependendo dos valores dos parâmetros de cela, somente sete tipos de sistemas cristalinos podem ser obtidos, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Os sete sistemas cristalinos, grupo pontual de mais alta simetria e parâmetros de cela.

Sistema Cristalino	*Grupo Pontual*	*Parâmetros de cela*
triclínico	$\bar{1}$	$a \neq b \neq c$; $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^o$
monoclínico	2/m	$a \neq b \neq c$; $\alpha = 90^o$; $\beta \neq 90^o$; $\gamma = 90^o$
ortorrômbico	mmm	$a \neq b \neq c$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^o$
tetragonal	4/mmm	$a = b \neq c$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^o$
trigonal	$\bar{3}$m	$a = b = c$; $\alpha=\beta=\gamma\neq90^o$ (romboédrico)
hexagonal	6/mmm	$a = b \neq c$; $\alpha = \beta = 90^o$; $\gamma = 120^o$
cúbico	m3m	$a = b = c$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^o$

REDES DE BRAVAIS

Em 1848, Bravais demonstrou que há 14 diferentes maneiras de arranjar os pontos de uma rede cristalina de forma compatível com a simetria dos 7 sistemas cristalinos considerando as combinações de celas primitivas (que possuem um ponto da rede por cela unitária) e de celas com centragens (com mais de um ponto da rede por cela unitária) que satisfazem a maior simetria pontual possível. Por exemplo, o sistema cristalino ortorrômbico apresenta todos os tipos de rede: primitiva (possui somente um ponto da rede), centrada I (possui 2 pontos da rede sendo um deles no centro do corpo), face centrada (possui 4 pontos da rede com os mesmos localizados nos vértices e no centro de cada face) e base centrada (possui dois pontos da rede com centragem em uma das faces). Estas 14 redes receberam o nome de *Redes de Bravais* e estão representadas na Fig. 5.

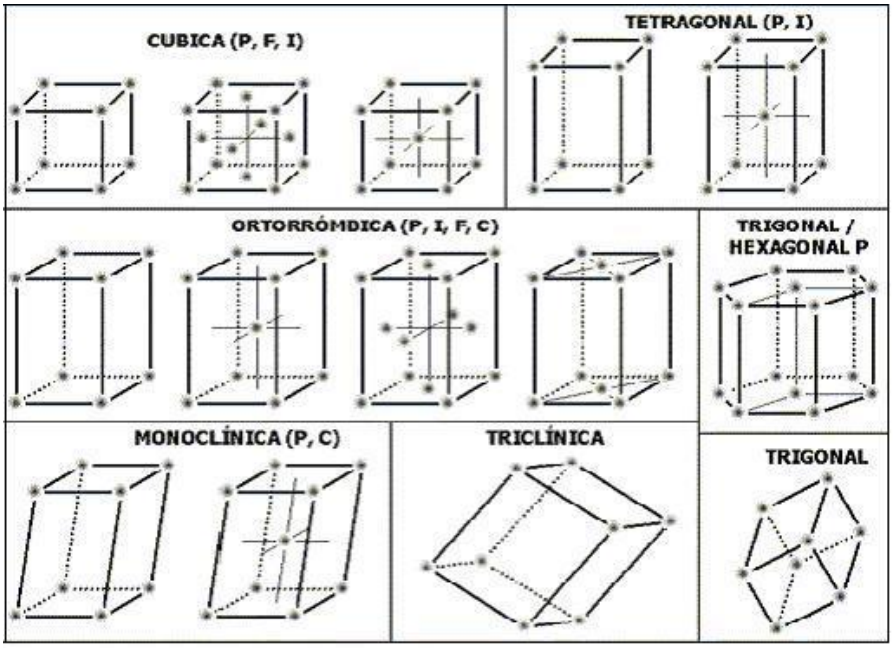


Figura 5 – As 14 Redes de Bravais.

LEI DE BRAGG

Na tentativa de explicar o espalhamento de raios X por cristais em direções bem definidas, W.L. Bragg deduziu uma equação fazendo analogia da difração com reflexões por famílias de planos paralelos formados pelos pontos do retículo cristalino. Feixes de raios X incidem sobre uma família de planos paralelos do cristal e sofrem reflexões de maneira semelhantes a do espelho plano, portanto, o ângulo

de incidência e o de reflexão medidos em relação ao plano são iguais. Máximos de intensidade serão observados quando ocorre interferência construtiva, ou seja, as ondas espalhadas por planos consecutivos estão em de fase. Ondas de mesma freqüência e amplitude propagando-se com velocidades iguais na mesma direção, resultam em uma nova onda de mesma freqüência e de amplitude igual a $2A\cos(\phi/2)$, onde ϕ é a diferença de fase. Se as cristas de uma corresponder às cristas da outra, a diferença de fase entre ambas será nula ($\phi = 0$), e a amplitude da onda resultante será o dobro da amplitude de cada onda componente. Diz-se, nesse caso, que as ondas interferem construtivamente.

Como se pode ver na Fig. 6, considerando que a separação entre planos sucessivos é igual a d, verifica-se que a diferença de caminho entre dois raios incidentes 1 e 2, e espalhados 1´e 2´, será:

$$\mathbf{AB + BC = 2d\,sen\theta.}$$

Se a radiação espalhada estiver em fase, a diferença de caminhos entre os feixes deve ser um múltiplo inteiro do comprimento de onda. Assim, para uma interferência construtiva tem-se:

$$\mathbf{2dsen\theta = n\lambda} \qquad (4)$$

em que λ é comprimento de onda dos raios X e n é um número inteiro. A equação acima é conhecida como **lei de Bragg**.

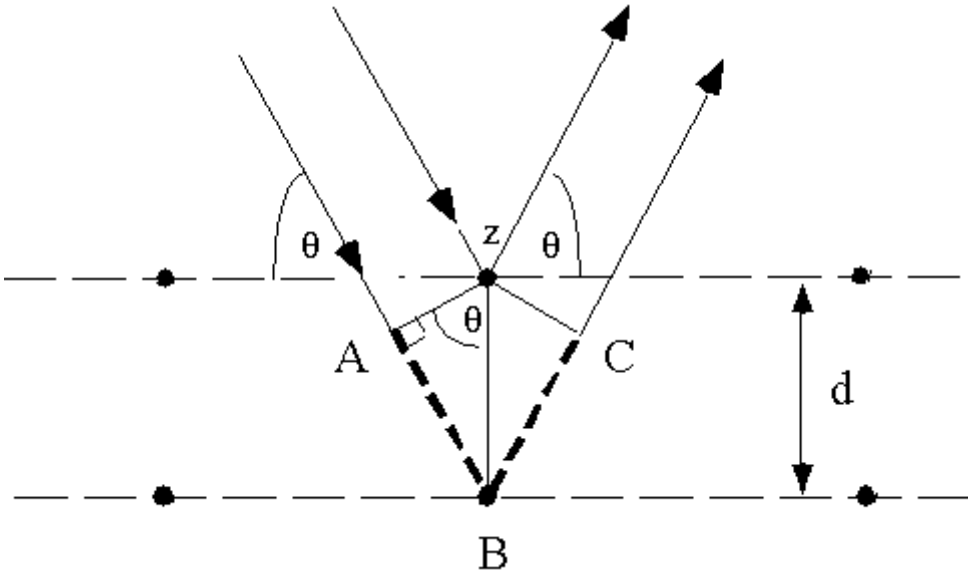


Figura 6 – Geometria da Interpretação de Bragg para a difração de raios X para planos cristalinos paralelos.

REDE RECÍPROCA

Visto que a difração de raios X pode ser interpretada como a reflexão por conjuntos de planos cristalinos, a visualização da grande quantidade de planos com as diversas inclinações é dificultada. Um recurso útil para associar as orientações dos planos cristalinos e as respectivas distâncias interplanares é conhecido como *Rede Recíproca.* A cada família de planos são associados números (h,k,l), os índices de Miller, que são índices utilizados para identificar cada plano cristalino através de um ponto da Rede Recíproca. Os 3 índices inteiros *h, k e l* correspondem ao inverso da posição fracionária em que o plano corta os eixos da cela unitária convencional (Fig. 7).

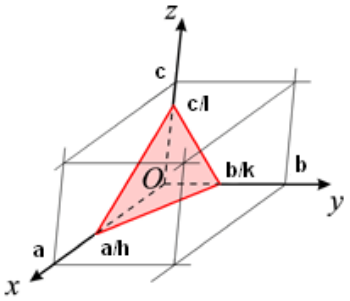


Figura 7 – Plano interceptando os eixos da cela unitária em h,k e l, sendo h,k,l os índices de Miller.

GRUPOS ESPACIAIS

Com o agrupamento das 32 simetrias pontuais dos 7 sistemas cristalinos condizentes com as 14 redes de Bravais teremos 64 grupos de simetria possíveis [2]. Levando-se em consideração as operações de simetria translacionais (os eixos e planos de deslizamento), obtêm-se 230 grupos de simetria (chamados de grupos espaciais) que estão tabulados na Tabela Internacional de Cristalografia [3] para referência.

A intensidade de uma dada reflexão pode ser extinta devido à interferência das ondas espalhadas por átomos em posições relacionadas por operações de simetria translacionais. Informações sobre o grupo espacial só podem ser obtidas pela análise destas *Extinções Sistemáticas* (reflexões que possuem zero de intensidade) de algumas famílias de reflexões. Eixos de roto-translação ocasionam extinções em reflexões ao longo da linha axial a qual o eixo é paralelo e os planos de deslizamento provocam extinções em reflexões no plano paralelo ao elemento de simetria, cortando a origem da rede recíproca. Na Tabela 2 estão relacionados os elementos de simetria translacionais e as extinções sistemáticas que eles provocam.

Tabela 2– Elementos de simetria, tipo de retículo e suas extinções

Classe de reflexão	Condição de extinção	Interpretação da extinção	Símbolo
Tipo de retículo			
hkl	h+k = 2n+1	centrada A	A
	h+l = 2n+1	centrada B	B
	k+l = 2n+1	centrada C	C
hkl	h+k = 2n+1 h+l = 2n+1 k+l = 2n+1	face centrada	F
hkl	h+k+l = 2n+1	corpo centrado	I
Elementos de simetria			
0kl	k = 2n+1	plano de deslizamento b	b
	l = 2n+1	plano de deslizamento c	c
	k+l = 2n+1	plano de deslizamento n	n
h0l	h = 2n+1	plano de deslizamento b	a
	l = 2n+1	plano de deslizamento c	c
	h+l = 2n+1	plano de deslizamento n	n
hk0	h = 2n+1	plano de deslizamento b	a
	k = 2n+1	plano de deslizamento c	b
	h+k = 2n+1	plano de deslizamento n	n
h00	h = 2n+1	[100] eixo roto-translação (a/2)	2_1, 4_2
0k0	k = 2n+1	[010] eixo roto-translação (b/2)	2_1, 4_2
00l	l = 2n+1	[001] eixo roto-translação (c/2)	2_1, 4_2

FATORES DE ESTRUTURA

Consideremos um feixe raios X colimado incidindo sobre um elétron, localizado na origem do sistema de coordenadas. Um vetor unitário, $\mathbf{s}_o$, descreve a direção da radiação incidente. A direção de espalhamento é indicada por outro vetor unitário, **s**, e o ângulo de espalhamento é 2θ. Na Fig. 8, temos o vetor de espalhamento **S**, que é dado pela expressão,

$$\mathbf{S} = (\mathbf{s} - \mathbf{s}_o)/\lambda \qquad (5)$$

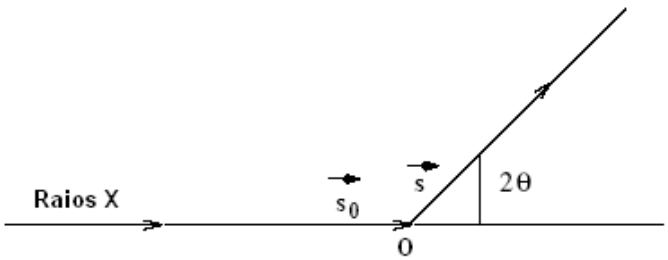


Figura 8 – Espalhamento de raios X por um elétron

Segue então que o módulo de **S** é função do ângulo de espalhamento

$$|S| = 2|\text{sen}\theta| / \lambda \qquad (6)$$

Este módulo é definido no intervalo de 0 a $2/\lambda$. Assim, o vetor **S** está descrito num espaço onde cada eixo de seu sistema de coordenadas tem dimensão do recíproco da distância, ou seja, os vetores S para uma estrutura cristalina são aqueles definidos pela Rede Recíproca.

Sabe-se que os elétrons só podem existir em estados discretos de energia, sendo assim, ao espalhamento Thomson não deve corresponder nenhuma mudança de energia do elétron e ao espalhamento Compton deve corresponder mudanças de energia somente para estados permitidos. Esta última mudança deve ser entre um estado ligado e outro ou o elétron deve ser completamente ejetado do átomo. A solução da equação de onda para um elétron dá uma função de onda Ψ, a partir da qual se pode encontrar a distribuição da carga eletrônica por meio da relação:

$$\rho = |\Psi|^2 \qquad (7)$$

onde ρ representa a densidade de carga em elétrons por unidade de volume, então $\rho(r)dv$ representa o número de elétrons em qualquer elemento de volume dv [2].

A onda total espalhada para uma pequena unidade de volume em uma posição r terá uma amplitude proporcional a densidade eletrônica e defasada por um termo de fase. Para se obter a expressão para o espalhamento de um átomo é necessário fazer-se o somatório sobre toda a distribuição espacial de elétrons (nuvem eletrônica). Assim, podemos escrever a expressão para o fator de espalhamento atômico f como sendo a integral:

$$f(\mathbf{S}) = \int \rho(r)\exp(2\pi i \mathbf{r}.\mathbf{S})dV \qquad (8)$$

O espalhamento total da cela unitária pode ser escrito pelo somatório sobre as contribuições de todos os átomos dentro da cela unitária. Este espalhamento é chamado de Fator de Estrutura que é uma função da distribuição da densidade eletrônica na cela unitária, dado por:

$$F(hkl) = \sum f_j \exp(2\pi i (hx_j+ky_j+lz_j)) \qquad (9)$$

onde f_j é o fator de espalhamento atômico para o j-ésimo átomo na cela unitária, que tem coordenadas x_j, y_j, z_j. Os inteiros h, k e l são os índices de Miller para a reflexão ocorrendo em uma dada direção.

Como as equações (8) e (9) sugerem, a estrutura (eletrônica) cristalina e seu padrão de difração (densidade eletrônica) são relacionados entre si pela Transformada de Fourier. O padrão de difração é a transformada de Fourier da densidade eletrônica da estrutura.

$$F(h,k,l) = \int \rho(r) \exp(2\pi i (hx_j+ky_j+lz_j))dv \quad (10)$$

$$\rho(x,y,z) = \int F(h,k,l) \exp(-2\pi i (hx_j+ky_j+lz_j))dv \quad (11)$$

A equação 10 pode ser utilizada para calcular o padrão de difração esperado para a estrutura modelo e, então, ser usado durante a determinação da estrutura cristalina. Esses valores encontrados são chamados de Fatores de Estrutura Calculados, $F_c(hkl)$. Essa equação descreve, matematicamente, o processo físico observado quando os raios X são difratados por um cristal, durante a coleta de dados.

O principal problema na resolução das estruturas é que os dados disponíveis para a análise são somente as intensidades do espectro da difração de raios X pelo cristal e destes valores, obtemos apenas os módulos dos Fatores de Estrutura. Isso é um fator limitante para a resolução de estruturas moleculares porque impossibilita o cálculo da função de densidade eletrônica por Séries de Fourier com a ausência das fases, que são perdidas no processo de medida. Esse problema é conhecido como *O Problema das Fases* na Cristalografia. Um dos métodos mais utilizado para se resolver esse problema é o chamado Métodos Diretos que, devido a sua robustez, em termos computacionais, e eficácia, é o método correntemente utilizado para pequenas moléculas e foi utilizado na resolução das estruturas analisadas neste trabalho. Neste método as fases são estimadas com base em relações entre os fatores de estrutura.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivos a determinação da estrutura cristalina e molecular de derivados de tiouréias potencialmente bioativas bem como a análise e a interpretação dos dados obtidos.

3. METODOLOGIA

Após a obtenção dos monocristais, foi feita a coleta de dados utilizando o difratômetro CAD4 da Enraf-Nonius. A estrutura foi determinada utilizando Métodos Diretos por meio do pacote de programas WinGX, utilizando o software SHELXS-97. Após a localização dos átomos, excetuando os hidrogênios, a estrutura foi refinada pelo método dos mínimos quadrados utilizando o software SHELXL-97. A partir daí os átomos de hidrogênio foram colocados levando-se em conta a geometria dos átomos aos quais eles se ligam sendo feito novo refinamento para um melhor ajuste das coordenadas atômicas. Nenhum hidrogênio foi refinado anisotropicamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No desenvolvimento deste projeto foi implementado um programa em Fortran 90 para determinar, a partir da observação das extinções sistemáticas das reflexões, a existência de certos elementos de simetria do grupo espacial ao qual a molécula pertence e do tipo de retículo.

Para determinar o grupo espacial, devemos analisar as reflexões hkl observadas. São consideradas observadas todas aquelas cuja intensidade é pelo menos duas vezes maior que o desvio padrão daquela medida. O arquivo .hkl, de saída do difratômetro, possui uma estrutura de colunas, em que analisaremos as 5 primeiras colunas. Estas indicam, subsequecialmente, h, k, l, I, σ (onde I é a intensidade medida e σ é o desvio padrão). É feita a análise das extinções das reflexões possíveis para determinação do tipo de retículo e para determinação da existência de possíveis eixos de roto-translação (screw axis) e de planos de deslizamento (glide plane), levando em consideração a tabela 2.

Este programa foi desenvolvido com o objetivo de analisar arquivos contendo os índices de Miller (hkl), separando as reflexões observadas através da análise de seu desvio padrão e obter, além do tipo de retículo do cristal em questão, a simetria do mesmo. Ao executá-lo, além de obter estes dados em um arquivo de saída com extensão .dat, o programa também gera um arquivo específico para cada uma das extinções contendo o conjunto de reflexões relativo aos retículos e um outro contendo o conjunto de reflexões relativo aos elementos de translação e de rotação.

A estrutura utilizada, N-benzoil N'-(2-hidroxietil)-tiouréia, para testar o programa, mostrada na Fig. 9, é um derivado de tiouréia que pertence ao grupo

espacial $P2_1/c$. Com os dados do arquivo .hkl as extinções sistemáticas foram analisadas com o programa desenvolvido e foi confirmada a existência do eixo de roto-translação 2_1 e do plano de deslizamento c bem como o tipo de rede, primitiva (P).

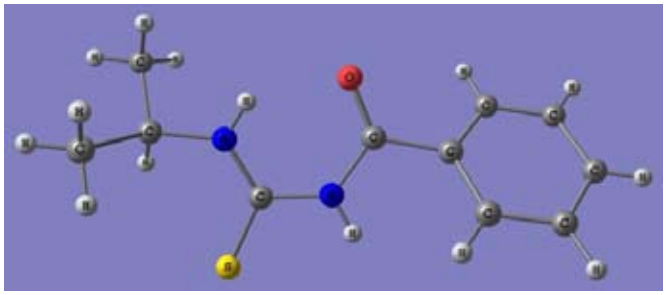


Figura 9 – Estrutura molecular do composto N-benzoil N'-(2-hidroxietil)-tiouréia

Determinação da Estrutura do Composto N-benzoil N'-(4-metilfenil)-tiouréia

Na Fig. 10 temos a representação Ortep [7] do composto em questão. A amostra selecionada para o experimento de raios X é de tamanho 0.35x0.28x0.2 mm. Os dados de difração foram coletados num difratômetro CAD4 usando radiação Cu-Kα. Os dados cristalográficos estão relacionados na Tabela 3 e os principais parâmetros geométricos estão na Tabela 4.

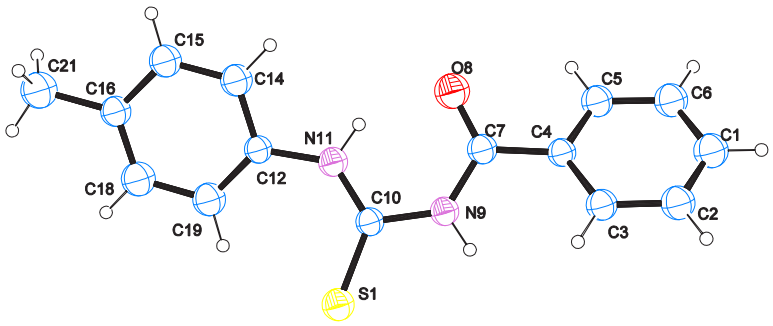


Figura 10 – Representação Ortep para a estrutura molecular do composto N-benzoil N'-(4-metilfenil)-tiouréia.

Tabela 3: Dados Cristalográficos do composto N-benzoil N'-(4-metilfenil)-tiouréia.

Fórmula	$C_{15}H_{14}N_2O_1S_1$	**Densidade (g/cm^3)**	1.30
Peso molecular	270.4	**μ (mm-1)**	2.013
Temperatura	293(2)	**Θ_{min} (°) – Θ_{max} (°)**	3.4 – 67.1
λ (Å)	1.54180	**h**	-15...15
Sistema cristalino	Monoclínico	**k**	-1...6
Grupo espacial	$P2_1/c$	**l**	0..23
a(Å)	13.021(2)	**Reflexões coletadas**	3114
b(Å)	5.424(1)	**Independentes**	2466(R_{int} =0.0737)
c(Å)	19.861(3)	**Z**	4
β(deg.)	98.78(2)	**Goof**	1.068
Volume(Å^3)	1386.26(44)	**Índices R [I >2σ(I)]**	R1 = 0.0456 wr2 = 0.158

Tabela 4 - Principais parâmetros geométricos

	Comp. Ligação		Ângulo ligação		Ang. torsional
N9-C10	1.398(3)	**C4-C7-N9**	117.46(3)	**C4-C7-N9-C10**	-179.3(4)
N9-C7	1.374(2)	**C7-N9-C10**	128.20(3)	**C7-N9-C10-N11**	1.4(3)
N11-C12	1.421(3)	**N9-C10-N11**	114.58(3)	**N9-C10-N11-C12**	-178.2(3)
C10-S1	1.658(3)	**C10-N11-C12**	131.95(3)		
C16-C21	1.502(5)	**N9-C10-S1**	118.27(3)		
O8-C7	1.221(3)	**S1-C10-N11**	127.15(3)		

Todos os parâmetros geométricos estão dentro do valor esperado. Na figura 11, temos a representação das pontes de hidrogênio que mediam o empacotamento molecular.

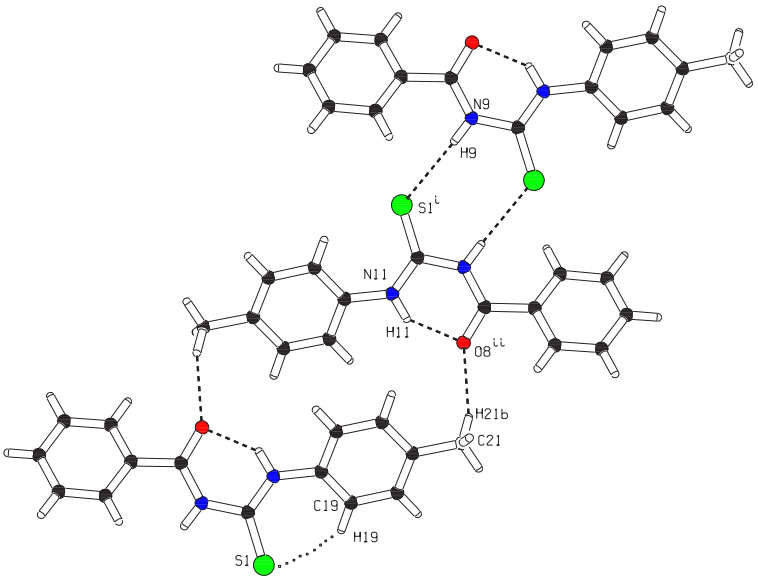


Figura 11 – Pontes de Hidrogênio

Tabela 5 – Geometria das Pontes de Hidrogênio para o Composto *N-benzoil N'-(4-metilfenil)-tiouréia*

D—H...A	D-H	H...A	D...A	D—H...A
N(9)-H(9)...S(1)^{i}	0.86	2.73	3.536(2)	157
N(11)-H(11)...O(8)	0.86	1.86	2.599(3)	143
C(19)-H(19)...S(1)	0.93	2.66	3.246(3)	122
C(21)-H(21b)...O(8)^{ii}	0.96	2.48	3.398(4)	161

(^{i}) 2-x, 1 – y, -z ; (^{ii}) 1-x, 2-y,-z

A ligação de hidrogênio intramolecular N(11) – H(11) ···· O(8) estabiliza a molécula. A ligação N(9) – H(9) ···· S(1) resulta em um dímero em torno do centro de inversão em (½, 0, 0). A outra ligação intermolecular, C(21) – H(21b) ···· O(8) ocorre em torno do centro de inversão em (0, ½, 0) A atividade biológica desse composto ainda não foi testada, mas esta amostra apresenta as características estruturais compatíveis com substâncias biologicamente ativas.

4. CONCLUSÃO

No projeto desenvolvido foi feita uma revisão de parte da metodologia das técnicas de cristalografia as quais foram aplicadas para a implementação do programa para determinação do grupo espacial.

Foi elucidada a estrutura molecular e cristalina do composto *N-benzoil N'-(4-metilfenil)-tiouréia* por Métodos Diretos. Este composto apresentou importantes ligações de hidrogênio, ligações estas que aparecem em compostos derivados da tiouréia que são bioativos. A estrutura analisada foi comparada com os resultados obtidos na estrutura 1-Benzoyl-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea [9], e apresentou pontes de hidrogênio e comprimentos de ligação semelhantes. Devido a tudo isso, essa estrutura será alvo de investigações futuras devido a sua potencial atividade biológica.

5. BIBLIOGRAFIA

1. STOUT, G.H. & JENSEN, L.H. *X-Ray Strutucture Determination: A Pratical Guide*. New York: Macmillan Publishing Company, 1968.
2. WOOLFSON,M.M. *An Introduction to X-Ray Crystallography*. London: Cambridge University Press, 1970.
3. International Table for Crystallography,vol. A, Space Group Symmetry, 4th edition, 1996.
4. BUERGER, M.J. *Vector Space and its applcation in crystal-structure investigation.* New York: John Wiley & Sons Inc, 1967.
5. BUERGER, M.J. *Crystal Structure Analysis*. New York: John Wiley & Sons Inc, 1967..
6. PATTERSON, A.L. Phys. Rev. 46, 372-376, 1934.
7. FARRUGIA, L.J. *Ortep-3 for Windows version 1.08*. J. Appl. Cryst. 30, 565.
8. DU, X., GUO, C., HANSELL, E., DOYLE, P. S., CAFFREY, C.R., HOLLER, T. P., MCKERROW, J. H. AND COHEN, F. E.. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. J. Med. Chem., (2002), 45, 2695_2707.
9. 1-Benzoyl-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea, Volume 62, Part 6 (June 2006), Acta Cryst. (2006). E62, o2452-o2453, M. Khawar Rauf, A. Badshah and U. Flörke

Aplicações de telemedicina para triagem e diagnóstico da síndrome do olho vermelho

Geórgia Maria de Carvalho Peres[1], Marcos Pereira Ávila[1], Alexandre Chater Taleb[1]

[1]*Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Goiás*

E-mail: georgiacperes@gmail.com

Palavras chave: telemedicina, olho vermelho, hiperemia ocular, acesso a serviços de saúde

1. INTRODUÇÃO

A telemedicina torna-se, dia a dia, uma ferramenta viável para que centros de medicina avançada em todas as especialidades médicas possam ser consultados por qualquer indivíduo. Com ela, as barreiras geográficas deixam de existir e os pacientes passam a contar com inúmeras opções de atendimento.

O olho vermelho é um sinal que está relacionado a várias enfermidades oculares. Seus sintomas, tais como, dor ocular, redução da acuidade visual, sensação de desconforto intenso com fechamento palpebral reflexo, fotofobia, e seus sinais constituem a síndrome do olho vermelho, fazendo referência a um processo inflamatório primário ou secundário de qualquer um dos elementos do segmento anterior do olho (anexos, córnea e conjuntiva).

A síndrome do olho vermelho é a queixa oftalmológica mais prevalente nas unidades de saúde básica e em pronto-socorros de centros de oftalmologia, totalizando cerca de 50% das queixas apresentadas[1].

A prática oftalmológica refere que grande parte dos casos de síndrome do olho vermelho não necessita de atendimento especializado, podendo ser tratados por médicos generalistas, facilitando assim, a objetividade na conduta e tratamento do grande fluxo de pacientes.

Diante do sinal do olho vermelho, é preciso diferenciar os casos simples dos perigosos. Através da caracterização adequada das diversas causas da síndrome do olho vermelho é possível realizar a triagem dos pacientes que necessitam de encaminhamento para centro especializado e, dentre os menos graves, encorajar os médicos generalistas a realizar o tratamento clínico[1]. Os exemplos de casos menos graves estão blefarites e hemorragias subconjuntivais leves[2].

Propõe-se criar um modelo que seja eficaz, clinicamente viável e de custo acessível para a caracterização da síndrome do olho vermelho, para a triagem de pacientes em unidades de saúde básica distantes dos centros de referência em oftalmologia, de modo que se possa reduzir os gastos gerados ao poder público e aos pacientes no tratamento oftalmológico.

2. OBJETIVOS

2.1-Identificar e descrever os principais diagnósticos diferenciais da síndrome do olho vermelho;
2.2-Propor modelo de digitalização de imagens da síndrome do olho vermelho anexadas às fichas clínicas dos pacientes;
2.3-Estabelecer os limites da digitalização dos casos da síndrome do olho vermelho para triagem à distância;
2.4-Expor as imagens realizadas para avaliação diagnóstica por médico oftalmologista e por médico generalista;
2.5-Comparar as análises.

3. METODOLOGIA

3.1-Levantamento bibliográfico das causas etiológicas da síndrome do olho vermelho;
3.2-Acompanhamento do atendimento de pacientes com queixa de olho vermelho no pronto-socorro do CEROF – HC/UFG, totalizando amostra de cem pacientes;
3.3-Registro dos pacientes segundo a sistemática:

- Preenchimento dos dados em ficha clínica que inclui: dados pessoais, história clínica detalhada e exame ocular.
- Obtenção de imagens oftalmológicas digitalizadas através de: 1)Foto ocular externa com câmera digital (Sony Cyber-shot, 5.1 Mega Pixels, 2.5''LCD Monitor, lente Carl Zeiss Vario-Tessar 2.8-5.2/7.9-23.7) acoplada a adaptador oftalmológico em sua lente de zoom com resolução de 1280x960 pixels; 2) Foto de lâmpada de fenda fixa com a mesma câmera digital acoplada à lâmpada de fenda convencional com resolução de 1280x960 pixels;

3.4-Armazenamento das imagens nos computadores do laboratório de tele-oftalmologia através de cabo USB, anexadas à ficha clínica de cada paciente;

3.5-Envio dos dados coletados a um oftalmologista do CEROF, certificado pelo Conselho Brasileiro de Oftalmologia e Associação Médica Brasileira como especialista há mais de cinco anos. Estes será responsável pela avaliação da qualidade clínica e técnica das imagens realizadas de acordo com critérios estabelecidos para classificação (tabelas 1 e 2) e pelo diagnóstico médico da causa etiológica de síndrome de olho vermelho.

- Qualidade Técnica	Focalização na estrutura anatômica mais Importante (01 ponto)
	Zoom adequado (01 ponto)
	Iluminação adequada (01 ponto)
- Qualidade Clínica	Número suficiente de imagens (01 ponto)
	Relevância da estrutura anatômica na imagem (01 ponto)

Tabela 1: Critérios de avaliação da qualidade da imagem

Classificação	Critérios
Excelente	Três pontos de qualidade técnica e dois pontos de qualidade clínica
Bom	Somatório dos critérios igual a quatro
Razoável	Somatório dos critérios igual a três
Ruim	Somatório dos critérios menor ou igual a dois

Tabela2: Classificação da qualidade das imagens

3.6-Envio das imagens classificadas como "Bom" e "Excelente" (acompanhadas da ficha clínica do paciente) para médico generalista em posse do levantamento bibliográfico das causas etiológicas da síndrome do olho vermelho e do manual "Como examinar o olho com hiperemia ocular"[2]. Este será responsável pelo diagnóstico médico da imagem;

3.7-Comparação e análise dos resultados obtidos e diagnósticos encontrados.

4. RESULTADOS

A amostra foi composta de cem pacientes randomicamente selecionados no PS-CEROF sob a queixa de olho vermelho (hiperemia ocular), de ambos os sexos (54% homens; 46% mulheres), com a menor idade de 05 anos e a maior idade de 65 anos; e provenientes ambos do município de Goiânia (75%) e outros municípios de Goiás (25%);

A realização de foto ocular externa foi qualificada no critério “excelente” em 43 (43%) casos, no critério “bom” em 26 (26%) casos, no critério “razoável” em 22 (22%) casos e ruim em 09 (9%) casos.



Figura 1: Foto ocular externa em paciente com Triquíase, classificada no critério “excelente”.

A realização de foto com lâmpada de fenda fixa foi qualificada no critério “excelente” em 43 (33%) casos e no critério “bom” em 27 (27%) casos, no critério “razoável” em 25 (25%) casos e ruim em 05 (5%) casos. Tais resultados apontam para um índice satisfatório de aplicabilidade de tais aparelhos ao diagnóstico da síndrome do olho vermelho (tabela 3).

Foram selecionados os 70 casos classificados nos critérios “bom” e “excelente” para a realização do diagnóstico da causa diferencial da síndrome de olho vermelho por médico generalista.

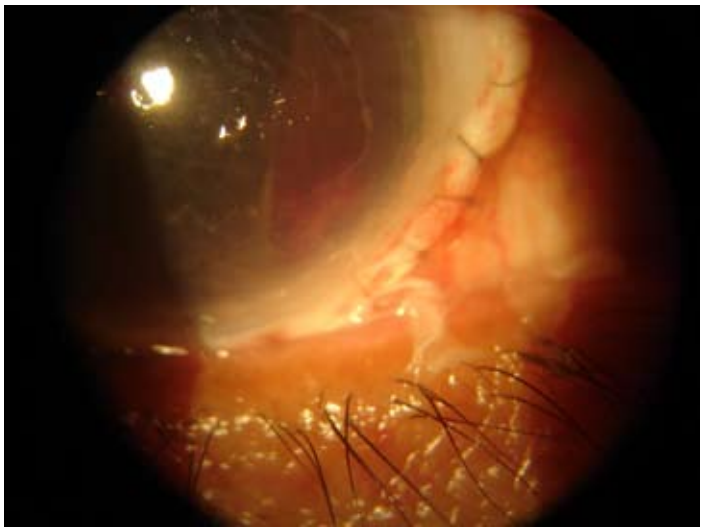


Figura 2: Foto com lâmpada de fenda fixa (biomicroscópio) mostrando um pós-operatório de transplante de córnea. Classificada no critério "bom".

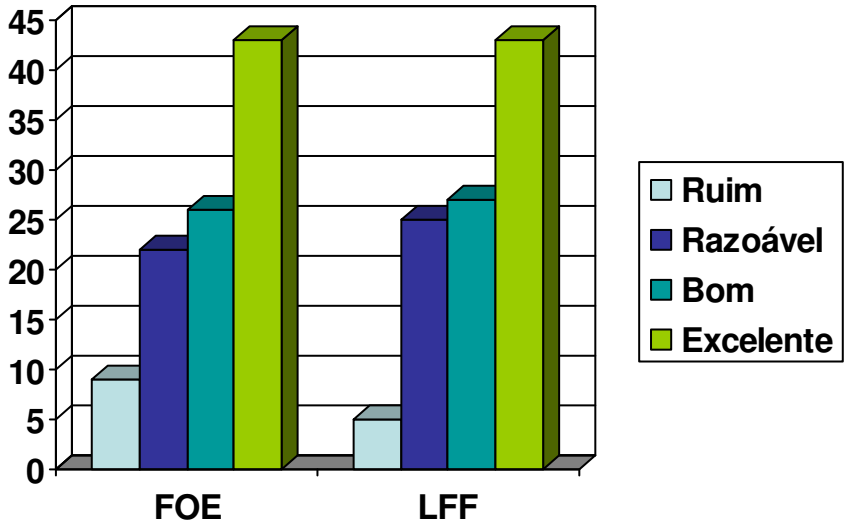


Tabela 3: Comparação dos resultados obtidos através de imagens com foto ocular externa (FOE) e lâmpada de fenda fixa ou convencional (LFF).

Estes casos foram diagnosticados pelo médico que prestou atendimento no PS-CEROF como: **conjuntivite** 58% (40 casos), sendo 25 casos de causa viral, 13 casos de causa alérgica e 02 casos de causa bacteriana; **corpo estranho** em 17% (12 casos); **blefarite** em 10% (07 casos); **ceratite** em 3% (02 casos); **úlcera corneana** (por lente de contato) em 1,5% (01 caso); **triquíase** em 1,5% (01 caso); **episclerite** em 1,5% (01 caso); **uveíte anterior** em 1,5% (01 caso); **lesão por queimadura química** 1,5% (01 caso); **pós-operatório de transplante de**

córnea 1,5% (01 caso); **hemorragia sub-conjuntival** 1,5% (01 caso) e **glaucoma de ângulo fechado** 1,5% (01 caso).

Etiologia (n=70)	No.	%
Conjuntivite	40	58
Viral	25	62,5
Alérgica	13	32,5
Bacteriana	02	0,50
Corpo estranho	12	17
Blefarite	07	10
Ceratite	02	03
Episclerite	01	1,5
Hemorragia subconjuntival	01	1,5
Glaucoma de ângulo fechado	01	1,5
Queimadura química	01	1,5
Pós-operatório	01	1,5
Triquíase	01	1,5
Úlcera corneana	01	1,5
Uveíte anterior	01	1,5

Quadro 1: Diagnósticos diferenciais da Síndrome do Olho Vermelho no PS-CEROF

Somada à ficha clínica dos pacientes, o médico generalista foi capaz de concluir diagnóstico das conjuntivites, do corpo estranho, da blefarite, da hemorragia subconjuntival, da triquíase, do pós-operatório e do glaucoma de ângulo fechado em 100% dos casos.

Apresentou dúvida no diagnóstico ou insucesso diante dos casos de ceratite, episclerite, queimadura química, úlcera corneana e uveíte anterior, reconhecendo, no entanto, a gravidade de tais situações clínicas.

5. DISCUSSÃO

A queixa de olho vermelho é muito comum, seja no consultório do médico oftalmologista, seja no do clínico geral. Um clínico geral que atende em média 2000 pacientes ao ano, provavelmente vai ter 40 casos de conjuntivites e um caso de iriíte neste período, além de um caso de glaucoma a cada dois anos[3].

A maioria dos casos não apresenta grandes riscos. No entanto, alguns pacientes podem apresentar patologias que ponham em risco a visão, sendo

essencial diferenciar as várias causas de olho vermelho, indicar o tratamento adequado ou encaminhar o paciente a um serviço de referência. As três grandes ameaças à visão são: as ceratites, iridociclites e glaucomas agudos[2].

As principais causas de interesse da síndrome do olho vermelho para o clínico são: glaucoma, ceratite, esclerite, episclerite, celulite orbitária, conjuntivite, uveíte e endoftalmite[4]**.** Tais casos devem ser encaminhados, com presteza, ao oftalmologista.

As conjuntivites são inflamações da conjuntiva caracterizadas por secreção(86%), olho vermelho ou hiperemia conjuntival(61%), lacrimejamento(45%), prurido ocular(44%), ardor(40%), fotofobia(22%), dor ocular e edema palpebral(15%), edema conjuntival(6%), baixa da acuidade visual(5%) e infartamento do gânglio pré-auricular, sensação de corpo estranho ocular (1%) e embaçamento visual que melhora ao piscar[4]. Diferenciam-se pela causa etiológica em bacterianas, virais e alérgicas.

As conjuntivites virais caracterizam-se em geral por hiperemia conjuntival, hipertrofia folicular e adenopatia pré-auricular. São agudas e não purulentas e as conjuntivites alérgicas caracterizam-se por prurido ocular, sendo em geral recorrentes.

A ceratite é um processo inflamatório da córnea. Trata-se de uma urgência médica, caracterizada por dor, fotofobia, hiperemia dos vasos ciliares, lacrimejamento e sensação de corpo estranho.

O glaucoma é definido como aumento da pressão intra-ocular associado a dois sintomas: alterações fundoscópica (escavação patológica do nervo óptico) e campimétrica (no campo visual)[5]. Se não tratado evolui naturalmente para a cegueira irreversível. A crise é caracterizada por dor ocular, hiperemia, acentuada diminuição da acuidade visual, náuseas e vômitos e sintomas prévios como halos coloridos e borramento visual.

Uveíte é a inflamação do trato uveal, podendo associar-se a inflamações de outras estruturas oculares, com possibilidade de perda visual significativa. Ocorre dor ocular, fotofobia e lacrimejamento[4].

A hemorragia subconjuntival é uma causa comum de olho vermelho agudo, sendo seu diagnostico basicamente clínico, através da anamnese e do exame físico[5].

Quando um paciente com olho vermelho é atendido, o primeiro cuidado é verificar se há congestão do tipo superficial, como nas conjuntivites, ou profunda, onde se forma um anel violáceo ao redor da córnea, encontrada nas afecções mais sérias como glaucoma agudo, uveíte anterior e ceratite.

Quando se trata de hiperemia ocular principalmente, não próximo da córnea, sem perda visual, há maiores chances de que o médico generalista possa realizar o diagnóstico e tratamento adequados.

Sintomas sugestivos de gravidade são: visão borrada, dor, fotofobia e halos coloridos. Os sinais de menor gravidade são: hiperemia conjuntival, secreção e aumento de gânglios pré-auriculares[2].

Apesar de prevalente, a maioria dos médicos enfrenta certo grau de dificuldade para diferenciar as prováveis causas da síndrome do olho vermelho[4]. O conhecimento de suas diversas causas pelo médico generalista, bem como uma anamnese bem elaborada e um exame físico cuidadoso foram fundamentais para sua diferenciação.

Os resultados das melhores imagens colhidas pelos aparelhos de tele-oftalmologia, associadas às fichas clínicas dos pacientes mostraram-se eficientes para o diagnóstico clínico das causas de síndrome do olho vermelho mais prevalentes (conjuntivite, principalmente) e para o reconhecimento de situações complexas que necessitam de intervenção inicial e encaminhamento rápido ao especialista.

6. CONCLUSÃO

Na ausência de um especialista, realidade em grande parte das cidades interioranas brasileiras, o diagnóstico e o tratamento inicial podem ser feitos por médico generalista preparado.

Diante dos sintomas de diminuição da acuidade visual e dor ocular intensa, há necessidade de encaminhamento a especialista com urgência.

Este trabalho apresenta evidências de que a telemedicina, associada a uma história clínica detalhada, são úteis na identificação das causas etiológicas da síndrome do olho vermelho.

A telemedicina apresenta-se, portanto, como eficaz ferramenta para prevenção primária de perdas visuais, para a realização de tratamento dos problemas oftalmológicos mais simples e das urgências, bem como para a realização do encaminhamento adequado dos casos mais complexos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1: Pierre Filho, PT. Olho Vermelho. Revista Ciências Médicas. Campinas, 12 (2); 195-200, abril-junho 2003.
- 2: Faria e Sousa, Sidney Júlio de. Doenças oculares externas. Medicina (Ribeirão Preto);30(1):52-5, jan.-mar. 1997.
- 3: Carvalho, Juliana Oliveira de; Pandolfi, Daniel Lubisco; Avozani, Monique Lazzaretti; Ávila, Ediane Gonçalves; Romani, Flávio. Olho vermelho. Acta méd. (Porto Alegre); 26:166-177, 2005
- 4: Duarte, Antônio Cláudio Goulart; Cuiabano, Eduardo Bussiki; Alvim, Heryberto da Silva; Alvim, Paulo de Tarso da Silva; Bronze, Roberto Bastos. Síndrome do olho vermelho: diagnóstico e tratamento clínico. J. bras. med;69(1):101-12, jul. 1995. ilus, tab.
- 5: Kanski, Jack J. Oftalmologia Clínica, Uma Abordagem Sistêmica. Tradução da 5ª Edição. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2004
- Scherer, Roberto; Leite Filho, Wilson de Oliveira. O olho vermelho na prática médica. Pesqui. méd. (Porto Alegre);20(2):100-4, 1986. ilus, Tab.
- Taleb A.C, Chao L.W., Ávila M., Böhm G.M.. The efficacy of Telemedicine for Ophthalmology Triage by a General Practitioner. Journal of Telemedicine and Telecare, 2005;11:S1:35 .
- Taleb, A.C.. Web based tele-assistance and tele-education in ophthalmology. Telemed Journal and e-health 2003; 9: S-55.
- Taleb A.C, Chao L.W., Ávila M., Böhm G.M.. Full time teleophthalmology service in Brazil. Telemed Journal and e-health 2004; 10(1): S-33.
- Kikuta, H, Taleb AC, et al.. Censo Oftalmológico Brasileiro. Encarte da Revista Oftalmologia em Foco, 2003.
- Chao,L.W., Silveira P.S.P., Böhm G.M.. Telemedicine and Education in Brasil. Journal of Telemedicine and Telecare, 1999; 5:137-138.

MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE UM PLASMÍDEO CRÍPTICO ISOLADO DE *SALMONELLA SP.*

Renata Vieira Bueno [a], Luiz Artur Mendes Bataus [b]*

[a]Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74605-220, Brasil

[b] Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 74001-970, Brasil

E-mail: vieirabueno@hotmail.com, bataus@icb.ufg.br

Palavras-chave: *Salmonella sp.*, plasmídeo, *spvC, sefC, pefA, invA,* vetor biotecnológico.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende bastonetes gram-negativos que têm como habitat o trato gastrintestinal de homens e animais, possuindo crescimento ótimo a 37º C. Atualmente, há mais de 2400 sorotipos de *Salmonella*, dos quais um grande número é capaz de causar toxiinfecção alimentar – o que justifica a preocupação de órgãos responsáveis pela saúde pública com a ubiqüidade da *Salmonella* e com os efeitos decorrentes de sua propagação em alimentos (MENDES, 2007).

Segundo TAVECHIO *et al*. (2004, apud SANTOS, 2007), *Salmonella* sp. são agentes etiológicos da salmonelose, uma zoonose de distribuição mundial que provoca surtos de doenças transmitidas por alimentos. A salmonelose aviária é considerada a segunda doença bacteriana de maior impacto na avicultura mundial, sendo responsável por queda na eclodibilidade e nascimento de aves de baixa qualidade, determinando alta mortalidade e morbidade (MENDES, 2007). Através da manipulação e/ou consumo de carnes e derivados oriundos de aves contaminadas pode ocorrer infecção humana, a síndrome clínica mais comum neste caso é a gastroenterite (MURRAY, 1990).

Para que a *Salmonella* infecte um organismo é necessário que ela enfrente mecanismos da imunidade inata e da imunidade adquirida. Caso a bactéria possua fatores de virulência, ela terá maior facilidade em superar as barreiras impostas tanto pelo sistema imunológico do organismo a ser invadido quanto por situações adversas tais como pH ácido, temperaturas elevadas e privação de nutrientes. De acordo com HACKER *et al*. (1997) a virulência da *Salmonella* é bastante complexa e envolve fatores

que podem estar localizados no cromossomo – nas chamadas ilhas de patogenicidade – ou em elementos genéticos transmissíveis, dentre eles os plasmídeos.

Plasmídeos são moléculas circulares de DNA extracromossomal que possuem replicação autônoma. Os plasmídeos bacterianos de ocorrência natural possuem tamanho entre 2000 e 400000pb, podendo ainda ser intencionalmente inseridos em células bacterianas através de um processo de transformação (LENHINGER, 2006). A replicação independente do DNA cromossomal é uma característica dos plasmídeos que possibilita a existência de várias cópias de um mesmo DNA plasmidial em uma única célula hospedeira (YAGURA *et al.,* 2006). Os plasmídeos não são essenciais, o que significa que estes podem ou não estar presentes em uma célula hospedeira, e sua ausência não implica necessariamente na inviabilidade da célula.

Essas cópias de DNA extracromossomais, por sua vez, podem possuir funções desconhecidas – sendo então denominados crípticos, ou podem codificar proteínas que desempenhem funções nas células hospedeiras. Dentre essas funções estão resistência a antibióticos, resistência a metais pesados, produção de toxinas, metabolismo de fontes alternativas de carbono, e constituição de ilhas de patogenicidade. Segundo KRETOVÁ (2005) e YAGURA (2006) os genes de resistência a antimicrobianos são transmitidos com alta freqüência, de forma que uma célula hospedeira pode apresentar resistência a antimicrobianos distintos.

Em uma única célula hospedeira pode-se encontrar diferentes plasmídeos, desde que estas moléculas plasmidiais sejam compatíveis entre si. Esta compatibilidade é conferida a plasmídeos que apresentam diferentes mecanismos de replicação (RYCHLIK *et al.*, 2006).

Muitos plasmídeos têm sido identificados nas *Salmonella sp.* Em trabalho realizado por GREGOROVA *et. al*. (2004) utilizando *S. enteretides* foram identificados cerca de 30 plasmídeos de baixo peso molecular. Dentre essas moléculas algumas apresentaram diversas funções: codificação de uma enzima incomum que age na transcriptase reversa de fagos conferindo resistência a célula bacteriana, codificação de sistemas funcionais de modificação e restrição, codificação de sistemas de modificação-restrição não funcionais e codificação do antígeno O.

Considerando a *Salmonella sp*, há diferença na prevalência de plasmídeos de

acordo com os sorovares. Enquanto é comum os sorovares Hadar, Paratyphi e Typhi não possuírem plasmídeos, os sorovares Aborto Bovis, Cholerae-suis, Dublin, Enteretidis, Gallinarum, Pullorum e Typhimurium geralmente possuem. Estes sorotipos são bastante associados a infecções em humanos e animais, e os plasmídeos geralmente são associados a uma maior virulência (RYCHLIK 2006).

Através da manipulação genética de plasmídeos é possível transformá-los em vetores de interesse biotecnológico - vetores são agentes que facilitam a inserção de material exógeno dentro de uma célula hospedeira. Constituem, portanto, ferramentas importantes no estudo da Biologia Molecular de Microrganismos.

Com o objetivo de estudar plasmídeos presentes em *Salmonella sp*, foram isoladas 14 amostras obtidas de carcaças de frango provenientes do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. Das 14 amostras analisadas, 08 apresentaram plasmídeos. Os plasmídeos obtidos apresentaram tamanhos variados, sugerindo que se tratava de plasmídeos diferentes, e em algumas amostras observou-se a presença de diferentes plasmídeos.

2 OBJETIVOS

Detecção, extração e caracterização de um plasmídeo críptico isolado de *Salmonella enteretides*, de tal forma a transformar esse plasmídeo em um vetor de interesse biotecnológico.

3 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

3.1 Manutenção dos microrganismos

O material utilizado no trabalho é pertencente ao referido laboratório, sendo constituído por bactérias mantidas em meio Lúria-ágar à temperatura ambiente e repicadas mensalmente (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.2 Extração de DNA plasmidial bacteriano

As cepas de *Salmonella* sp e de *Escherichia coli* foram submetidas à extração de DNA plasmidial de acordo com a metodologia proposta por Sambrook *et al*. (1989), utilizando para isso o KIT Flexiprep Pharmacia^{R}. O clone foi inoculado em 5,0 mL de meio Lúria e incubado a 37°C por 16 horas, sob agitação de 150 rpm. Foram centrifugados 1,5 mL deste material em tubos do tipo *eppendorf* a 5.000 rpm por 2 minutos. O sedimento foi ressuspenso após adição de 200µL de solução I e agitação vigorosa. Em seguida foi acrescentado 200µL da solução II e os tubos foram homogeneizados por inversão, por 3 minutos. Foram adicionados 200µL da solução III e novamente os tubos foram homogeneizados por inversão, sendo centrifugados a 5.000 rpm por cinco minutos. Ao sobrenadante transferido para outro *eppendorf* adicionou-se 420µl de isopropanol absoluto, seguindo-se a homogeneização e posterior incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Após incubação o material foi centrifugado por 10 minutos a 5.000 rpm, e ao final o sobrenadante foi descartado e sedimento foi secado a temperatura ambiente e ressuspenso em 150µL de solução Sephaglas^{tm} FP, incubado por 5 minutos - sendo realizadas homogeneizações a cada minuto. O material, então, foi centrifugado por 2 minutos a 5.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com 200µL de tampão de lavagem e novamente centrifugado por 2 minutos. Ao sedimento foram adicionados 300µL de etanol 70% (v/v) que também foi centrifugado por 2 minutos. O etanol foi então descartado e o sedimento foi secado a temperatura ambiente por 20 minutos. O DNA plasmidial ligado ao Sephaglas^{tm} FP foi eluído com a adição de 50 µL de tampão R, ficando incubado por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugado por 2 minutos a 5.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf e analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

3.3 Eletroforese em gel de agarose

O DNA plasmidial foi analisado por eletroforese, segundo a metodologia de SAMBROOK *et al*. (1989). Foi utilizado gel de agarose 1% (p/v), TEB 0,5 X e brometo de etídio (0,2µg/mL). O gel foi submetido a uma amperagem de 30 mA para que a amostra entrasse no gel a partir do ponto de aplicação, e em seguida a amperagem foi

aumentada para 60mA. As bandas de DNA plasmidial foram visualizadas através da irradiação ultravioleta de baixa intensidade.

3.4 Preparo e transformação de células competentes

Para o preparo de células competentes, isto é, aptas a permitir a entrada de DNA plasmidial nas células bacterianas, inoculou-se uma unidade formadora de colônia de *Escherichia coli* DH5α em 5 mL de meio Lúria. Este pré-inóculo permaneceu por 16 horas sob agitação a 37°C. Após esse período, pipetou-se 200µL do pré-inóculo em 30 mL de meio Lúria, o qual permaneceu incubado a 37°C, sob agitação até que atingisse uma densidade óptica de 0,5 a 650 nm. Após esta etapa a cultura foi resfriada em banho de água e gelo para então ser centrifugada a 5.000 rpm por cinco minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 12 mL de solução de cloreto de cálcio 100 mM estéril gelado. Este material ficou no gelo por cinco minutos antes de ser centrifugado por sete minutos a 5.000 rpm a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento, cuidadosamente ressuspenso em 4 mL de solução de cloreto de cálcio 100mM estéril e gelado, com 15% de glicerol também, estéril e gelado. Por fim, foram feitas alíquotas de 120µL deste material para que fosse armazenado no freezer a temperatura de 80°C negativos.

Para o processo de transformação foram utilizados 100µL da suspensão de células competentes e de 2 a 5 µL do DNA plasmidial. A solução obtida após ser homogeneizada foi incubada a 0°C por 30 minutos. Em seguida foi aplicado um choque térmico a 37°C por cinco minutos, ao final do qual foi adicionado 1,0 mL de meio Lúria, mantendo-se o sistema sob agitação a 37ºC por 1 hora. Uma alíquota de 100 µL deste sistema foi plaqueada em meio Lúria-ágar suplementado com 100 µL de kanamicina (10 mg/mL), 20 µL de IPTG (0,05mM) e 50 µL X-Gal (0.05%). O restante do sistema de transformação foi incubado em 5 mL de meio Luria, também suplementado com 50 µL de kanamicina. A incubação ocorreu por 16 horas a 37°C, e ao final deste período foi realizado miniprep do material inoculado em meio Lúria seguida de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

3.5 Digestão do DNA plasmidial e purificação de fragmentos de DNA a partir do gel de agarose

Os sistemas de digestão foram preparados com água bidestilada, DNA, enzima de restrição e seu respectivo tampão, conforme instruções dos fabricantes. Após eletroforese em gel de agarose os fragmentos de interesse foram purificados segundo metodologia de SAMBROOK *et al*. (1989).

3. 6 Ensaio de estabilidade plasmidial

Baseado no método de SUMMERS & SHERRATT (1984), células de E. coli contendo o plasmídeo de interesse forma inoculadas em meio Lúria, suplementado com kanamicina, e incubados a 37°C durante a noite. 5µl dessa cultura foram transferidos para 5 mL de meio Lúria sem antibiótico e alíquotas foram plaqueadas em meio Lúria-ágar 1,5% (p/v) suplementado com kanamicina e também no mesmo meio porém sem o antibiótico. O restante da cultura foi mantido a 37°C por 24 horas, sob agitação de 150 rpm. Esse procedimento foi repetido durante cinco dias, com inoculações e plaqueamentos realizados a cada 24 horas.

3. 7 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Foram utilizados *primers* desenhados para amplificar fragmentos associados aos genes de virulência *inv*A, *spv*C, *sef*C, *pef*A, via PCR, segundo metodologia proposta por MC PHERSON (1991).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através de testes sorológicos e provas bioquímicas, o material proveniente de carcaças de frango foi identificado como *Salmonella sp*. Essas amostras, após crescimento em Lúria bertani foram submetidas à extração de DNA plasmidial e análise em gel de agarose 1% (p/v). Das 14 amostras, 08 apresentavam DNA plasmidial, o equivalente a 57 % do total. Em trabalho realizado por MENDES (2007) com 50 amostras obtidas de carcaças de frangos de um abatedouro industrial e que continham *Salmonella sp,* 43 apresentaram plasmídeos, o equivalente a 86% do total. Os dados obtidos no presente trabalho concordam com os dados descritos por outros

pesquisadores.

O material plasmidial presente nas 08 amostras apresentaram uma ampla variedade de tamanhos, sugerindo a presença de plasmídeos diferentes. Dentre essas amostras duas foram escolhidas para realização das etapas seguintes.

Foram selecionados dois isolados para caracterização de seus plasmídeos. Esses isolados foram selecionados pois apresentavam um perfil plasmidial sugerindo a presença de um único tipo de plasmídeo. Os plasmídeos extraídos foram denominados pRVB1 e pRVB2. Para dar início a caracterização dos plasmídeos foi realizada a digestão com diferentes enzimas de restrição. As enzimas utilizadas e a presença de sítios de restrição presentes nos plasmídeos testados constam no Quadro 1.

Quadro 1: Presença de sítios de enzimas de restrição nos plasmídeos pRVB1 e pRVB2.

ENZIMA	SÍTIO DE RESTRIÇÃO	DIGESTÃO DO pRVB1	DIGESTÃO DO pRVB2
Ava I	C ↓YCGRG	+	+
Bam HI	G↓GATCC	-	-
Eco RI	G↓AATTC	-	-
Eco RV	GAT↓ATC	+	-
Hae III	GG↓CC	+	-
Hinc II	GTY↓RAC	-	+
Hind III	A↓AGCTT	-	-
Hinf I	G↓ANTC	+	
Kpn I	GGTAC↓C	+	+
Nde I	CA↓TATG	-	-
Pvu II	CAG↓CTG	+	-
Pst I	CTGCA↓G	+	+
Sau 3AI	↓GATC	+	+
Sma I	CCC↓GGG	-	-
Ssp I	AAT↓ATT	-	-
Sty I	C↓CWWGG	-	-
Xho I	C↓TCGAG	-	+

A análise das digestões por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) mostrou que os plasmídeos pRVB1 e pRVB2 são diferentes entre si, uma vez que o perfil de digestão foi diferente para cada plasmídeo.

Dando prosseguimento ao trabalho de caracterização os plasmídeos pRVB1 e pRVB2 foram digeridos com a enzima de restrição **Pst**I. Os plasmídeos digeridos com **Pst**I foram subclonados no plasmídeo pUC18 digerido com a mesma enzima. Os plasmídeos resultantes dessa subclonagem foram utilizados para transformar células de *E. coli* DH5α. Foram obtidos 06 clones recombinantes, sendo 01 do pRVB2 e 05 do pRVB1. Os plasmídeos recombinantes foram extraídos e digeridos com enzima de restrição **Pst**I para liberação do inserto clonado. A Figura 1 mostra o perfil de restrição dos plasmídeos obtidos.

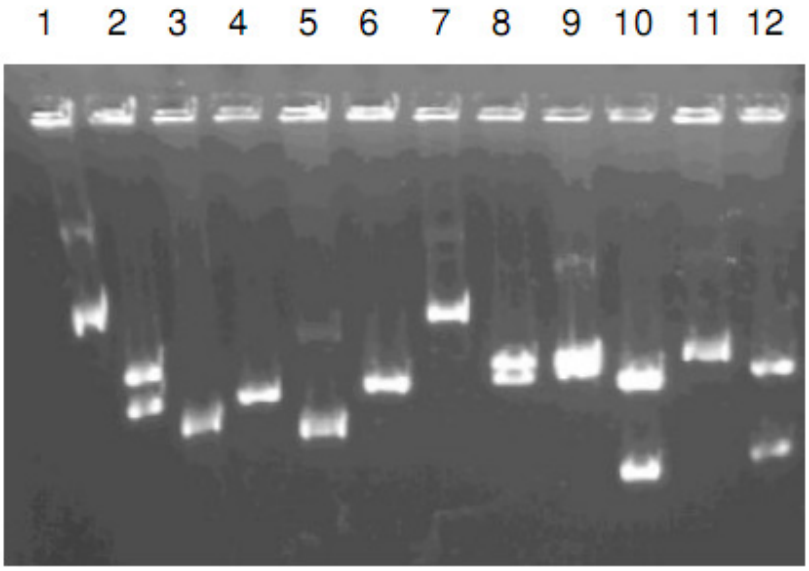


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose da digestão dos plasmídeos recombinantes utilizando a enzima de restrição **Pst**I. 01- clone 01 (pRVB2) intacto, 02 - clone 01/**Pst**I (pRVB2), 03 - clone 01 (pRVB1) intacto, 04- clone 01/**Pst**I (pRVB1), 05- clone 02 (pRVB1) intacto, 06- clone 02/**Pst**I (pRVB1), 07 clone 03 (pRVB1) intacto, 08- clone 03/**Pst**I (pRVB1), 09- clone 04 (pRVB1) intacto, 10- clone 04/**Pst**I (pRVB1), 11- clone 05 (pRVB1) intacto, 12- clone 05/**Pst**I (pRVB1).

Os clones recombinantes provenientes do plasmídeo pRVB1 apresentaram insertos com tamanhos diferentes (Fig.1, raias 4, 6, 8 e 10). A presença de diferentes

insertos sugere que no isolado de onde foi extraído o pRVB1 poderia conter mais de um plasmídeo ou que o material poderia estar contaminado com DNA cromossomal. Nos trabalhos desenvolvidos por MENDES (2007), GREGOROVA *et al*. (2004), RYCHLIK *et al*. (2006) foi demonstrado a presença de mais de um plasmídeo em diferentes isolados de *S. enterica*.

Genes de virulência são aqueles que contribuem para habilitar o organismo a provocar doença. Fatores de virulência são as proteínas codificadas por estes genes. Os genes de virulência podem ser encontrados no cromossomo bacteriano ou em plasmídeo, a parte do genoma que codifica esses genes é denominada de ilha de patogenicidade ou de virulência. Em Salmonella é comum a presença de genes de virulência em plasmídeos. No trabalho de SANTOS (2007) foram testadas as 43 amostras que apresentaram plasmídeos no trabalho desenvolvido por MENDES (2007). No trabalho de SANTOS (2007) foram utilizados primers que amplificam os genes de virulência: *inv*A, *spv*C, *sef*C, *pef*A, envolvidos na patogenicidade de *Salmonella sp*. Todos os 04 genes foram encontrados nas amostras testadas. Algumas das amostras apresentaram todos os genes de virulência testados. Os dados obtidos por SANTOS (2007) mostraram que é comum a presença de genes de virulência em plasmídeos extraídos de *Salmonella sp.* isoladas de carcaça de frango.

As amostras obtidas dos clones escolhidos foram utilizadas para testar a presença dos genes de virulência estudados por SANTOS (2007). As duas amostras amplificaram os todos de virulência testados (Quadro 4). Os plasmídeos recombinantes obtidos foram testados para saber se os insertos que carregavam continham os genes de virulência estudados. Os resultados obtidos estão mostrados no Quadro 2.

Quadro 2: Amplificação do Material Plasmidial com os genes de virulência *inv*A, *spv*C, *sef*C e *pef*A.

PRIMMERS	PLASMÍDEO pRVB1	PLASMÍDEO pRVB2	CLONE pRVB2a	CLONE pRVB1b	CLONE pRVB1d	CLONE pRVB1e	CLONE pRVB1f
*inv*A	+	+	-	-	-	+	+
*spv*C	+	+	+	+	-	-	+
*sef*C	+	+	-	-	-	+	+
*pef*A	+	+	-	-	-	-	-

Os dados mostrados no Quadro 2 confirmam os resultados obtidos na avaliação do tamanho dos insertos (Fig. 1) que mostrou que se tratavam de insertos diferentes. Os plasmídeos recombinantes obtidos contêm os genes *inv*A, *spv*C e *sef*C. Nenhum dos plasmídeos recombinantes amplificou o gene *pef*A, apesar desse gene ter sido detectado nas amostras originais. Esse dado reforça a hipótese de haver mais de um plasmídeo nas amostras iniciais.

Muitos plasmídeos isolados de *Salmonella sp*. apresentam a capacidade de se replicar autonomamente em células de *E. coli*. Para testar se os plasmídeos originais possuíam a capacidade de se replicar autonomamente em células de *E. coli*, os plasmídeos foram digeridos com enzima de restrição **Pst**I e ligados ao gene de resistência à kanamicina purificado do plasmídeo pUC4K.

O gene de resistência a kanamicina foi obtido a partir da digestão do vetor de clonagem pUC4K com a enzima **Pst**I, resultando em dois fragmentos visualizados em eletroforese em gel de agarose a 1%. Um dos fragmentos possuía 2.700 pb, enquanto o outro, referente ao gene de resistência a kanamicina, possuía 1.100 pb. Este fragmento foi então purificado a partir do gel de agarose. Para a inserção do gene de resistência à kanamicina nos plasmídeos pRVB1 e pRVB2 previamente digeridos com **Pst**I realizou-se um sistema de ligação com a enzima T4 DNA ligase. Em seguida foi feita a transformação de células *E. coli* DH5α utilizando como material exógeno o sistema de ligação citado.

Foram obtidos clones resistentes à kanamicina a partir do pRVB2, mas não foram obtidos clones resistentes utilizando pRVB1. Os dados obtidos mostraram que o plasmídeo pRVB2 possui uma origem de replicação funcional em células de *E. coli*. Quanto ao pRVB1 não houve transformantes. Tal resultado sugere que o pRVB1 não apresenta origem de replicação funcional em células de *E. coli* ou que o sítio para a enzima **Pst**I fique localizado na origem de replicação desse plasmídeo, o que tornaria impossível sua replicação em células de E.coli quando houvesse a inserção do gene de resistência a kanamicina no sítio de **Pst**I.

Demonstrado que o pRVB2 continha uma origem funcional em células de *E. coli*, foi testada a sua estabilidade nessa célula. Os ensaios de estabilidade plasmidial, baseados no método de método de SUMMERS & SHERATT (1984) foram realizados

por mais de 240 gerações (5 dias). Mais de 90% das células viáveis no quinto dia apresentavam o plasmídeo pRVB2 mostrando que esse plasmídeo apresenta uma grande estabilidade em células de *E. coli.* Como controle foram utilizadas células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pUC18 que é instável. Após 01 dia de crescimento sem pressão seletiva (ampicilina) apenas 14% das células carregavam o plasmídeo.

Uma vez que o gene de resistência à kanamicina havia sido inserido no plasmídeo a ser caracterizado, partiu-se para a inserção de um gene repórter. O gene escolhido foi o gene codificante da α-amilase de *Bacillus subtilis* presente no plasmídeo pAC2009 (BATAUS, 1991). O plasmídeo pAC2009 foi digerido com enzima de restrição **Pvu**II e o fragmento contendo o gene da α -amilase foi purificado. O plasmídeo pRVB2k (contendo o gene de resistência a kanamicina) foi digerido com a enzima de restrição **Hinc**II, purificado e misturado ao fragmento contendo o gene de α -amilase e tratados com a enzima T4 DNA ligase, seguindo-se a transformação.

Os clones transformantes foram plaqueados em meio Luria-ágar contendo 1% de amido. Após incubação a 37ºC durante aproximadamente 15 horas, as placas foram coradas com vapor de iodo. Não foi detectado nenhum clone expressando o gene de α -amilase. O fragmento purificado do plasmídeo pAC2009 apresenta o gene de α -amilase sob controle do promotor *plac*. Se fosse obtida a inserção desse fragmento no pRVB2k seria esperado a expressão da atividade amilolítica. Como não foi detectada tal atividade, pode-se inferir que o sítio de **Hinc**II localiza-se em alguma região importante para a replicação desse plasmídeo, como por exemplo estar situada no meio da origem de replicação.

O plasmídeo recombinante pUC18/pRVB2 foi submetido à seqüenciamento automático utilizando oligonucleotídeos complementares à seqüência do pUC18. As seqüências obtidas foram analisadas utilizando programas disponíveis em www.bioinformatica.ucb.br. As seqüências obtidas foram utilizadas para fazer uma busca por homologia utilizando o programa BLAST disponível no site www.ncbi.nlm.nih.gov .

Foi encontrada homologia com os plasmídeos: pSL254 isolado de *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Newport str. SL254; pGY1 isolado de Salmonella *paratyphi*. O plasmídeo pRVB2 apresentou 99% de identidade com esses plasmídeos.

O plasmídeo pSL254, com número de acesso CP001112, apresenta 3.605 pb, quatro possíveis proteínas conservadas foram propostas pelos pesquisadores que caracterizaram esse plasmídeo. O plasmídeo pGY1 apresenta 3.592 pb, com número de acesso EF150947, três possíveis proteínas foram propostas por Huang *et al*. (2009).

Os dados obtidos sugerem que o pRVB2 é muito semelhante aos plasmídeos pSL254 e pGY1, uma vez que apresenta tamanho semelhante ao tamanho desses plasmídeos, os quais também foram isolados de Salmonella.

```
pGY1            GTTATTTTCGCAAGGCGTTTCGGCAAAATAGCCTTCAATAAGTTGAGAAGTGAGGGGGTT
pSL254          GTTATTTTCGCAAGGCGTTTCGGCAAAATAGCCTTCAATAAGTTGAGAAGTGAGGGGGTT
pRVB02          GTTATTTTCGCAAGGCGTTTTGGCAAAATAGCCTTCAATAAGTTGAGAAGTGAGGGGGTT
                ********************* ****************************************

pGY1            CTGGCTGTAACTATAGCAAATGCGTTTGGTAATAAAGTTGATGAAAGCTTAACCAGGTTG
pSL254          CTGGCTGTAACTATAGCAAATGCGTTTGGTAATAAAGTTGATGAAAGCTTAACCAGGTTG
pRVB02          CTGGCTGTAACTATAGCAAATGCGTTTGGTAATAAAGTTGATGAAAGCTTAACCAGGTTG
                ************************************************************

pGY1            TCGAGGGTGGTTCAGGGTT-CTTTGTCCATTGAAAAGCATCCAGATGAGTTGCTTCAGAT
pSL254          TCGAGGGTGGTTCAGGGTT-CTTTGTCCATTGAAAAGCATCCAGATGAGTTGCTTCAGAT
pRVB02          TCGAGGGTGGTTCAGGGNTTCTTTGTCCATTGAAAAGCATCCAGATGAGTTGCTTCAGAT
                ***************** * ************************************

pGY1            GGTTAAAGATCTGGAGTCTGTTTCTGGAGAGAATGGCAATTTGAGAGGGTATGTTTTTGA
pSL254          GGTTAAAGATCTGGAGTCTGTTTCTGGAGAGAATGGCAATTTGAGAGGGTATGTTTTTGA
pRVB02          GGTTAAAGATCTGGAGTCTGTTTCTGGAGAGAATGGCAATTTGAGAGGGTATGTTTTTGA
                ************************************************************

pGY1            GCTTTTTGTATCCTCGCAAATTTCTAATTTTTATGGCCTTGG-TAATATTTACATTAATA
pSL254          GCTTTTTGTATCCTCGCAAATTTCTAATTTTTATGGCCTTGG-TAATATTTACATTAATA
pRVB02          GCTTTTTGTATCCTCGCAAATTTCTAATTTTTATGGCCTTGGGTAATATTTACATTAATA
                ****************************************** ****************

pGY1            GAGAGTATAAGATAAATGGTAAGCATGCAGAAGCTGATGTTGTATTGGAGAGTAGTGACG
pSL254          GAGAGTATAAGATAAATGGTAAGCATGCAGAAGCTGATGTTGTATTGGAGAGTAGTGACG
pRVB02          GAGAGTATAAGATAAATGGTAAGCATGCAGAAGCTGATGTTGTATTGGAGAGTAGTGACG
                ************************************************************

pGY1            ATATTTATATAATAGAGTGCAAAAATGTTAAGGTCTTACCTTCAACTGAACTTACGCGTT
pSL254          ATATTTATATAATAGAGTGCAAAAATGTTAAGGTCTTACCTTCAACTGAACTTACGCGTT
pRVB02          ATATTTATATAATAGAGTGCA----------------------------------------
                *********************
```

Figura 2: Alinhamento das seqüências dos plasmídeos pRVB2, pSL254 e pGY1.

Quando a sequência completa do plasmídeo pRVB2k estiver disponível, será possível escolher algum sítio onde possa ser efetuada a clonagem do gene repórter, sem que inviabilize a replicação do plasmídeo recombinante.

5 CONCLUSÕES

Foram estudadas 14 amostras de *Salmonella enteretidis*, dessas 08 apresentaram plasmídeos, perfazendo um total de 57%. Dois isolados apresentando plasmídeos de pequeno porte foram selecionados para caracterização molecular. Os plasmídeos isolados foram denominados de pRVB1 e pRVB2. Utilizando digestão com diferentes enzimas de restrição foi possível determinar que os dois plasmídeos são diferentes entre si. Subclonando o gene de resistência à kanamicina no sítio de **Pst**I do pRVB1 e pRVB2 foi possível determinar que o pRVB2 apresenta uma origem de replicação funcional em células de *E. coli*. Além de ser funcional, essa origem de replicação permite que pRVB2 se mantenha estavelmente em células de *E. coli*. Os plasmídeos pRVB1 e pRVB2 apresentaram genes de virulência, e foram amplificados os quatro genes testados: *inv*A, *spv*C, *sef*C e *pef*A. Para manipular geneticamente o pRVB2 será necessário obter a sequência completa de nucleotídeos desse plasmídeo, para que inserção de novos elementos, tais como promotores, sítios de clonagem e gene repórter possa ser efetivada em regiões do plasmídeo que não sejam fundamentais para sua replicação, transformando este plasmídeo em um vetor de interesse biotecnológico. O plasmídeo pRVB2 apresenta homologia com os plasmídeos pSL254 e pGY1.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, J. L. (1998). **Genética de microrganismos**. 232-235

BATAUS, L. A. M. (1991). **Construção de um vetor de seleção de promotores (VSP) para *Escherichia coli*.** Tese de mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

GREGOROVA, D.; Matiasovicova, J.; Sebkova, A.; Faldynova, M.; Rychlik, I. **Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis harbours ColE1, ColE2, and rollingcircle- like replicating plasmids.** Can. J. Microbiol. 50: 107.112 , 2004.

HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MUHLDORFER, I.; TSCHAPE, H. (1997) - **Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution**. Molecular Microbiology, 23:1089-1097.

KRETOVÁ, M.; SZENES, T.; LACO, J.; *et. al.* **Analysis of replication region of the cryptic plasmid pAG20 from Acetobacter aceti 3620.** Biochemical and Biophysical Research Communications 328 (2005) 27–31, 2005.

LENHINGER, A. L. (2006). **Lenhinger Principles of Biochemistry**, **9**: 308-310.

MC PHERSON, M. J.; QUIRKE, P. ; TAYLOR, G. R. (1991). PCR: **A Pratical Approach.** Oxford University, New York; p1:14.

MENDES, P. V. C. (2007). **Isolamento e caracterização parcial de um plasmídeo extraído de Salmonella spp isolada de carcaças de frangos abatidos em frigorífico fiscalizado pelo serviço de inspeção federal no município de Rio Verde – Goiás**. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás, p-60.

MURRAY, P. R.; Drew, W. L.; Kobayashi, G. S & Thompson, J. H. (1990). **Medical Microbiology**, **9**: 76-78.

RYCHLIK, I.;GREGOROVA, D.; HRADECKA, H. (2006) **Distribution and function of plasmids in Salmonella enterica**. Veterinary Microbiology 112:1-10.

SAMBROOK, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). **Molecular cloning- A Laboratory Manual.** 2ED. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

SANTOS, C. Y. (2007) **Caracterização de fatores de virulência em isolados de *Salmonella* spp obtidos de carcaças de frangos na região de Rio Verde – GO**. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás, p-72.

SUMMERS, D. K. & SHERRAT, D. J. (1984**). Multimerization of high copy number plasmids causes instability:** ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. Cell. 36: 1097-1103.

YAGURA, M.; NISHIO, S. Y. ; KUROZUMI, H.; *et. al*. **Anatomy of the Replication Origin of Plasmid ColE2-P9.** Journal of Bacteriology, 188 (03): 999–1010, 2006.

Os Mecanismos de Transferência do Conhecimento na Relação Universidade - Empresa: o caso do Programa de Incubadoras da UFG (PROINE/UFG)

Natalia Paranaíba Ferreira, Suely Henrique de Aquino Gomes.
Faculdade de Comunicação e Biblioteconomia
E-mail: nataliaferreira231@hotmail.com; suelyhenriquegomes@gmail.com.

Palavras-chave: Transferência de Conhecimento. Inovação. Incubadora de empresas. Universidade-Empresa. Tríplice-Hélice.Competitividade.

INTRODUÇÃO

O século XXI tem sido marcado pelas diversas modificações ocasionadas na sociedade, provocada principalmente pela globalização, pela velocidade das informações compartilhadas, pela redefinição de tempo e espaço, pela descoberta do virtual e do digital. Diante desta realidade, o cotidiano das pessoas e conseqüentemente o ambiente em que vivemos tem sofrido alterações.

Estamos vivenciando novos paradigmas, que surgem com os novos ciclos científicos, econômicos e tecnológicos, e provocam mudanças: sociais, comportamentais e culturais nas pessoas e nas organizações. E a principal tese é que a inovação é quem provoca esses ciclos. (TARAPANOFF, 2001)

Atualmente à inovação e a competitividade são essenciais na estruturação das políticas de desenvolvimento. Em estudos realizados nos países mais desenvolvidos, estima-se que a inovação é responsável por 80% a 90% do crescimento da produtividade. Sabendo-se também que o aumento da produtividade responde por mais de 80% do crescimento econômico, tornando a inovação essencial para ampliar as oportunidades de ganhos econômicos e sociais. (QUANDT, 2004)

A inovação tecnológica torna-se uma questão essencial que se coloca à empresa, à universidade e ao Estado. Constitui para a empresa a busca pela competitividade; para a universidade maior participação junto à sociedade e para o Estado desenvolvimento econômico e social. Deste modo, as relações que se estabelece entre essas três esferas têm como objetivo primeiro inovar. (FLORES, 2005)

Com o reconhecimento da importância da interação entre essas três esferas o papel desempenhado pelos sistemas de Ciência e tecnologia (C&T) passa a ser valorizado e visto como fator chave na construção de vantagens competitivas, o que gera à crescente ação dos governos nacionais para estimular o desenvolvimento tecnológico. Que de acordo com Adriano Dias (*apud* MOTA) "incentivar o desenvolvimento tecnológico faz, então, parte das medidas defensivas que o governo de um país periférico pode adotar para compensar parcialmente as desvantagens dos capitais de seus agentes nacionais".

No Brasil, o fechamento prematuro de empresas tem sido uma das preocupações da sociedade, particularmente para as entidades que desenvolvem programas de apoio ao segmento de pequeno porte, principalmente as Micro e Pequenas empresas – MPEs. Conforme pesquisas recentes do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequena Empresas – SEBRAE, "60% das empresas criadas, não sobrevivem aos primeiros quatro anos de existência", fato que provoca instabilidade na economia regional com forte impactos na economia nacional. (REDE GOIANA DE INCUBADORAS, 2006, p.3)

O cenário se torna mais preocupante quando se tem em mente a importância das MPES na economia nacional. Segundo Cubillo (1997), a pequena empresa e a média empresa (PME) "é considerada hoje um dos atores chave do desenvolvimento". Em números, são "cerca de 4 milhões de empresas constituídas; 60% da oferta de empregos formais; 42% dos salários pagos; 21% da participação no PIB; 96,3% do número de estabelecimentos" (ALVIM, 1998).

Apesar da significativa participação da pequena empresa na economia brasileira, elas ainda apresentam baixa capacidade de inovar e competir no mercado globalizado. Soares (1994, p. 31 *apud* FLORES, 2005), com base em pesquisa realizada pelo SEBRAE, aponta que apenas 10% das empresas brasileiras de pequeno porte fazem pesquisas sobre as expectativas do consumidor. Segundo o autor, isso compromete o processo de introdução da inovação e a própria competitividade da empresa.

No intuito de superar os obstáculos à competitividade, uma possibilidade é aproximar a universidade das empresas com o fito de facilitar o processo de transferência de conhecimento e assim propiciar a capacitação tecnológica dessas empresas, uma vez que, no contexto brasileiro, as universidades públicas ainda são as grandes produtoras do conhecimento científico e tecnológico.

Mota (1999) também ressalta em seus estudos a necessidade desta aproximação entre universidade-empresa para desencadear o processo de inovação e aumentar a competitividade. Em que cabe ao Estado criar condições para que esta interação ocorra, de forma que aumente a competitividade do setor empresarial. Segundo a autora, a estabilidade das interações ocorre à medida que as vantagens percebidas pelas universidades e empresas superarem, significativamente, o esforço inicial.

No Brasil, esta parceria entre universidade, empresa e governo é ainda pequena e a incubadora é um dos caminhos utilizados para estreitar os laços entre estas entidades. As incubadoras permitem acelerar o processo de desenvolvimento empresarial assegurando uma taxa de sucesso de negócios bem acima das taxas comuns de insucessos. Existem incubadoras de diferentes tamanhos e formas ofertando uma grande variedade de apoios, serviços e consultorias para os empreendedores.

Dentre os diversos tipos de incubadoras, as incubadoras universitárias são consideradas como o tipo mais importante, por terem a capacidade de gerar e transferir conhecimentos, principalmente os resultantes de pesquisa científica, para utilização nas organizações e aplicação no mercado (CARVALHO, 2000 *apud* FROIS, PARREIRAS, 2004).

Para desenvolver os estudos de interação entre U-E, Dagnino utiliza o argumento da “Hélice Tripla” também chamada de “argumento HT”, onde governo, universidade e empresa se unem em prol do desenvolvimento econômico e tecnológico nacional. (DAGNINO, 2003).

Segundo Medeiros (1992) com a tríplice hélice, novos arranjos sociais estão sendo criados, sendo eles: Núcleos de inovação tecnológica, Pólos tecnológicos, Centros de modernização empresarial e Incubadoras de empresas.

Destarte os inúmeros resultados positivos obtidos até o momento com o processo de interação, os desafios na consolidação da relação U-E ainda são inúmeros. Dentre eles, como aponta Mota (1999) esta a falta de comunicação interinstitucional, e é na perspectiva dessa discussão que este projeto se propõe a analisar os mecanismos de transferência de conhecimento na relação Universidade - Empresa, tendo como estudo de caso as Pequenas e Medias Empresas (PMES) integrantes do Programa de Incubação de Empresas da UFG (PROINE), que tem como missão estimular a criação e apoiar o desenvolvimento de empresas

inovadoras e competitivas, desenvolvendo mecanismos que contribuam para o sucesso dos empreendimentos e para o desenvolvimento econômico-social sustentável.

Neste sentido, a presente proposta estrutura-se a partir da seguinte questão central: Como se da à transferência de conhecimento na relação U-E, no caso do PROINE/UFG?

Desdobrando-se a questão, pergunta-se:

- Que tipo de cooperação é estabelecida entre U-E?
- Qual a importância dessa parceria?
- Porque as empresas optaram pela parceria com a universidade?
- A Universidade é vista como uma importante fonte de informação cientifica e tecnológica para as empresas incubadas?
- Quais são os principais fatores intervenientes no processo de cooperação?
- Como avaliam a efetividade dos mecanismos de transferência do conhecimento e da colaboração na capacitação tecnológica?

2 OBJETIVOS

2.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho é analisar como se dá o processo de transferência do conhecimento na relação Universidade-Empresa via PROINE/UFG.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Identificar porque fizeram a opção pela incubação;
b) Conhecer qual a relevância da parceria;
c) Analisar como se da à interação entre U-E;
d) Identificar as atividades tecnológicas desenvolvidas pelas empresas em parceria com a universidade;
e) Identificar os mecanismos de atualização e capacitação tecnológica utilizadas pelas empresas incubadas;
f) Identificar os fatores intervenientes no processo de transferência do conhecimento.

3 METODOLOGIA

Um dos elementos fundamentais para a condução de qualquer trabalho cientifico é a escolha metodológica, que se constitui na seleção de procedimentos sistemáticos e/ou estratégias de pesquisa para descrição e explicação de uma determinada situação de estudo.(CALAZANS, 2007).

Em termos metodológicos, a pesquisa é descritiva e qualitativa, sob a forma de estudo de caso de PMES participantes do programa de incubação da UFG (PROINE/UFG). O estudo de caso tem na análise de conteúdos um dos mecanismos apropriados para tratar os dados coletados. Serão levantados dados primários e dados secundários para a consecução dos objetivos propostos.

Primeiramente foram levantados dados secundários, de forma a verificar na literatura o que já havia sido escrito e estudado sobre o tema, de forma a possibilitar domínio e compreensão dos principais conceitos envolvidos no estudo. Esses dados foram obtidos por meio de livros, revistas especializadas, periódicos, *Internet*, editais para o projeto de incubação, teses, dissertações entre outros.

Num segundo momento foi feita à coleta dos dados primários, essa etapa foi dividida em duas fases. A primeira fase foi composta por documentos que nos possibilitou conhecer e caracterizar o PROINE, as atividades desenvolvidas na relação U-E e os principais atores envolvidos no processo. E a partir disso passamos para a segunda fase, que compreendeu a elaboração do roteiro de entrevista com dirigentes do nível estratégico das organizações, com os gestores do programa de incubação e com os professores.

E nesta etapa de elaboração do roteiro de entrevista algumas dificuldades foram encontradas, tendo-se a necessidade de voltar na literatura.

4 CONCLUSAO

A importância do conhecimento como principal insumo para o sucesso econômico dos países e das empresas, vem requerendo uma aproximação cada vez maior, do setor produtivo com as universidades, onde as atividades de pesquisa tornaram-se fundamentais para a capacidade de inovar das empresas. (REMIRO et al, 2008).

O reconhecimento por parte do setor produtivo de que as universidades são as grandes geradoras de conhecimento e informações essenciais à inovação tecnológica, tem estimulando a criação de um número cada vez maior de micro e pequenas empresas, para desenvolver novos produtos e processos, mediante parques tecnológicos, incubadoras de empresas e escritórios de transferência de tecnologia. (BAETA, 1997 *apud* REMIRO et al, 2008)

Tem-se então de acordo com os autores um novo modelo de geração de empresa baseado simultaneamente no conhecimento e no empreendedorismo: as incubadoras de empresas surgem na segunda metade do século XX a começar pelo EUA. Atualmente o Estado Americano conta com o maior número de incubadoras do mundo, estando integradas numa grande rede nacional e cujo numero cresce significativamente a cada ano (ANPROTEC, 2003). Já na Europa Ocidental as incubadoras são consideradas principalmente como instrumentos de estímulo à inovação tecnológica e também apresentam grande evolução no seu crescimento.

Na América Latina, bem como no Brasil, essa interação entre a universidade e a empresa vem sendo edificada muito lentamente. A abertura da economia, a competitividade global, as alterações na sociedade brasileira, as recentes e constantes mudanças no ambiente empresarial, modificando valores culturais e promovendo novas relações de produção determinaram a necessidade de novos arranjos e pactos entre essas dimensões. (REMIRO et al, 2008)

No entanto, quando uma empresa decide adotar, entre outras estratégias empresariais, pela interação com universidades, diversos são os elementos envolvidos no processo e que devem ser entendidos e aceitos pelas partes (PLONSKI, 1998 *apud* FLORES, 2005).

Flores (2005) em seus estudos ressalta que a cooperação pode ocorrer de diversas maneiras e através dos mais diversos mecanismos, sendo que normalmente a empresa apresenta desafios e solicitações, mas em contrapartida, oferece investimentos e a possibilidade de desenvolvimento de tecnologia em parceria, sendo esse o benefício mais aparente para a universidade que, por sua vez, oferece informação tecnológica, desenvolvimento de novos produtos/processos, educação continuada, cursos extraordinários, consultorias e mão de-obra capacitada sendo, esses os benefícios mais imediatos para a empresa.

Para viabilizar a interação entre Universidade-Empresa o autor apresenta os principais mecanismos de interação:

a) Relações pessoais informais. Ocorrem quando a empresa e uma pessoa da universidade efetuam trocas, sem que qualquer acordo formal, que envolva a universidade seja elaborado. Por exemplo: as consultorias individuais, a publicação de pesquisas, trocas informais em fóruns e workshops;

b) Relações pessoais formais. São como as relações pessoais informais, só que com a existência de acordos formalizados entre a universidade e a empresa como trocas de pessoal, estudantes internos e cursos sanduíche;

c) Terceira parte. Surge um grupo intermediário. Estas associações que intermediarão as relações podem estar dentro da universidade, serem completamente externas, ou ainda estarem em posição intermediária. Como exemplo: as associações industriais, institutos de pesquisa aplicada, unidades assistenciais gerais e uniemp;

d) Acordos formais com alvo definido. São relações nas quais ocorre tanto a formalização do acordo como também a definição dos objetivos específicos de colaboração, como: as pesquisas contratadas, treinamento de trabalhadores e projetos de pesquisa cooperativa;

e) Acordos formais sem alvo definido. São acordos formalizados como no caso anterior, mas cujas relações possuem maior amplitude com objetivos estratégicos e de longo prazo. Por exemplo, patrocínio de P&D industrial em departamentos universitários;

f) Criação de estruturas focalizadas. São as iniciativas de pesquisa conjuntamente conduzidas pela indústria e a universidade em estruturas permanentes específicas criadas para tal propósito como os contratos de associação, consórcios de pesquisa universidade-empresa e incubadoras.

Segundo Porto (2000 *apud* FLORES, 2005) independente do tipo da relação através da qual se desenvolve a cooperação recomenda fortemente a necessidade de existência de um gerenciamento do processo, considerando que a complexidade aumenta do tipo de relação “a” para “f”.

Ao analisar os principais desafios gerenciais para a cooperação empresa-universidade tornar-se uma relação transformadora, é necessário perceber expectativas e missões distintas, porém complementares, da empresa e da universidade no processo de inovação.

Assim, o processo de interação entre U-E se inicia quando surge interesse de ambas as partes em trabalharem juntas. Essa disposição permite que os primeiros

encontros e contatos ocorram e que se esbocem as primeiras ações para a efetivação do processo. Esta etapa inicial de acordo com Segatto-Mendes (2001) envolve a existência de motivações que impulsionam as duas entidades a buscarem e prosseguirem no processo e expectativas que justificam este andamento.

A autora também coloca e aponta expectativas distintas entre as universidades e empresas. As universidades esperam conseguir, como comenta Prager & Omenn (1980, p. 380 *apud* SEGATTO-MENDES, 2001), com esta conexão:

a) Suporte mais descomplicado para pesquisas de longo prazo;

b) Auxílio da empresa para a formação de novos conhecimentos úteis;

c) Ampliação da experiência educacional;

d) Surgimento de tópicos para dissertações e oportunidades potenciais de emprego para estudantes;

e) Possibilidade de interação com cientistas engenheiros industriais;

f) Acesso aos equipamentos especializados da empresa.

Já as empresas possuem expectativas como:

a) As universidades serão fontes adicionais de idéias, conhecimentos e tecnologias, os quais são bases potenciais para novos produtos e processos;

b) Um alto benefício de rateio de custo quando comparado com construir unidades de pesquisa;

c) A proximidade com cientistas competentes;

d) A possibilidade da conexão com uma fonte potencial de executores de pesquisas fiéis às necessidades da empresa.

Desta forma, o processo se inicia cercado de idéias daquilo que se acredita ser possível obter da cooperação e isto envolve acesso a financiamentos, conhecimentos, equipamentos, oportunidades, experiências, estímulos e economias que podem tornar o processo tanto um conglomerado de desejos e interesses que tornam a pesquisa frutífera e estimulante, quanto um conjunto de objetivos e fins desconexos, que deveriam ter sido claramente explicitados e confrontados anteriormente para que se obtivesse o equilíbrio necessário e a

adequada dosagem de interesse de cada parte. Em seus estudos, a autora apresenta uma relação das motivações para o início do processo de cooperação existentes tanto por parte das universidades, como por parte das empresas.

Motivações para as Universidades:

a) Realização da função social da universidade;

b) Obtenção de conhecimentos práticos sobre os problemas existentes;

c) Incorporação de novas informações aos processos de ensino e pesquisa;

d) Obtenção de recursos financeiros adicionais;

e) Obtenção de recursos materiais adicionais;

f) Prestígio para o pesquisador;

g) Divulgação da imagem da universidade.

E as empresas têm como motivações:

a) Acesso aos recursos humanos altamente qualificados das universidades;

b) Resolução de problemas técnicos que geraram a necessidade da pesquisa;

c) Redução de custos e riscos envolvidos em projetos de P&D;

d) Acesso a novos conhecimentos desenvolvidos no meio acadêmico;

e) Identificação de alunos para recrutamento futuro.

Essas motivações permitem observar a contribuição da interação U-E para o desenvolvimento tecnológico do País, satisfazendo ao mesmo tempo as necessidades e deficiências de dois segmentos distintos da sociedade, complementando-os e fornecendo-lhes fontes e instrumentos de estímulos e ação para a obtenção do conhecimento cientifico necessário para o crescimento das duas entidades. (SEGATTO-MENDES, 2001)

Destarte as inúmeras vantagens percebidas a aliança de dois mundos aparentemente distantes, com objetivos, visões e tempos muito diferentes tem gerado grandes desafios a serem superados, como o diálogo entre Universidade e Empresa. (REMIRO et al, 2008).

Como também aponta Mota (1999) um dos maiores desafios a ser superado é a falta de comunicação interinstitucional:

> à falta de canais de comunicação que levem em consideração as diferenças de linguagens entre acadêmicos e empresários acaba acentuando a desvinculação entre a oferta e a demanda de tecnologia e propicia o desperdício de conhecimentos e tecnologias que poderiam ser de interesse social.

Com base na citação da autora compreendemos que o conhecimento produzido pelas universidades geralmente é de difícil compreensão para os empresários e/ou seus funcionários devido à complexidade da linguagem, dificultando a absorção e a utilização deste conhecimento. Os mecanismos e canais utilizados para a socialização deste conhecimento na maioria das vezes estão voltados para os próprios pares, ou seja, outros cientistas.

No entanto, a transferência de conhecimento científico e tecnológico é complexo, sendo necessário desenvolver uma linguagem/terminologia compreensível a seus receptores para obter um melhor entendimento e para que a transferência de conhecimento ocorra de fato, de maneira eficiente e eficaz. Na realidade, é uma relação bastante complexa, pois se sustenta na aceitabilidade de suas diferenças.

5 REFERENCIAS

ALVIM, Paulo César Rezende de Carvalho. O papel da informação no processo de capacitação tecnológica das micro e pequenas empresas. **Ciência da Informação**, Brasília, v. 26, n. 01, p. 28-85, jan./abr. 1998.

CALAZANS, Angélica Tofffano Seidel. Estudo de caso: uma estratégia de pesquisa. In: MUELLER, Suzana Pinheiro Machado (Org.). **Método para pesquisa em Ciência da Informação**. Brasília: Thesaurus, 2007. Cap. 2.

CUBILLO, Julio. La inteligencia empresarial em las pequenas y medianas empresas competitivas de América Latina – algunas reflexiones. **Ciência da Informação**, Brasília, v. 26, n. 03, p. 260-267, set./dez. 1997.

DAGNINO, Renato. A relação universidade-empresa no Brasil e o "Argumento da Hélice Tripla". **Revista Brasileira de Inovação**, v. 2, n. 2, Jul./Dez.2003.

FLORES, Marcio José das. **Contribuições da Cooperação Universidade - Empresa para a Capacitação Tecnológica De PME´S Moveleiras:** o Pólo de Arapongas**.** 2005. 150 f. Dissertação (Mestrado em Administração) - Centro de Pesquisa e Pós-Graduação em Administração, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

QUANDT, Carlos O. Inovação em clusters emergentes. **Com Ciência**, n.57,ago.2004.

MOTA, T. L. N. G. Interação Universidade-Empresa na Sociedade do Conhecimento: Reflexões e Realidade. **Revista Ciência da Informação**, Brasília - DF, 1999.

REMIRO, Mariluz da Silva Leal et al. O papel da incubadora de empresas no processo de transferência de conhecimento/tecnologia: o caso da Universidade federal Fluminense. In: CONGRESSO NACIONAL DE EXELENCIA EM GESTAO. jul. 2008.

REDE GOIANA DE INCUBADORAS. **Informativo**. Goiás, 2006. 8 p.

SEGATTO-MENDES, A. P. **Teoria de agência aplicada à análise de relações entre os participantes dos processos de cooperação tecnológica universidade-empresa.** São Paulo, 2001. Tese (Doutorado em administração) - Departamento de administração, FEA-USP.

TARAPANOFF, Kira. Referencial teórico: introdução. In: TARAPANOFF, Kira (Org.). **Inteligência organizacional e competitiva**. Brasília, DF: Ed.da UNB, 2001.

TARAPANOFF, Kira (Org.) **Inteligência organizacional e competitiva**. Brasília, DF: Ed.da UNB, 2001.

Planejamento de redes de distribuição de energia elétrica com restrições geográficas

Icaro Felipe Borges Sena e Leonardo da Cunha Brito
Escola de engenharia elétrica e de computação, Universidade federal de Goiás,
Goiânia – GO 74605 – 010, Brasil.
E-mails: icaro_culula@hotmail.com e brito@eeec.ufg.br

Palavras – chaves: Triangulação de Delaunay, restrições geográficas, meta heurística simulated Anneling (SA), redes de distribuição de energia elétrica (RDEE).

Introdução

Neste documento é apresentado projetos de redes de distribuições de energia elétrica onde procuramos o caminho mais curto, ou seja, economicamente mais satisfatório. No planejamento da RDEE (redes de distribuição de energia elétrica) tem-se que levar em consideração as condições geográficas da região onde vai ser implantada tal RDEE para que se possam evitar obstáculos naturais (relevo muito acidentado), pois eleva o custo da obra e até mesmo evitar com que a linha passe por reservas naturais, reservar indígenas, propriedades privadas e etc.

No projeto de uma RDEE, ao desviar dos possíveis obstáculos citados, também é necessário escolher um caminho mínimo visando uma maior economia. Para tanto, usam-se as meta heurísticas, que são um conjunto de técnicas de otimização para lidar com problemas complexos e que apresentam características de explosão combinatória. As metas heurísticas são baseadas na suposição de que o espaço de busca é absurdamente grande e que não é possível visitar todas as possíveis soluções do problema (ROMERO, MOTOVANI el al., 2004).

Dentre as meta heurística escolhemos a SA (simulated Anneling) que é baseada no processo de fabricação de cristais perfeitos e faz uma analogia com o processo natural chamado anneling na busca da solução ótima para um determinado problema. Nesse processo o material é aquecido até uma temperatura elevada e depois resfriado lentamente, mantendo durante o processo o chamado quase equilíbrio termodinâmico. O processo para quando o material atinge seu estado de energia mínima, no qual se transforma em um cristal perfeito (ROMERO, MOTOVANE et al., 2003; SARAMAGO et al., 2003).

Devido ao alto custo de planejamento de um RDEE desta magnitude, que envolve uma grande quantidade de variáveis, resultando em um problema combinatório tal que justifique o uso de ferramentas computacionais que sejam eficazes e eficientes. Portanto neste trabalho foi utilizada a SA para planejar um RDEE considerando as restrições geográficas dos locais a ser implantada de maneira a aperfeiçoar a relação custo beneficio do projeto.

2. Objetivos

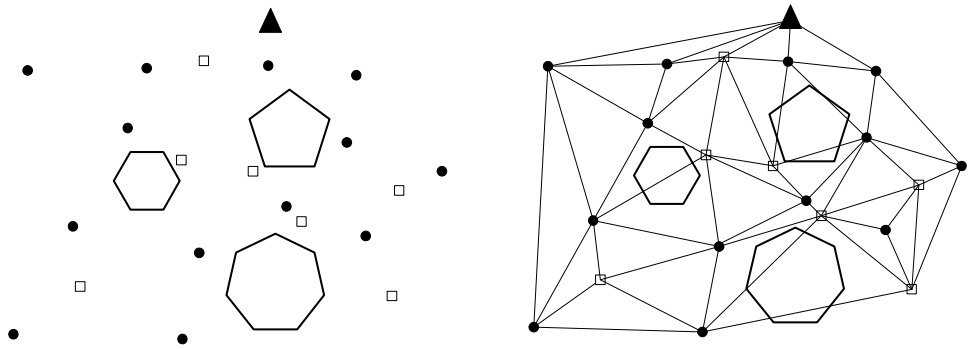
Neste trabalho foi proposto uma nova ferramenta para implantar um RDEE considerando os possíveis obstáculos geográficos. Através dos possíveis caminhos fornecidos pela triangulação Delauney e considerando as restrições geográficas do local onde se deseja implantar a nova rede, com a meta heurística Simulated Anneling (SA) é possível encontrar uma boa solução para uma nova RDEE em relação à heurística para encontrar a solução inicial. O SA foi aplicado devido à sua principal característica: aceita movimentos de piora durante o processo de busca, o que eleva a probabilidade de se encontrar o mínimo global do problema.

Deve-se notar que, no método proposto, não se consideraram as restrições elétricas do problema, as quais podem ser avaliadas por meio de um simulador de fluxo de potência.

3. METODOLOGIA

O planejamento de uma RDEE de maneira ótima deve levar em consideração a localidade das estações, dos consumidores e dos obstáculos cuja passagem da linha de energia torna o custo do projeto mais elevado (MASUD et al. 1974). A Figura 1(a) ilustra uma visão aérea de parte de um local em que deve ser planejada uma RDEE, onde o triangulo representa a estação de distribuição, as circunferências representam os consumidores e os polígonos representam os obstáculos. Na tentativa de minimizar os custos do projeto da rede de distribuição. Foram adicionados pontos auxiliares randômicos, representados por quadrados na Figura 1(a).

Para descobrir os possíveis caminhos da rede de distribuição de energia elétrica foi utilizada a triangulação de Delaunay que conecta pontos vizinhos (KALLMANN, BIERI, e THALMANN et al., 2003), conforme visto na Figura 1(b).



(a) (b)

Figura 1 – Triangulação do problema (a) Problema exemplo (b) Triangulação Delaunay

Para evitar que a RDEE tenha caminhos que passem pelos obstáculos, o que elevará o custo do projeto, após a triangulação de Delaunay foi utilizada a seguinte técnica de atribuição de pesos às arestas que possuem pontos dentro dos polígonos de restrições recebem pesos maiores que as arestas que não possuem (Figura 2).

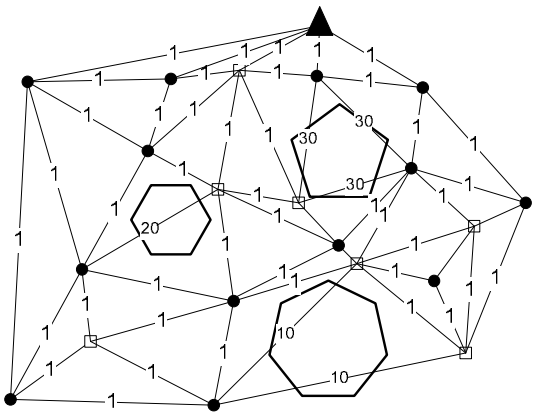


Figura 2 – Arestas com pesos

A atribuição de pesos diferenciada para as arestas visa penalizar, posterior em um processo da otimização, trajetórias que possuem pontos contidos nos polígonos de modo a determinar dentre os possíveis caminhos, aqueles que melhor atendem a

RDEE considerando a relação custo/benefício. O processo de otimização a ser utilizado será o algoritmo Simulated Annealing.

3.1 Simulated Annealing (SA)

O SA foi o primeiro algoritmo de otimização baseado em um processo físico, inventado por Cerny (1985) e Kirkpatrick (1983), e inicialmente só solucionava problemas simples. Aplicações de SA em problemas complexos só vieram acontecer de forma intensa na década de 90 (SARAMAGO et al., 2003). O SA é baseado no aquecimento e no resfriamento de uma substância para obter uma estrutura cristalina. Nesse processo os valores da função objetivo representam os níveis de energia do sistema físico e a meta de minimizá-la. Portanto um metal é aquecido em um banho quente a altas temperaturas, tal que o aumento da temperatura até valor alto causará um choque violento entre seus átomos, constituindo assim o processo de recozimento (Annealing). Na temperatura de Annealing todo o material encontra-se na fase líquida e as partículas arrumam-se aleatoriamente, e se resfriado de forma brusca, a microestrutura tende a um estado aleatoriamente estável, permitindo que todas as partículas se arrumem no estado de menor energia dessa estrutura. Se o metal é resfriado de forma suficientemente lenta, o sistema procurará um ponto de equilíbrio com uma microestrutura ordenada e estável (ROMERO, MONTOVANO et al. 2004; SARAMAGO et al., 2003).

A solução inicial é denotada por X_{inic} e nos referimos à X_{melhor}, X_{atual} e X_{novo} para representar a melhor solução, a corrente e a nova solução obtida a partir de solução corrente. Os valores das funções objetivo para as soluções inicial, nova, melhor e corrente são denotados por Z_{inic}, Z_{novo} Z_{melhor} Z_{atual}, respectivamente. A partir da solução corrente X_{atual} pode-se obter uma nova solução X_{novo} através de uma busca aleatória na vizinhança da solução corrente, denominada $BUSCA(X_{atual})$, sendo para cada vizinhança um novo valor de Z_{novo} é calculado.

Se a diferença entre Z_{novo} e Z_{atual} for negativa a nova solução é aceita. Em tal caso, é feita uma verificação para identificar se a nova solução é a melhor encontrada até o momento. Por outro lado, a diferença entre Z_{novo} e Z_{atual} for positiva, a nova solução será aceita com uma probabilidade que diminui com a temperatura corrente T. Um número uniformemente distribuído no intervalo [0, 1) é gerado para

decidir se a nova solução será aceita. A forma algorítmica do SA é mostrada na Figura 3.

Algoritmo Simulated Annealing (X_{inic}, Z_{inic}, T_{inic});
Inicio
$X_{melhor} \leftarrow X_{atual} \leftarrow X_{inic}$
$Z_{melhor} \leftarrow Z_{atual} \leftarrow Z_{inic}$
$T_k \leftarrow T_{inic}$
Repete
Para i = 1 **até** REPmax **faça**
$X_{novo} \leftarrow$ BUSCA(X_{atual})
$\Delta (Z_{novo}, Z_{atual}) = (Z_{novo} - Z_{atual})$
Se $\Delta (Z_{novo}, Z_{atual}) < 0$
$X_{atual} \leftarrow X_{novo}$
Se $Z_{novo} < Z_{melhor}$
$X_{melhor} \leftarrow X_{novo}$
$Z_{melhor} \leftarrow Z_{novo}$
Fim-se
Senão
Se exp $\{\Delta (Z_{novo}, Z_{atual}) / T_k\} >$ Rand [0,1)
$X_{atual} \leftarrow X_{novo}$
Fim-se
Fim-se
Fim-para
$T_{k+1} \leftarrow .f(T_k)$
Até Condição parada satisfeita
Retorna X_{melhor}, Z_{melhor}
Fim

Figura 3 – Algoritmo AS

A temperatura inicial (T_{inic}) é fornecida através da equação (1).

$$T_{inic} = \frac{\mu}{-\ln(\phi)} * f(x_{inic}) \qquad (1)$$

Em que é aceita ϕ % das vezes uma solução que é μ % pior que a função objetivo da solução inicial $f(x_{inic})$ durante o primeiro nível de temperatura (ROMERO, MONTOVANI et al., 2004).

A temperatura varia a cada interação conforme a equação (2)

$$T_{k+1} = \frac{T_k}{1 + \frac{\ln(1+\delta)T_k}{3\partial(T_k)}} \qquad (2)$$

Em que $\partial(T_k)$ é o desvio padrão das funções objetivo das configurações geradas no nível de temperatura T_k e δ é a taxa variável, onde $\delta \in$ [0.01; 0.20] (ROMERO, MONTOVANI et al., 2004). A cada nível de temperatura um número normalmente fixo de soluções é gerado e avaliado. Este número é denominado fator de repetição (REPmax). O valor desta repetição deve ser suficientemente alto, principalmente no início, para permitir que boas soluções sejam encontradas em cada nível de temperatura. O processo continua até que a condição de parada seja satisfeita. Neste ponto o algoritmo retorna com a melhor solução encontrada e o valor da função objetivo para este problema.

3.1.1 Solução Inicial

O critério utilizado para encontrar a solução inicial (X_{inic}) é mostrado na Figura 4. Primeiramente são ligados todos os consumidores diretamente á estação de distribuição, o que seria a pior solução. Isto pode ser visualizado na Figura 4(a). Posteriormente, obtém-se o consumidor mais distante da estação (CD) (Figura 4(a)), e é calculado o ponto mais próximo de CD (PP) (ponto auxiliar ou outro consumidor – Figura 4(a)). Através do cálculo mostrado na equação (3) é definida qual aresta permanece: se é a ligação entre CD e a estação ou se é a ligação entre CD e o PP.

$$\begin{aligned} DD_{CD} &= 2 * D_{CD} \\ SD_{CDPP} &= D_{CD} + D_{PP} \end{aligned} \qquad (3)$$

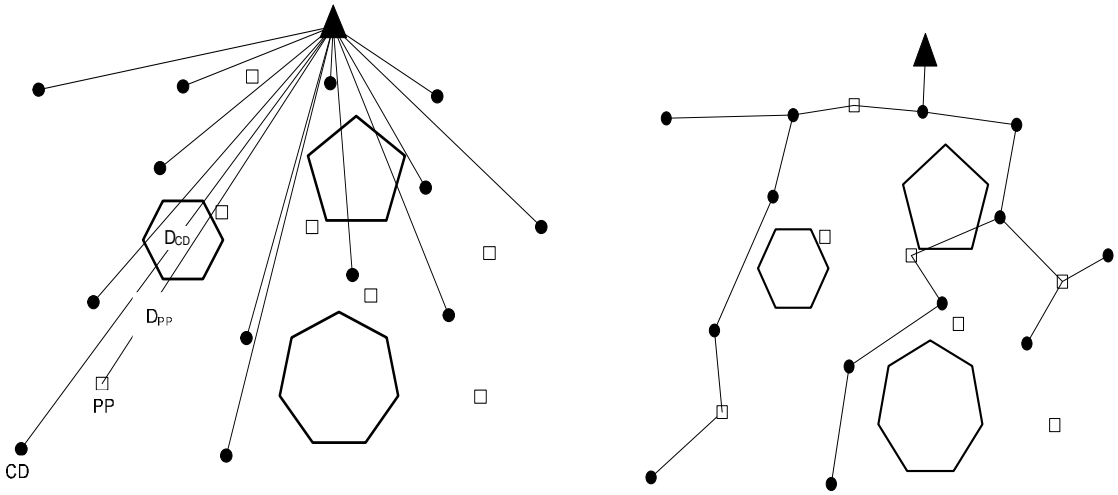
Onde,

- D_{CD} é a distancia entre CD e a estação (figura 4(a));
- D_{PP} é a distancia entre o PP e a estação (figura 4(a));
- DD_{CD} é o dobro da distância D_{CD};
- SD_{CDPP} é a soma das distancias D_{CD} e D_{PP}.

Se DD_{CD} for maior que SD_{CDPP} então se retira à aresta entre CD e a estação e coloca a aresta entre CD e PP. Na iteração posterior, CD passa a ser o próximo

consumidor mais distante da estação e assim por diante até que todos os consumidores sejam testados. Quando um ponto PP escolhido for auxiliar, calcula-se o ponto mais próximo deste até que se encontre um consumidor.

Na Figura 4(b) observa-se a solução inicial para o exemplo abordado.



(a) (b)

Figura 4 – Método para solução inicial (a) pior solução e (b) solução final

3.1.2 Vizinhança

O vizinho é encontrado pela adição de uma ou mais arestas à solução corrente formando, assim, um ciclo conforme visualizado na Figura 5(a). As arestas adicionadas devem pertencer à trajetória definida pela triangulação de Delaunay.

Após a formação do ciclo, é calculado o valor da função objetivo considerando a retirada uma a uma das arestas pertencentes ao ciclo. Não é considerada a retirada das arestas que foram incluídas para completar o ciclo. A exclusão da aresta que apresentar o menor valor da função objetivo passa a ser a solução vizinha da solução corrente. Quando uma aresta excluída tiver em uma de suas extremidades um ponto auxiliar e este ponto auxiliar tiver apenas arestas que fazem parte do ciclo, então a outra aresta que faz parte do ciclo deverá também ser excluída. A Figura 5(b) representa a solução vizinha da solução inicial da Figura 4(b).

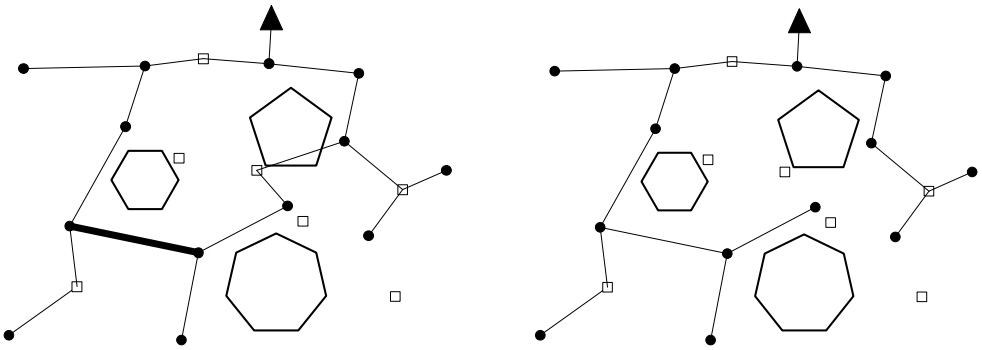


Figura 5 – Configuração do vizinho (a) demonstração do ciclo e (b) vizinho da solução inicial

3.2 Função objetivo

O objetivo deste trabalho é planejar uma rede de distribuição de energia de maneira ótima considerando as restrições geográficas. Com isso a função objetivo visa minimizar o custo do projeto considerando o comprimento total dos cabos utilizados com os respectivos pesos para cada aresta, conforme a Equação (4).

$$\text{Minimizar} \sum_{k=1} \{\sqrt{[(x_{k1} - x_{k2})^2 + (y_{k1} - y_{k2})^2]} * peso[p_{k1}, p_{k2}]\} \quad k = 1, 2, \ldots, M \qquad (4)$$

Onde,

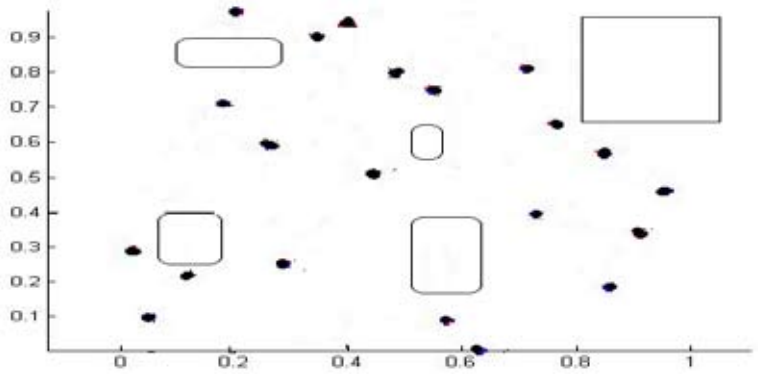
- M é a quantidade de arestas de uma solução;
- x são os pontos cartesianos x de cada vértice que compõe a aresta k;
- y são os pontos cartesianos y de cada vértice que compõe a aresta k;
- $peso[p_{k1}, p_{k2}]$ é o peso atribuído à aresta k.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

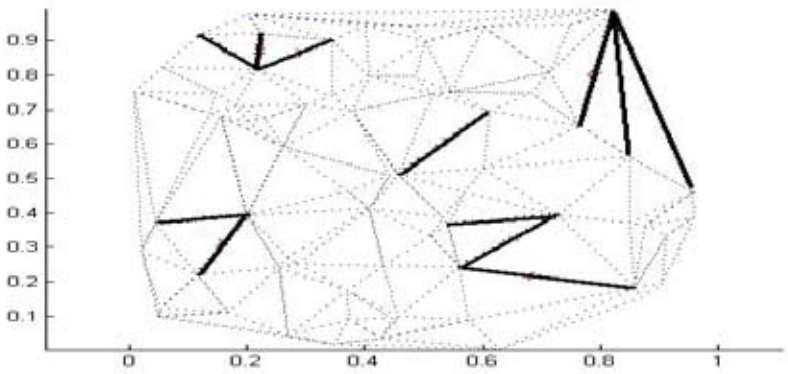
Os resultados foram obtidos a partir das posições geográficas de 20 consumidores, representados por círculos, e uma estação de distribuição, representada pelo triângulo, conforme ilustra a figura 6(a). Na temperatura inicial T_{inic} implementada pretende-se aceitar em ϕ = 13% das vezes, soluções cujas funções

objetivo são até μ = 1 % piores que a função objetivo da solução inicial cujo valor é igual a $f(X_{inic})$ (KIRKPATRICK, GELATT, VECCHI et al., 1983). Na Figura 6(b) observa-se os possíveis caminhos que um consumidor pode estabelecer para ser ligado à estação de distribuição. As arestas destacadas na Figura 6(b) representam os caminhos que passam pelos polígonos de restrições. No nosso problema consideramos o peso para estas arestas igual a infinito e para as demais arestas pesos iguais a 1.

A função objetivo implementada está descrita na seção 3.2. Na solução inicial (Figura 7), implementada como descrito na seção 3.1.1, a função objetivo produz um valor de 4,97 km. Com essa solução inicial foi executado o algoritmo SA, descrito na seção 3.1. Através de testes realizados em laboratório, definiram-se os seguintes valores para os parâmetros de calibração do SA: a cada nível de temperatura *REPmax* foi estabelecido um valor igual a 40 iterações e a condição de parada foi um número fixo de 200 iterações. A temperatura variou conforme a equação (2) considerando a taxa de variação δ = 0.05. A melhor solução, cujo valor da função objetivo é 3,31km, pode ser visualizada na Figura 8.



(a)



(b)

Figura 6 – Problema implementado (a) Disposição espacial e (b) Possíveis caminhos

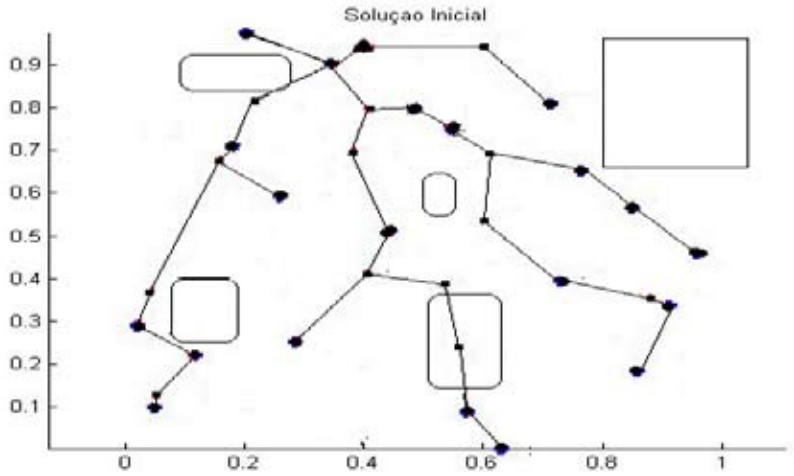


Figura 7 – Solução inicial do problema

Esta mesma configuração do problema foi executada 20 vezes para medir a eficiência do algoritmo em encontrar a solução ótima. A Figura 9 apresenta o gráfico das 20 curvas, descrevendo o comportamento do SA em diferentes execuções para a mesma configuração do problema. O gráfico mostra o custo da função objetivo para cada iteração do SA.

Pode-se observar que em todas as execuções o valor da função objetivo obtido na solução inicial decresce rapidamente, aproximadamente na iteração 20 podemos encontrar a solução ótima ou senão uma próxima da ótima.

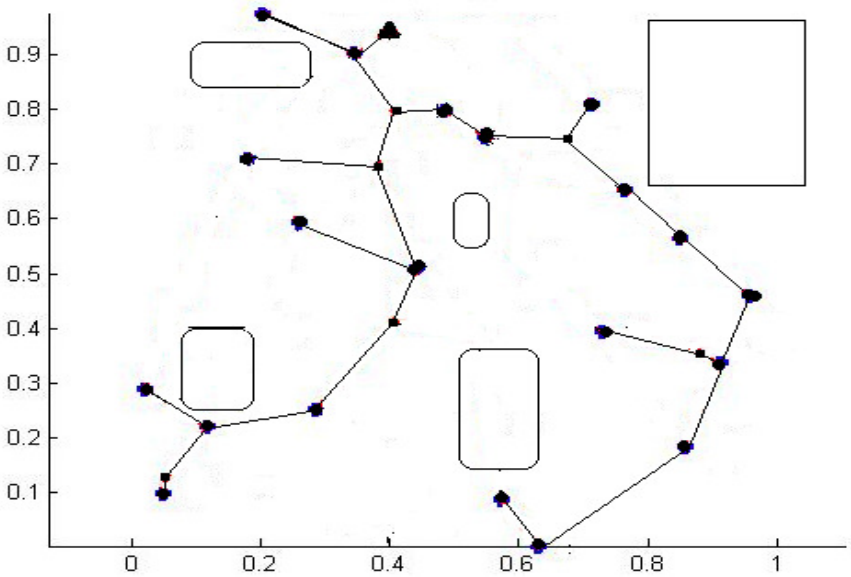


Figura 8 – Melhor solução

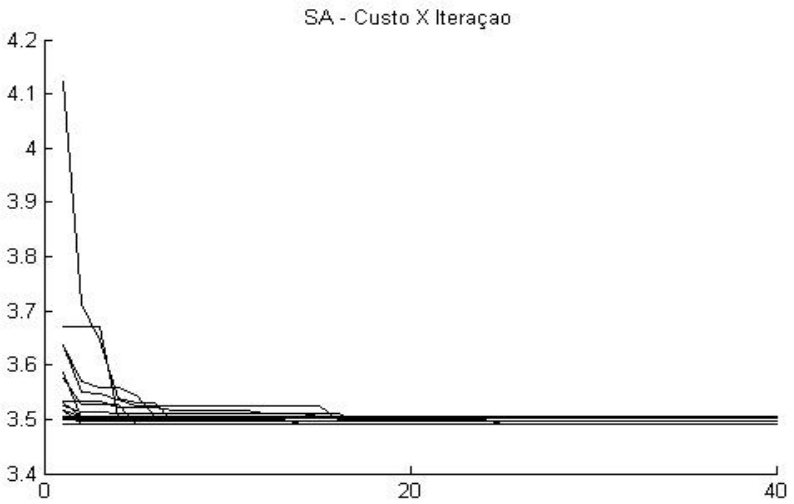


Figura 9 – Desempenho do AS

5. Conclusões

Foi estudado e implementado as diversas técnicas de configuração do SA. Pode-se observar que o algoritmo SA implementado obteve um bom comportamento para resolver problemas de planejamento de RDEE com restrições geográficas, proporcionando uma economia de 33,4% no comprimento total do cabo utilizado (3,31 km) em relação à solução inicial (4,97 km).

Referências bibliográficas

V. Cerny, **A thermodynamical approach to the traveling salesman problem: an efficient simulation algorithm.** *J.* Optimiz. Theory App. 45:41–55, 1985.

K. S. Hindi and A. Brameller, Design of low-voltage distribution networks: **A mathematical programming method. Proceedings of the IEE**, 124(1):54–58, 1977.

S. Jonnavithula and R. Billington, Minimum cost analysis of feeder routing in distribution system planning. **IEEE Trans. on PD**, pages 1935–1940, 1996.

M. Kallmann, H. Bieri and D. Thalmann, Fully Dynamic Constrained Delaunay Triangulations. **In: Geometric Modelling for Scientific Visualization**, Brunnett, G., Hamann, B., Mueller, H., Linsen, L. (Eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2003. pp. 241-257. ISBN 3-540-40116-4.

S. Kirkpatrick, C. D. Gelatt, M. P. Vecchi, **Optimization by Simulated Annealing**, Science, v.220, n. 4598, p.671-680, 1983.

E. Masud, An interactive procedure for sizing and timing distribution substations Using optimization techniques. **IEEE Transactions on Power Apparatus and Systems**, 93(5):1281–1286, 1974.

R. Romero, J. R. S. Mantovani, Introdução às metas heurísticas. **Anais do 3º Congresso Temático de Dinâmica e Controle da SBMAC**, Campus de Ilha Solteira, 31maio a 3-junho, 2004.

S. F. Saramago. **Métodos de otimização randômica**: algoritmos genéticos e "*Simulated Annealing*". Anais do SBMAC, São Carlos SP, 2003.

Avaliação da resposta imune celular através da produção do óxido nítrico de bovinos naturalmente infectados por tuberculose *(Mycobacterium bovis)*.

Hidelbrando Ricardo Domeneguete Amaral, Ana Paula Junqueira Kipnis
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG
e-mail: bando007747@hotmail.com

Palavras chave: tuberculose bovina, macrófago, óxido nítrico.

1. Introdução:

A tuberculose bovina (TB bovina) é uma zoonose de distribuição mundial e sua prevalência é maior nos países em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos a enfermidade encontra-se em fase avançada de controle e/ou erradicação devido a programas de inspeção de carnes e pasteurização do leite. Segundo estimativas realizadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) 30 milhões de pessoas morreram de tuberculose na década de 1990 (WHO, 1994; ABRAHÃO, 1999).

Uma das preocupações da OMS foi à considerável importância em saúde pública, da infecção do *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) no ser humano e em animais (WHO, 1994). Avalia-se que mais de 50 milhões de bovinos ao redor do mundo estejam infectados pelo *M. bovis*, resultando em uma perda econômica aproximada de U$ 50 bilhões (GRANGE JM, 2001). De acordo com LIU et al. (2005), na China a tuberculose pulmonar ativa afeta cerca de 4,5 milhões de pessoas, destas 5-10% são causadas pelo *M. bovis.* KANTOR et. al (2008) relataram casos na América Latina, sendo o maior número de casos de humanos infectados por *M. bovis* relatado na Argentina onde a média percentual de casos causados pelo *M. bovis* variou de 0,34% para 1,0%, conforme a região estudada. O mesmo autor também relatou que a doença tem diminuído tanto em pacientes imunocompetentes como naqueles imunodeprimidos (pacientes HIV positivos) devido aos programas de sanidade tanto animal quando de alimentos. A infecção esta relacionada com profissionais que lidam diretamente com os animais infectados, como magarefes, tratadores e médicos veterinários (KANTOR et. al 2008).

O Brasil, um dos líderes mundiais na produção e exportação de vários produtos agropecuários, possui o maior rebanho bovino comercial do mundo e a TB

bovina está presente em todos os estados brasileiros (ROXO, 2004), apresentando prevalência de 1,3% do rebanho nacional infectado no período de 1989 a 1998 . Não há dados há cerca da infecção por *M. bovis* em humanos no Brasil (MAPA/PNCEBT).

A TB bovina é uma enfermidade crônica caracterizada por lesões granulomatosas, envolvendo principalmente o sistema respiratório e linfonodos (NEILL et al., 1994). Ao contrário de muitas doenças infecciosas que utilizam anticorpos na defesa contra o agente infeccioso (imunidade humoral), a resposta imunológica predominante nos animais infectados por *M. bovis* é realizada por linfócitos T e macrófagos (imunidade celular) (RITACCO et al., 1991). Após a contaminação natural, através da inalação de aerossol contaminado, a bactéria se replica dentro dos macrófagos alveolares, induzindo a apoptose destas células. Concomitante a este fato há recrutamento de outras células como: monócitos e linfócitos, levando a formação de células gigantes multinucleadas, gerando uma inflamação crônica com desenvolvimento de granulomas, com lesões caseosas, especialmente no parênquima pulmonar (LAQUEYRERIE et al., 1995).

A resposta imune ao *M. bovis* envolve principalmente a imunidade celular, tendo o macrófago como a célula primordial desse processo. Um dos mecanismos de citotoxicidade de macrófagos mediados por IFN-γ e TNF-α é a produção de óxido nítrico (NO) (WITTE & BARBUL, 2002). O estímulo para produção de NO pelos macrófagos e subseqüente geração de intermediários do nitrogênio são mecanismos potentes para a morte micobacteriana (DENIS, 1991).

O NO resultante da ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), possui ação citotóxica levando a morte de microrganismos. Esta citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou reação com outros compostos químicos liberados durante o processo inflamatório como íons superóxidos (O_2^-), formando um agente altamente tóxico e oxidante, o peroxinitrito ($ONOO^-$), que pode ser protonado a ácido peroxinitroso (ONOOH) dissociando-se posteriormente em dióxido de nitrogênio (NO_2), radical hidroxila e íon NO_2^+, aumentando efetivamente a ação tóxica do NO e do O_2^- (BECKMAN & KOPPENOL, 1996).

A determinação das concentrações de NO em animais naturalmente infectados por *M. bovis* pode colaborar para o entendimento da resposta imune inata e específica a este patógeno. Apesar de ser produzida principalmente por macrófagos residentes e inflamatórios a estimulação *in vitro* de células

mononucleares do sangue periférico (PBMC) com antígenos específicos de *M. bovis* pode indiretamente estimular linfócitos efetores a produzirem INF-γ e consequentemente ativar os macrófagos contidos no PBMC a produzirem NO.

2. Objetivo:

O presente trabalho propõe estudar a resposta imune celular de bovinos naturalmente infectados com *M. bovis*. Para isto quantificamos a produção de NO produzido pelo PBMC de bovinos quando estimulados com Ag85, *M. bovis* bacilo de Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG) e *M. bovis* isolado no estado de Goiás.

3. Materiais e Métodos:

3.1 Obtenção dos antígenos.

O antígeno recombinante Ag85 (Rv3804c), foi produzido pela Universidade Norte-Americana do estado do Colorado (Colorado State University) e cedido ao Laboratório de Imunopatologia de Doenças Infecciosas da Universidade Federal de Goiás mediante o convênio firmado pelo contrato de Nº NO1-AI – 75320.

O BCG (Bacilo Calmette-Guérin) liofilizado foi doado pelo Instituto Butantan-São Paulo.

O *M. bovis* foi obtido a partir de fragmentos de linfonodos submandibulares e pré-escapulares de três bovinos abatidos e autopsiados após diagnóstico positivo ao teste intradérmico de tuberculose (preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, após notificação da Agrodefesa do Estado de Goiás). O *M. bovis* foi isolado em meio *Stonebrink*. Foram usados procedimentos de identificação bioquímica e molecular, bem como características tintoriais como BAAR por coloração de *Ziehl- Neelsen* (HAAGSMA, 1995).

As culturas foram mantidas viáveis em estufa a 37^0 C em meio *Stonebrink*, com repiques a cada três meses.

3.2 Animais.

Para a realização desse experimento utilizou-se 13 fêmeas bovinas, adultas, da raça Holandesa, as quais foram reagentes ao teste intradérmico de tuberculina e seis animais fêmeas bovinas controle negativos para tuberculose, testados também pelo mesmo método.

Os animais positivos foram notificados pelo veterinário credenciado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e devidamente comunicados à AGRODEFESA-GO. Todos os bovinos eram fêmeas, com idade variando entre 29 e 84 meses e com aptidão leiteira, sendo a maioria holandesa preta e branca. Todas já haviam parido pelo menos uma vez e estavam em fase de lactação. O diagnóstico foi obtido pelo teste intradérmico comparativo utilizando PPD-M e PPD-A. Consideraram-se animais positivos para tuberculose aqueles cuja diferença das leituras entre PPD-M e PPD-A foi maior ou igual a 4 mm. Após o diagnóstico os animais foram submetidos ao abate sanitário, obedecendo portanto as normas de biossegurança e nesta ocasião observou-se a presença de lesões no trato respiratório e linfonodos adjacentes. Os dados relativos aos animais utilizados encontram-se no Quadro 1. Dentre os bovinos positivos, poucos (seis animais -35%) apresentavam lesões visíveis. A maioria dos animais não apresentou lesões compatíveis com a presença de tuberculose (Quadro 1). Nenhum dos animais apresentava sinais e sintomas de tuberculose.

3.3 Obtenção de sangue.

As amostras de sangue foram coletadas após prévia contenção mecânica dos animais e anti-sepsia da região utilizando algodão embebido em álcool iodado. As amostras sanguíneas (20mL de cada animal) foram coletadas em tubo *vacutainer*, contendo heparina, posteriormente acondicionadas em caixa isotérmicas contendo gelo e remetidas ao Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas no Instituto de Patologias Tropicais e Saúde Pública da UFG, em período inferior a duas horas.

3.4 Obtenção de PBMC (Células Mononucleares do Sangue Periférico) e Cultura Celular

O isolamento de PBMC foi processado segundo VESOSKY et al. (2004). O sangue foi centrifugado nos próprios tubos de coleta por 15 minutos a 2000 rpm a 4 ºC. Retirou-se os leucócitos com pipetas de Pasteur e as células foram transferidas para tubos falcon de 30 mL. Posteriormente acrescentou-se 25 mL de solução salina estéril a 0,09%, centrifugando nas mesmas condições que a anterior. Retirou-se o sobrenadante com pipeta de Pasteur e acrescentou-se 15 mL de tampão de lise de hemácias (NH_4Cl 155mM, $KHCO_3$ 10 mM e água para 500mL), incubando por 5 minutos a temperatura ambiente e posteriormente completou-se para 30 ml com solução salina estéril a 0,09%, centrifugando nas mesmas condições que a anterior. Após a transferência para um novo tubo de poliestireno foi adicionada salina estéril 0,09%, e os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1000 rpm a 4ºC. Após ressuspender as células em meio RPMI completo (RPMI Medium 1640 GIBCO™ 0,15% de bicabornato de sódio, 10% de soro bovino fetal, 1mg/mL de L-glutamina 2mM SIGMA®, 100 UI/ml de penicilina-estreptomicina SIGMA®, 1% de piruvato de sódio SIGMA®, 1 mg/ml de aminoácidos não essenciais 100X SIGMA®). A concentração celular para a avaliação da produção de NO foi ajustada em 10^7 células/mL. Utilizaram-se 2µg/mL do antígeno recombinante Ag85A (Figura 1),e 10 µg/mL de BCG *M. bovis* (Figura 2). As células isoladas foram incubadas em estufa de CO_2 a 5% em 37℃, durante 72 horas, para avaliação do NO. Para verificar se animais saudáveis respondiam a infecção, fez-se uma cultura apenas de macrófagos, purificados por adesão, incubando a placa com PBMC por 2 horas na estufa de CO2 5% a 37℃ e retirou-se o sobrenadante , respondo o mesmo volume com meio cRPMI, e estes foram estimulados com BCG *M. bovis* e *M. bovis* isolado de um dos animais infectados ajustados a uma densidade óptica de 0,2 (Figura 3).

3.6 Dosagem de óxido nítrico (NO).

Para avaliação da concentração indireta de NO nas placas, fez-se necessário realizar uma curva padrão com diluições seriadas de nitrato de sódio ($NaNO_2$). Nos tempos de 24h, 48h e 72 horas, 50µl do sobrenadante da cultura de células foram removidos e colocados em uma placa de 96 poços (Corning, New York 14831, USA), em quadruplicata, para quantificação do produto de oxidação estável do óxido nítrico, o nitrito. A concentração de nitrito (NO_2^-) foi mensurada pelo método colorimétrico de Griess (GREEN ET AL, 1982), por interpolação com uma curva

padrão de nitrato de sódio ($NaNO_2$) em duplicatas de 50 µL em placa de 96 poços (Corning, New York 14831, USA). A revelação foi feita através da adição de solução de Greiss (1:1) contendo 50 µL sulfanilamida a 1% e 50 µL N.naftil-etilenodiamina a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5%. Após 30 minutos à temperatura ambiente, procedeu-se a leitura utilizando um leitor ELISA (Multiskan Thermo Labsystems®) automático com um filtro de 595 nanômetros.

Após a leitura da curva padrão, confeccionou-se a equação da reta para quantificação da concentração de NO das amostras, sendo expressivas aquelas cujos valores fossem superiores a 0,85. Os dados foram analisados por meio de analise de variância e teste "t" de students. Foram consideradas significativas as diferenças com $p<0,05$.

4. RESULTADOS

Observou-se que quando o PBMC de bovinos positivos reagentes ao teste de tuberculina intradérmico, foram estimulados pelo antígeno recombinante, Ag85, valores médios encontrados foram de (6,21±3,64) para os animais infectados e de (6,28 ± 3,03) para o grupo controle, não se observando diferença significativa entre os dois grupos ($p>0,05$). A distribuição da concentração de NO estimulados pelo Ag85A encontra-se na figura 1.

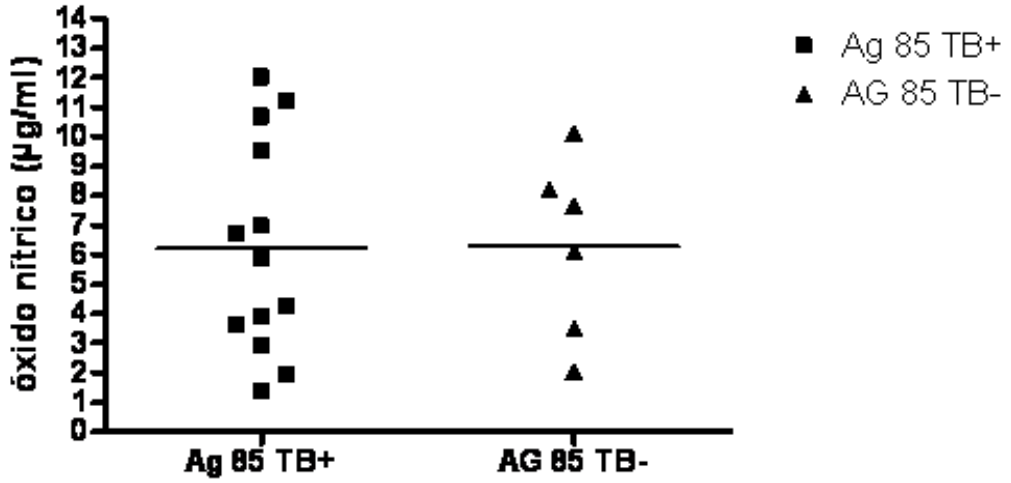


Figura 1. Distribuição da concentração de óxido nítrico, em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de bovinos positivos e

negativos para tuberculose, estimulados com Ag85, provenientes de propriedades do Estado de Goiás.

Quanto à produção de NO pelo PBMC estimulados pelo *M. bovis*-BCG, (Figura 2) não houve diferença significativa (7,53 ± 4,32) p>0,05 entre os animais tuberculose positivos (8,43 ± 7,12) e o grupo controle.

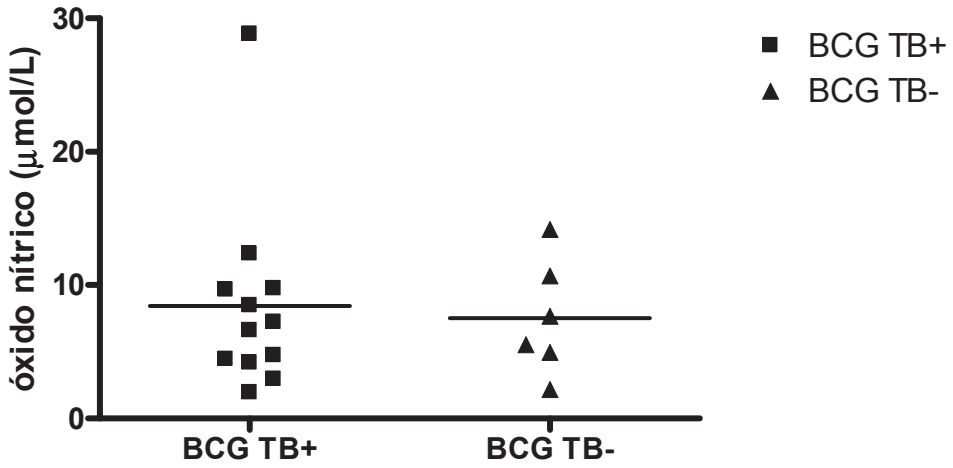


Figura 2. Distribuição da concentração de óxido nítrico, em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de bovinos positivos e negativos para tuberculose, estimulados com *M. bovis*-BCG, provenientes de propriedades do estado de Goiás.

Devido à ausência de resposta diferencial satisfatória decidiu-se verificar se macrófagos de animais saudáveis respondem produzindo NO quando desafiados com *M. bovis*-BCG e com *M.bovis* isolado de um dos animais infectados. A avaliação da cinética da infecção *in vitro* permitiu observar uma crescente produção de NO frente aos bacilos vivos (Figura 3). Com 72h de cultura houve uma produção de 24,14 ± 5,37 de NO pelos macrófagos estimulados com *M. bovis* de rua (isolado), e 18,74 ± 6,32 quando infectado com *M.bovis*-BCG.

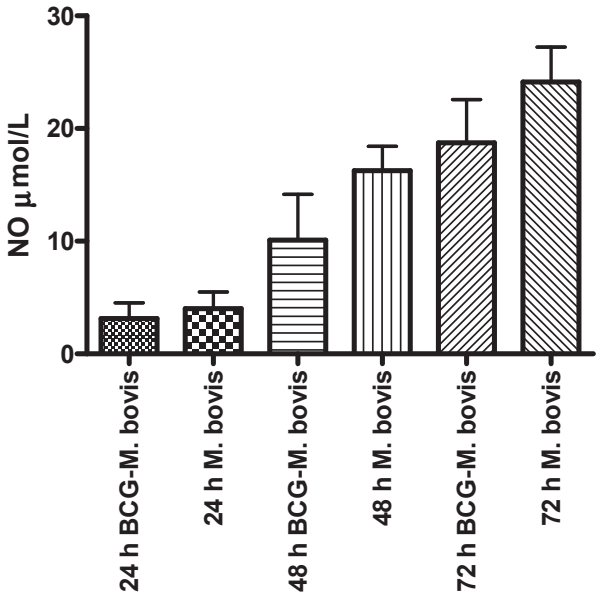


Figura 3. Distribuição da concentração de óxido nítrico, em macrófagos infectados com BCG-*M. bovis* e *M. bovis*, isolado de lesões de linfonodos de bovinos positivos ao teste de tuberculina intradérmico, provenientes de propriedades do Estado de Goiás.

QUADRO 1: Distribuição dos animais tuberculose positivos. Características gerais do histórico clínico.

Idade do Animal (meses)	**Sexo**	**Raça**	**Teste de tuberculina intradérmico (mm) [a] (*PPD-M*-PPD-A)**	**Lesões [b]**
60	F	Holandês (PC)	5,7-0,4	linfonodo subescapular e pulmão
52	F	Holandês (PC)	4,5-0,2	linfonodo subescapular
67	F	Holandês (PC)	8,8-1,0	Sem lesão visível
29	F	Holandês (PC)	9,3-1,2	Sem lesão visível
41	F	Holandês (PC)	12,1-4,8	linfonodo subescapular
56	F	Holandês (PC)	7,0-2,5	Sem lesão visível
43	F	Holandês (PC)	7,2-0,8	Sem lesão visível
40	F	Holandês (PC)	6,9-0,4	Sem lesão visível
38	F	Holandês (PC)	8,5-2,2	Sem lesão visível
58	F	Holandês (PC)	17,9-7,9	Sem lesão visível
67	F	Holandês (PC)	8,6-1,0	Sem lesão visível
50	F	Holandês (PC)	8,4-0	Sem lesão visível
55	F	Mestiço-Holandês	9,9-2,6	Lesão no pulmão e linfonodo subescapular e
84	F	Mestiço-Holandês	4,9-0,2	Extensiva aos pulmões, linfonodos submandibulres e retrofaríngeo
32	F	Mestiço-Holandês	5,3-0,6	linfonodo subescapular
56	F	Mestiço-Holandês	7,0-2,0	Sem lesão visível
38	F	Mestiço-Holandês	12,6-1,6	Sem lesão visível

[a] Teste intradérmico comparativo entre PPD de *M. bovis* (PPD-M) e PPD de *M. avium* (PPD-A).

[b] Lesões granulomatosas caseosas e/ou purulentas.

5. Discussão:

A ação microbicida do NO foi comprovada por LONG et al. (1999). As culturas de *M. tuberculosis* submetidas a tratamento com 90 ppm de NO por período de 24 h, foram reduzidas. Esse efeito do NO poderia ser utilizado em tratamento de pacientes multi droga resistente assim como método auxiliar no diagnóstico da tuberculose bovina, já que no campo da medicina veterinária, encontram-se dificuldades em detectar a enfermidade. Estudos realizados por e WATERS et al. (2003) têm demonstrado tal propósito. Porém seus trabalhos foram realizados com animais infectados experimentalmente. Em nosso estudo comparamos animais positivos ao teste de tuberculina intradérmico com animais negativos ao mesmo teste, portanto animais infectados naturalmente. Entretanto não há forma de se identificar a quanto tempo estes animais estavam infectados e em que estado estava a capacidade imune desses animais em responder a infecção, abordando desta forma períodos diferentes para a produção de NO.

A avaliação da produção de NO na presença do antígeno recombinante Ag85 foi de caráter inovador, não tendo sido encontrado relatos na literatura consultada. Outra importante observação foi à capacidade das células mononucleares de ambos os grupos de animais produzirem NO. Apesar de não haver diferença estatística o fato de o grupo controle possuir uma média mais elevada de produção de NO em relação ao grupo infectado pode indicar que os macrófagos dos animais infectados encontram-se debilitados pela infecção. Outra possível explicação seria uma possível ativação não específica do PBMC, o que poderia alterar a produção espontânea de nitrito (WATERS et al., 2003). Em bovinos esse antígeno recombinante tem sido estudado com o propósito de aplicação no diagnóstico (LILENBAUM et al., 2001).

Quanto à produção de NO pelo PBMC estimulados pelo BCG, não houve diferença significativa entre os animais tuberculose positivos e o grupo controle. De acordo com trabalho realizado por DENIS et al. (2005), os macrófagos bovinos liberaram baixa quantidade de NO quando foi realizada infecção experimental com BCG. Entretanto, em se realizando um pré-tratamento dos macrófagos com INF-γ, ocorre aumento da liberação de NO tanto em resposta ao *M. bovis*-BCG quanto ao *M. bovis.* CARPENTER et al. (1998) avaliaram a produção de

NO de macrófagos isolados de bovinos imunizados com BCG e observaram que quando comparado com o grupo controle de animais não imunizados a maior concentração de NO esteve associada a maior secreção de IFN-γ pelos linfócitos. Além disso, quando houve tratamento das culturas com inibidor de NO, houve redução da concentração dessa molécula, sem afetar a atividade metabólica do BCG, sugerindo que a síntese do NO pode constituir uma parte integral da resposta ao antígeno do *M. bovis*. Neste trabalho não houve diferença na produção de NO entre os animais tuberculose positivo e os controle. Isto se deve provavelmente ao fato de utilizarmos extrato protéico total que contêm diversas moléculas que são capazes de induzir a ativação de macrófagos via Receptores Tipo Toll (TLRs) (por exemplo: mananas aderidas às proteínas) gerando a produção de NO independente da origem destas células, se de animais positivos ou negativos.

Quando macrófagos de animais saudáveis foram infectados com *M. bovis* de rua (provenientes de um dos animais positivos), houve uma produção maior de NO, este resultado foi estatisticamente superior ao observado quando os macrófagos foram infectados com *M.bovis*-BCG (Figura 3). Esses resultados podem inferir numa possível maior virulência do *M. bovis* recém isolado quando comparado com o *M. bovis*-BCG. A provável explicação para a menor produção de NO pelos macrófagos infectados com *M. bovis*-BCG é devido ao fato de que o *M. bovis*-BCG foi obtido a partir de uma cepa patogênica de *M. bovis*, após 230 passagens seriadas em laboratório, tornando-se uma cepa de baixíssima virulência em comparação com o *M. bovis* isolado. Devido a esta baixa virulência, tem-se utilizado como vacina contra a tuberculose em humanos (SKEIKY & SADOFF, 2006) e experimentalmente em animais (BUDDLE et al., 1995).

6. Conclusão:

A produção de NO em bovinos naturalmente infectados por tuberculose apresenta-se elevada na presença Ag85, e BCG, no entanto, não há discriminação entre estes e o grupo controle. Os antígenos Ag85 e BCG estimulam a produção de NO nos animais positivos e negativos para o teste de tuberculose da mesma forma. A infecção dos macrófagos de animais saudáveis mostrou que estes respondem com maior produção de NO ao estimulo do *M. bovis* de rua do que os desafiados com *M.bovis*-BCG.

7. Referências:

ABRAHÃO, R.M.C.M. Tuberculose causada pelo *Mycobacterium bovis:* considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. **Arch Vet Scienc,** v.4, n.1, p.5-15, 1999.

BECKMAN, J.S., KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide and peroxintrite: the good, the bad and the ugly. **Am. J. Physiol.** v.271, p.1424-1437, 1996.

BUDDLE, B.M., LISLE, G.W., PREFFER, A., ALDWELL, F.E. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. **Vaccine, Kidlinton**, v.13, p.1123-1130, 1995.

CARPENTER, E., FRAY, L., GORMLEY, E. Antigen-specific lymphocytes enhance nitric oxide production in *Mycobacterium bovis* BCG-infected bovine macrophages. **Immunology and Cell Biology,** Adelaide, v.76, n.4, p.363, 1998.

DENIS, M. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit groeth of tubercule bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. **Cell Immunol.** v.132, p.150-157, 1991.

DENIS, M., WEDLOCK, D.N., BUDDLE, B.M. IFN-γ enhances bovine macrophage responsiveness to *Mycobacterium bovis*: Impact on bacterial replication, cytokine release and macrophage apoptosis. **Immunology and Cell Biology,** Adelaide, v.83, n.6, p.643-648, 2005.

GRANGE J. M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. **Tuberculosis (Edinb)** v. 81, p.71-77, 2001.

GREEN L.C., WAGNER D.A., GLOGWSKI J., SKIPPER P.L., WISHNOK J.S. & TANNENBAUM S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal biochem**, v.126, p.131-138, 1982.

HAAGSMA, J. Bovine tuberculosis. OIE Manual (Amendment), p.11, 1995.

KANTOR I.N., AMBROGGI M., POGGI S., MORCILLO N., DA SILVA TELLES M. A., OSÓRIO RIBEIRO M., GARZÓN TORRES M. C., LLERENA POLO C., RIBÓN W, GARCÍA V, KUFFO D, ASENCIOS L, VÁSQUEZ CAMPOS LM, RIVAS C, DE WAARD JH. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. **Tuberculosis (Edinb)**, v.88, p.358-65, 2008.

LAQUEYRERIE, A., MILITZER, P., ROMAIN, F., EIGLMEIR, K., COLE, S., MARCHAL, G. Cloning, sequencing, and expression of the *apa* gene coding for the *Mycobacterium tuberculosis* 45/47-kilodalton secreted antigen complex. **Infection and Immunity,** v.63, p.4003-4010, 1995.

LILENBAUM, W., PESSOLANI, M.C.V., FONSECA, L.S. The use of Ag85 complex as antigen in ELISA for the diagnosis of bovine tuberculosis in dairy cows in Brazil. **J. Vet. Med. B: Infect. Dis. Vet.** Public Health. v.48, p.161-166, 2001.

LIU S.G., WANG C.L., ZHANG X.H., GUO S.P., GUO Y., SHAO M.L., Epidemiology and ecology of bovine tuberculosis. **China Anim Husb Vet Med,** v.32, p. 60-62, 2005.

LONG, R., LIGHT, B., TALBOT, J.A. Mycobacteriocidal action of exogenous nitric oxide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Betheda, v.43, p.403-405, 1999.

NEILL, S.D. POLLOCK, J.M., BRYSON, D.B., HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium* bovis infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amesterdam, v.10, p.41-52, 1994.

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO DA BRUCELOSE E TUBERCULOSE (PNCEBT). Disponível em: http://www.defesaagropecuaria.al.gov.br. Acesso em: 28 abr. 2008.

RITACCO, V., LOPEZ, B., de KANTOR, I. N., BARRERA, L., ERRICO, F., NADER, A. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Respiratory Veterinary Science,** v.50, n.3, p.365-367, 1991.

ROXO, ELIANA. Situação atual da Tuberculose Bovina no Brasil**. Instituto Biológico**, 2004. Disponível em: http://www.spmv.org.br/conpavet2004/palestras/resumos/ElianaRoxo.doc. Acesso

em: 28 abr. 2008.

SKEIKY, Y.A.W., SADOFF, J.C. Advances in tuberculosis vaccine strategies. **Microbiology**, New York, v.4, p.469-476, 2006.

VESOSKY B., TURNER O. C., TURNER J., ORME I. M. Gamma interferon production by bovine γδ T cells following stimulation with mycobacterial mycolylarabinogalactan peptidoglycan. **Infection and Immunity**, n.8, v.72, p.4312-18, 2004.

WATERS, W.R., PALMER, M.V., SACCO, R.E., WHIPPLE, D.L. Nitric oxide production as an indication of *Mycobacterium bovis* infection in white-tailed deer (Odocoileus Virginiaunus). **Journal of Wildlife Diseases,** Ames, v.38, n.2, p.338-343, 2003.

WITTE MB & BARBUL A. Role of nitric oxide in wound repair. **Am. J. Surg.**, v.183, p. 406-12, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Zoonotic tuberculosis (*Micobacterium bovis):* memorandum from a WHO meeting whit the participation of FAO. **Bull World Organ,** v.72, p.851-857, 1994.

Percepção do crime e sentimento de insegurança em Jataí/GO

Guilherme Borges da Silva (5º período de Ciências Sociais)
Faculdade de Ciências Sociais, Universidade Federal de Goiás
e-mail: guidhu@gmail.com

Palavras-chave: violência urbana, sentimento de insegurança e Jataí

Sentimento de insegurança nas sociedades contemporâneas

O processo de mudança que tem atingido de maneira geral as sociedades contemporâneas gera uma situação classificada por alguns autores como sendo de insegurança (Giddens, 1996; Beck 2001; Bauman, 2003;). Assim, viver a modernidade ou a pós-modernidade seria viver sob riscos constantes gerados pelo desencaixe das instituições modernas, profundamente afetadas pelas novas tecnologias, pelas transformações aceleradas, pela competitividade descomedida e pela globalização avassaladora.

A compreensão desse sentimento de insegurança pode ser refletida, segundo Cotta (2005), adotando-se um conceito operacional, cuja abordagem pode ser nas dimensões macro e micro, comportando condições objetivas e subjetivas. Entende-se que esse sentimento vem assumindo cada vez mais importância na sociedade, alimentando-se das crises do dia-a-dia, da delinqüência, das ameaças difusas, seja de natureza econômica, seja política, social e, também, das chamadas incivilidades. Desse modo, os estudos desenvolvidos nas ciências sociais, com essa temática, têm optado por empregar uma abordagem multidisciplinar.

O sociólogo alemão Ulrich Beck (2001) elegeu o termo “pós” para explicar a época “pós-industrial”, em que estaríamos como testemunhas, tanto como sujeitos como objetos da ruptura advinda no interior duma modernidade que se emancipa dos confins de uma sociedade industrial clássica e toma uma nova configuração, que ele designa como “sociedade do risco”. Trata-se de uma sociedade que coloca a si própria vulnerável ao perigo, não somente pelas ameaças antes referidas, mas também devido às contradições imanentes entre modernidade e contra-modernidade na essência da sociedade industrial. Com essas rupturas, estabilidades certas, de até então, como família, profissão, fé na ciência e no progresso são colocados em questão, devido ao surgimento das novas estruturas que alimentam os riscos que a sociedade pode vir a sofrer.

Deve-se atentar para o fato de que o aumento da incerteza e sua continuação crescente vão se alojando no espírito dos homens e, aos poucos, se transformam

em medo. Dessa maneira, precisa elucidar que as posições tomadas para medir a insegurança se deparam com duas realidades distintas. Por um lado, os fatos concretos como crimes e delitos diversos; por outro lado, o sentimento de insegurança resultante da leitura de mundo circundante, isto é, das interpretações subjetivas dos indivíduos, que se tornam muito complexas de se mensurar (Cotta, 2005).

Nessa perspectiva, Sebastian Roché (1994) trabalha a questão da insegurança a partir do sentimento que ela desperta nos indivíduos. Para compreender tal fenômeno, o autor construiu dois níveis ideais-típicos: o medo e a preocupação com a ordem.

O sentimento de insegurança no nível ideal-típico do medo é entendido como o medo difuso, onde não é necessário ter sido o sujeito vítima ou ter tido contato com uma vítima. Desse modo, associa-se a uma sensação de angústia para além dos fatos. Encontrando-se expresso no medo nas ruas e nas medidas de proteção no domicílio. Dessa forma, o medo pode ser entendido como uma construção social. Segundo Frattari (2009), “onde há um temor maior em relação ao que é percebido como os maiores perigos e não com relação aos riscos mais freqüentes”. (Frattari, 2009, p.16)

O segundo nível ideal-típico relaciona-se com a preocupação com a ordem. O que sugere um entendimento na esfera coletiva no que diz respeito ao sentimento de insegurança. Na apreensão com a ordem estão expressas: a autoridade na família, a repressão dos poderes políticos, a estigmatização dos delinquentes, etc.

Para Roché, o crime é um dos principais elementos para a propagação do sentimento de medo. A criminalidade e os problemas derivantes dela são considerados responsáveis pela construção de elementos que geram as principais perturbações da ordem social das sociedades contemporâneas. O crime tende expandir “o sentimento de medo e desconfiança que tornam inviáveis a existência de valores e práticas fundamentais de sociabilidade e solidariedade social” (Frattari, 2009, p. 16). Esses problemas tornam-se mais devastadores quando as instituições sociais (a família, a escola e a igreja) responsáveis pelas sanções perdem seu significado e deixa de cumprir sua função, apontando como uma das principais causas das delinqüências e criminalidades e as principais agências de controle, por sua vez, não conseguem tomar decisões que garantem a segurança dos indivíduos.

Mesmo que muito da propagação do sentimento de insegurança seja atribuído aos meios de comunicação de massa, por meio da concorrência desenfreada em conquistar audiência em vez de expressarem os fatos propriamente ditos, sabe-se que este sentimento se alastra muito além das implicações que acarretariam ter. No Brasil, mas não apenas aqui, costuma-se explicar o crescimento do sentimento de insegurança pela inoperância dos órgãos de segurança pública. Ainda que haja uma produção acadêmica representativa avaliando essa situação, há muita coisa a ser feita. Nesse ponto de vista, Michel Wieviorka defende a tese de que a violência no mundo contemporâneo:

> Deriva do fato de que ela parece bem mais ligada ao enfraquecimento dos Estados e a práticas referentes ao crime organizado, e mesmo à criminalidade mais banal, porém crescente, desenfreada, do que à emergência de conflitos sociais e políticos dos quais ela constituiria a fase primitiva. (Wieviorka, 1997, p.32)

Além das experiências subjetivas de medo e pânico, observa-se uma mudança na configuração do espaço urbano das cidades seja pelo predomínio de condomínios verticais e horizontais seja pela própria visão arquitetônica das residências, cujo componente segurança se assenta como prioridade.

Segundo Baumam, “os medos nos estimulam a assumir uma ação defensiva” (Bauman, 2007, p.15). O autor continua dizendo que

> Aqueles que podem dar-se ao luxo de se fortalecerem contra todos os perigos, visíveis ou invisíveis, atuais ou previstos, familiares ou ainda desconhecidos, difusos, porém ubíquos, protegendo-se por trás de muros, equipando os acessos a moradias com câmeras de TV, contratando seguranças armados, dirigindo carros blindados (como os notórios veículos utilitários esportivos), usando trajes à prova de balas ou aprendendo artes marciais. (id. p. 17)

Já os que não podem dar-se ao luxo de tal investimento preventivo, improvisam suas moradias na tentativa de evitar todos os tipos de crimes possíveis, por meio de grades nas janelas, mais trancas nas portas e a adoção de cães sentinelas. Enfim, esses estratagemas arquitetônicos-urbanísticos são equivalentes, na perspectiva de Bauman (2005), às muralhas das cidades antigas, mas, em lugar de defender a cidade e todos seus habitantes de um inimigo externo, servem para dividir e manter separados seus habitantes, defendendo-se uns dos outros.

Verifica-se, também, o número crescente de empresas de segurança que têm operado por todo território nacional e, sobretudo, nas grandes concentrações urbanas (Caldeira, 2000; Moysés, 2004).

Apesar da existência de um acordo de que o sentimento de insegurança nas sociedades ocidentais está relacionado a uma cadeia de fatores que caracterizam a sociedade atual, a preocupação deste trabalho voltou-se para a apreensão da sensação de insegurança face do medo do crime e da violência propriamente dita.

Para tanto, a cidade goiana de Jataí foi escolhida para o estudo, por apresentar características que expressam de forma cristalina os processos de mudanças decorrentes com a entrada da "pós-modernidade", para utilizar a concepção de Beck (2001).

Cidade de Jataí

Localizada a 323 km de Goiânia, no Sudoeste do Estado, a cidade de Jataí é considerada uma das mais prósperas do Estado de Goiás, destacando-se, principalmente, no pólo agropecuário, mostrando também sua vocação para a indústria. Segundo a estimativa populacional realizada no ano de 2008 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a cidade possui 85.491 habitantes. Já os dados da Superintendência de Estatística, Pesquisa e Informação do Estado de Goiás (SEPIN) constataram que, no ano de 2007, a cidade de Jataí contava com 139 estabelecimentos industriais no seu distrito agroindustrial (DAIJA), destacando-se os segmentos frigoríficos, destilares e laticínios.

Com a movimentação da fronteira econômica no sudoeste goiano, que a partir da segunda metade do século passado, passa a integrar espaços agrários, modernizando-os e modificando as relações sociais e econômicas do município, Jataí se integra densamente à economia nacional, sendo uma das principais produtoras de grãos do país.

Essas mudanças se instalaram enquanto forma de ampliar a fronteira econômica no sentido litoral, por meio da modernização das técnicas de agricultura. Assim, promoveu-se o processo de urbanização na medida em que várias pessoas migraram do campo para a cidade, e, ao mesmo tempo, com a migração de vários trabalhadores e investimentos vindos de outras partes do país, trazendo assim, maior movimentação para o setor econômico da cidade. Nisso, a cidade de Jataí teve que incorporar os novos padrões modernos e reestruturar-se para se adequar à demanda da cidade que cresceu.

Na medida em que ocorre o crescimento da cidade, promove também o distanciamento dos espaços em que cada pessoa pode, efetivamente, conviver com outras pessoas, perde-se a capacidade do reconhecimento entre os moradores. Com isso, altera-se o conjunto de valores e de experiências que são moldadas pela proximidade do convívio, pelos encontros formais e pelas conversas na calçada.

Desenvolvimento da perspectiva metodológica

A metodologia empreendida nesta investigação baseia-se em uma análise quantitativa, utilizando-se do método apontado por Pierre Bourdieu cuja compreensão da ação social não pode ser diagnosticada apenas pela percepção dos sujeitos. Assim sendo, Bourdieu diz da existência de uma dimensão objetiva que pode ser apreendida pelo método quantitativo.

Para Bourdieu (1994) as disposições, socialmente constituídas que orientam a ação, têm uma capacidade geradora. Considera o sujeito não apenas inserido na estrutura, mas também, como força estruturante de um campo. Sendo um sistema em que os agentes se relacionam através de uma estrutura em que se inclinam em suas práticas e sabendo que essas ações são internalizadas e reproduzidas constantemente pelo processo durável, que é condicionada e condicionante. Dessa forma segundo Frattari, Bourdieu:

> Propõe a elaborar uma teoria da cultura que seja capaz de apreender as condições materiais e institucionais da produção simbólica (estruturas objetivas). Para isso, considera que o primeiro momento da pesquisa deve ser o da investigação da dimensão objetiva da realidade social. O outro momento é o subjetivista que investiga as representações dos agentes (que se constroem a partir das estruturas) para perceber as representações cotidianas, individuais e coletivas que têm por objetivo conservar ou modificar as estruturas apreendidas no primeiro momento. Enfim, o conhecimento que Bourdieu define de praxiológico, isto é o duplo processo de interiorização da exterioridade e de exteriorização da interioridade. (Frattari, 2009, p.49).

A pesquisa tomou a ocupação como variável principal na elaboração de uma estrutura social considerando como ocupações aquelas definidas pela Classificação Brasileira de Ocupação (CBO) utilizada pelo Ministério do Trabalho e Emprego (MTE). Assim, construíram-se 23 categorias sócio-ocupacionais (CATs) que foram organizadas em 4 grupos principais, apresentados na tabela 1.

O primeiro grupo compreende as pessoas que desenvolvem alguma função de elite, seja dirigente ou intelectual. Com destaque para diretores ou grandes empregadores, gerentes ou supervisores com alta remuneração, tanto na iniciativa privada quanto pública, e, também, aquelas ocupações que têm a exigência de nível de instrução superior, enquadrando-se nesse grupo os professores de nível superior, os autônomos e empregados estatutários. O segundo grupo refere-se àquelas pessoas que possuem uma condição social de classe média, cujas atividades demandam certo grau de escolaridade e um determinado nível de renda.

O terceiro grupo de categorias alude às ocupações que contém certo grau de status, por atribuir uma série de condições de trabalho, pois seu cumprimento exige algum conhecimento técnico, mesmo que não exige níveis de escolaridade. Por fim, o quarto grupo se refere às ocupações que não tem nenhuma requisição técnica ou atributo pessoal, como são os casos do emprego doméstico e das ocupações que se enquadram no subemprego.

Tabela 1: Descrição das Categorias Sócio-ocupacionais (CATs)

Grupo Ocupacional	Categorias Sócio-ocupacionais
Elite dirigente e Intelectual	Grandes Empregadores, Dirigentes do Setor Público/Privado Profissionais de Nível Superior (Autônomos, Empregados e Estatuários) professores de Ensino Superior
Pequena burguesia e classe Média	Pequenos Empregadores, Ocupações Artísticas e Similares, Ocupações de Escritório, Supervisão, Técnicas, Médias da Saúde e Educação e de Segurança Pública, Justiça e Correios
Proletário terciário e proletário secundário	Trabalhadores do Comércio, Prestadores de Serviços Especializados e Não Especializados, Trabalhadores da Indústria Moderna, Indústria Tradicional, Operários dos Serviços Auxiliares e da Construção Civil
Subproletariado	Trabalhadores Domésticos , Ambulantes e Catadores de Papel

Fonte: Pesquisa primária “Violência Urbana no Estado de Goiás”

Desse modo, por meio da categorização sócio-ocupacional apresentada, procura-se apreender, utilizando-se dos 4 grupos como variável principal, as representações que os diferentes agentes têm a respeito da criminalidade na cidade de Jataí, quais são os grupos mais vitimados e os que desenvolvem maior sentimento de insegurança face ao crime.

Para tanto, foi aplicado, nos meses de janeiro e fevereiro do ano de 2008, um *survey* com 400 questionários em oito bairros da cidade de Jataí (Vila Fátima, Bairro Progresso, Samuel Graham, Centro, Conjunto Estrela Dalva, Bairro Jacutinga, Bairro

Santa Maria e Colméia Park). Apesar da pouca distinção entre o perfil socioeconômico dos bairros estudados, procurou-se investigar aqueles que apresentavam maior diferenciação, ou seja, os bairros que continham os maiores traços de elitização e os de características menos eletizadas.

O questionário previamente elaborado e testado compõe-se de dezessete questões fechadas e uma aberta. A primeira parte consta de questões sócio-demográficas. A segunda parte aborda questões referentes à vitimização, as transformações das residências ou condomínios em função do medo da violência, a representação do medo e da insegurança. Por último, aparecem as questões referentes à lei e ordem. A aplicação do questionário foi feita nos domicílios, onde o entrevistador propunha as questões e as marcava de acordo com a resposta do entrevistado.

Os dados obtidos com a aplicação do questionário foram tabulados e processados com a utilização do programa de análise estatística SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). A análise consta essencialmente de cruzamentos de dados, cujo intuito é comparar as percepções dos entrevistados a partir do grupo ocupacional que se insere.

Vivendo com medo na cidade de Jataí

A criminalidade e violência urbana têm sido responsáveis por uma das principais preocupações da sociedade brasileira contemporânea, ostentando notoriedade nos debates públicos e nas conversas rotineiras. Diante disso, cria-se um medo generalizado e exacerbado, marcando a vivência dos mais distintos grupos sociais nas grandes e médias cidades, remodelando as práticas e o modo de vida dos moradores. Tanto as experiências diretas da violência quanto aquelas vividas por parentes, amigos, vizinhos e, até mesmo, aquelas que apenas se ouve falar sem que tenham qualquer relação com as pessoas envolvidas, são contadas e recontadas. São diversas narrativas que sustentam as discussões sobre a criminalidade e o medo de se viver nas cidades. Essas histórias de criminalidade, juntamente com o espetáculo midiático, alimentam o medo dos moradores da cidade e expõem a sua incapacidade de se defender de ocorrências criminais. Dessa maneira, sabe-se que o medo não sugere suas vítimas, ainda que cause comportamentos diferenciados em função de posição social, sexo, local de residência.

Entre os entrevistados que ocupam funções de elite, média, proletária e subproletária, 28,6%, 45,7%, 55,1% e 60,0% respectivamente, relataram sentirem-se um pouco ou muito inseguros andando sozinho nos seus bairros durante o período noturno.

Tabela 2: Como você se sente andando sozinho no seu bairro à noite?

Grupo Ocupacional	Muito Seguro	Razoavelmente Seguro	Um Pouco Inseguro	Muito Inseguro	Total
Elite	14,3%	57,1%	28,6%	0,0%	100,0%
Média	20,0%	34,3%	28,6%	17,1%	100,0%
Proletária	19,2%	25,6%	26,3%	28,8%	100,0%
Subproletária	23,3%	16,7%	10,0%	50,0%	100,0%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

A maioria das pessoas também concordou com a afirmativa que dizia que ninguém está seguro em lugar algum. Esta afirmação pode ser percebida constantemente no discurso dos entrevistados. Mesmo que muitos dos entrevistados tenham adotado um aparato de medidas preventivas em suas residências e nos comportamentos cotidianos, não pode ser considerado inabilitado de sofrer alguma espécie de crime.

Tabela 3: Ninguém está seguro em lugar algum?

Grupo Ocupacional	Concordo	Discordo	Não Sabe/ Não Responde	Total
Elite	81,0%	19,0%	0,0%	100,0%
Média	80,0%	20,0%	0,0%	100,0%
Proletária	78,8%	20,5%	0,6%	100,0%
Subproletária	90,0%	10,0%	0,0%	100,0%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

Incivilidades

Para Derbabieux (1996), a incivilidade refere-se às freqüentes erupções de desordem, de difícil identificação, encontradas no cotidiano. Essas transgressões rompem com as normas e os valores locais e, conseqüentemente, causam desgaste no convívio. Com isso, na concepção de Roché (2005), a desordem resultante das incivilidades se revela insuportável, por ser visível diariamente. Ela faz nascer um sentimento de perda de controle social, que induz as pessoas a perceberem uma determinada localidade como perigosa e com alta incidência de crime. A percepção da ausência do controle aumenta o sentimento de insegurança, visto que os moradores se vêem incapazes de lidar com as decorrências de uma possível vitimização.

Os atos de vandalismo (pixações, danificação de equipamentos públicos, etc), o uso de drogas em logradouros públicos, brigas, discussões, a sujeira e o barulho

nas ruas foram apontados por parcelas significativas dos quatro grupos ocupacionais como sendo ocorrências frequentes em seus bairros. Apesar disso, os bairros em que residem os indivíduos que se ocupam de profissões proletárias e subproletárias apresentaram maiores incidências desses atos.

Tabela 4: Ocorrência no seu bairro de pessoas usando drogas em lugares públicos

Grupo Ocupacional	Nunca acontece	Acontece raramente	Acontece frequentemente	Não sabe/ Não responde	Total
Elite	33,3%	33,3%	33,3%	0,0%	100,0%
Média	22,9%	28,6%	48,6%	0,0%	100,0%
Proletária	27,6%	16,0%	56,4%	0,0%	100,0%
Subproletária	30,0%	20,0%	46,7%	3,3%	100,0%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

No caso do uso de drogas nas ruas do bairro, os moradores de ocupações média, proletária e subproletária disseram presenciar freqüentemente (48,6%, 56,4% e 46,7%) atitudes dessa natureza. Já com relação aos atos de vandalismo como depredações e destruição de equipamentos de uso coletivo dos bairros e também de patrimônio particular, as porcentagens de ocorrência são mais freqüentes nos bairros das pessoas que se ocupam de funções proletárias e subproletárias (24,4% e 33,3%).

Tabela 5: Ocorrência no seu bairro de pessoas que destroem ou danificam muros, janelas, postes, orelhões

Grupo Ocupacional	Nunca acontece	Acontece raramente	Acontece frequentemente	Não sabe/ Não responde	Total
Elite	42,9%	42,9%	14,3%	100,0%	42,9%
Média	48,6%	34,3%	17,1%	100,0%	48,6%
Proletária	53,8%	21,8%	24,4%	100,0%	53,8%
Subproletária	53,3%	13,3%	33,3%	100,0%	53,3%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

Percepção da Violência

Ainda que a maioria dos atos criminosos seja percebida pelos pesquisados como inexistentes ou de rara ocorrência em seus bairros, existem algumas variações importantes em função do grupo ocupacional do entrevistado. Tanto a ocorrência de crime contra a pessoa quanto o crime patrimonial são mais relatados nos bairros que residem pessoas de ocupações proletárias e subproletárias. A pergunta referente ao tráfico de drogas possibilita a compreensão da argumentação anterior, os dados mostram que 48,1% e 56,7% afirmam que o tráfico é freqüente em seus bairros, apresentando uma variação razoável em relação aos bairros residentes pelas pessoas do grupo ocupacional de elite.

Tabela 6: Ocorrência de tráfico de drogas no bairro

Grupo Ocupacional	Nunca acontece	Acontece raramente	Acontece frequentemente	Não sabe/ Não responde	Total
Elite	61,9%	19,1%	19,0%	0,0%	100,0%
Média	60,0%	8,6%	31,4%	0,0%	100,0%
Proletária	35,9%	16,0%	48,1%	0,0%	100,0%
Subproletária	36,7%	6,6%	56,7%	0,0%	100,0%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

Em relação à ocorrência de assassinatos a mesma constatação pode ser observado. Nos bairros ocupados pela elite nenhum entrevistado afirmou que os assassinatos são acontecimentos freqüentes. Este percentual sobe para 12,2% e 20,0% na pesquisa quando perguntado ao grupo ocupacional proletário e subproletário.

Tabela 7: Ocorrência de assassinatos no bairro

Grupo Ocupacional	Nunca acontece	Acontece raramente	Acontece frequentemente	Não sabe/ Não responde	Total
Elite	71,4%	28,6%	0,0%	0,0%	100,0%
Média	74,3%	17,1%	8,6%	0,0%	100,0%
Proletária	50,0%	37,8%	12,2%	0,0%	100,0%
Subproletária	40,0%	40,0%	20,0%	0,0%	100,0%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

Quanto aos crimes patrimoniais, podemos perceber uma maior semelhança nos bairros ocupados pelos quatro grupos ocupacionais. Em relação ao furto, percebe-se que os bairros em que residem aqueles que se ocupam de profissões médias sofrem menos do que os bairros habitados pela elite, pelos profissionais proletários e subproletários. Porém, quando perguntado sobre roubo em residência no bairro, os grupos proletário e subproletário (47,4% e 46,7%) dizem ocorrer com mais freqüência nos seus bairros do que os dos grupos de elite e médio.

Tabela 8: Ocorrência de furtos no bairro

Grupo Ocupacional	Nunca acontece	Acontece raramente	Acontece frequentemente	Não sabe/ Não responde	Total
Elite	19,0%	38,1%	42,9%	0,0%	100,0%
Média	22,9%	48,6%	28,6%	0,0%	100,0%
Proletária	21,8%	33,3%	44,9%	0,0%	100,0%
Subproletária	16,7%	40,0%	43,3%	0,0%	100,0%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

Tabela 9: Ocorrência de roubo em residência no bairro

Grupo Ocupacional	Nunca acontece	Acontece raramente	Acontece frequentemente	Não sabe/ Não responde	Total
Elite	33,3%	38,1%	28,6%	0,0%	100,0%
Média	20,0%	51,4%	28,6%	0,0%	100,0%
Proletária	19,9%	32,7%	47,4%	0,0%	100,0%
Subproletária	13,3%	40,0%	46,7%	0,0%	100,0%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

A pesquisa ainda revelou que a maioria dos entrevistados acredita que a violência na cidade aumentou no ano de 2008 em relação ao ano anterior (2007). Os indivíduos enfatizam o crescimento dos crimes violentos, especialmente os homicídios.

Tabela 10: Opinião sobre a violência em Goiânia em relação ao último ano

Grupo Ocupacional	Aumentou	Permaneceu como estava	Diminuiu	Não sabe/ Não responde	Total
Elite	57,1%	38,1%	4,8%	0,0%	100,0%
Média	42,9%	48,6%	8,6%	0,0%	100,0%
Proletária	49,4%	39,1%	11,5%	0,0%	100,0%
Subproletária	40,0%	36,7%	23,3%	0,0%	100,0%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

De que tem medo os entrevistados?

Para três dos quatro grupos ocupacionais pesquisados o medo de ser vítima de roubo na residência foi apontado como o maior temor dos entrevistados, correspondendo a 52,4% dos que tem ocupação de elite, 45,7% das ocupações médias, 46,2% das ocupações proletárias. Já as ocupações subproletárias temem mais o estupro, percebe-se que os bairros onde residem os membros desse grupo possuem precária infraestrutura, como lotes baldios e pouca iluminação. Esses são elementos facilitadores para essa modalidade de crime.

Tabela 11: Medo de ser vítima

Grupo Ocupacional	Roubo de telefone celular	Roubo de veículo	Roubo de outro objeto pessoal	Roubo na sua residência	Seqüestro	Agressão física	Homicídio	Estupro	Não teme nenhum desses atos	Não sabe/não responde	Total
Elite	4,8%	9,5%	0,0%	52,4%	0,0%	4,8%	14,3%	9,5%	4,8%	0,0%	100,0%
Média	2,9%	5,7%	8,6%	45,7%	2,9%	11,4%	8,6%	5,7%	8,6%	0,0%	100,0%
Proletária	3,2%	9,0%	6,4%	46,2%	2,6%	5,1%	8,3%	8,3%	9,6%	1,3%	100,0%
Subproletária	0,0%	0,0%	6,7%	26,7%	0,0%	13,3%	3,3%	40,0%	10,0%	0,0%	100,0%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

Dentre os que foram vítimas os atos relatados se referem principalmente a roubo de celulares, roubo de outros objetos pessoais, furtos, roubo de carros, roubo em residência. Os membros do grupo ocupacional de elite apresentam percentuais de vitimização um pouco mais elevados, seguido pelos que se ocupam de funções proletárias, médias e subproletárias.

Tabela 12: Você foi vítima de algum ato criminoso no último ano?

Grupo Ocupacional	Sim	Não	Total
Elite	28,6%	71,4%	100,0%
Média	17,1%	82,9%	100,0%
Proletária	23,1%	76,9%	100,0%
Subproletária	10,0%	90,0%	100,0%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

Contudo, esses percentuais tendem a se tornar bem mais expressivos quando analisamos a vitimização entre vizinhos e amigos próximos dos pesquisados. O percentual de entrevistados que teve algum vizinho ou amigo próximo vítima de algum ato criminoso no ano anterior à pesquisa é cerca de 21% maior em relação aqueles que foram vítimas diretas.

Tabela 13: Algum amigo próximo ou vizinho foi vítima de algum ato criminoso no último ano?

Grupo Ocupacional	Sim	Não	Total
Elite	42,9%	57,1%	100,0%
Média	42,9%	57,1%	100,0%
Proletária	32,7%	67,3%	100,0%
Subproletária	46,7%	53,3%	100,0%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

Medidas de segurança

O medo e o sentimento de insegurança parecem gerar uma cadeia de alterações na arquitetura das cidades, bem como colaborar na adoção de um aparato de comportamentos e hábitos defensivos/agressivos por parte dos indivíduos. Por toda cidade alastra-se o uso de barras, grades, muros intransponíveis, correntes, guaritas, guardas armados. Um medo generalizado toma conta dos moradores das cidades contemporânea, modificando hábitos e costumes. Neste contexto, a pesquisa apreendeu que 61,9% do grupo ocupacional de elite fizeram alguma modificação em sua residência visando maior seguridade.

Quando analisamos somente os que fizeram alterações e considerando que os entrevistados podiam marcar todas as alterações feitas, temos o seguinte:

Tabela 14: Medidas de segurança

Instalou alarmes	23,4%
Instalou cerca elétrica	10,4%
Instalou camêras	7,8%
Aumentou ou construiu muros	51,9%
Colocou grades	44,2%
Colocaram garras, pregos, vidros nos muros	3,9%
Mantém cães de guarda	28,6%
Instalou interfone	22,1%
Instalou olho mágico	5,2%
Contratou vigia de quarteirão	1,3%
Contratou um guarda	1,3%
Contratou firma de vigilância privada	3,9%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

Contudo, as opiniões dos entrevistados situados nos diferentes grupos ocupacionais tendem a se aproximar quando a questão diz respeito à proteção da casa e à privatização da segurança. Assim sendo, 47,6% dos moradores que ocupam de posições de elites, 48,6% daqueles que se ocupam de funções médias, 57,7% dos que se ocupam de profissões proletárias e 46,7% dos entrevistados que se ocupam de empregos subproletariados concordaram com a afirmação que dizia que "a utilização de cercas elétricas, alarmes e câmeras nos bairros são as melhores opções para se viver com segurança". Quanto à afirmação que dizia que "contratar vigilância privada é uma das melhores maneiras de garantir a segurança dos cidadãos", 38,1% dos entrevistados de ocupações de elite, 45,7 % dos que se ocupam de posições média, 56,6% dos proletários e 56,7% dos subproletariados disseram concordar com a mesma. Nota-se, nesse quesito, que os indivíduos que se ocupam de profissões mais subalternas acreditam mais na eficiência da segurança privada do que os que se ocupam de profissões mais elitizadas.

O Medo nas ruas

As ruas e os espaços públicos se transformam cada vez mais, em lugares de passagem, por onde os cidadãos se deslocam sem permanecer. Segundo Frattari em pesquisa na Capital do Estado de Goiás:

> A imagem das ruas é negativa e inspiradora de medo, o comércio nelas decai, a circulação de pessoas diminui e o contato social é transferido para espaços privados e homogêneos. As ruas são espaços que geram uma forte demanda por proteção para o deslocamento. As duas narrativas abaixo demostram a preocupação e as estratégias nos inevitáveis trajetos pelas ruas da capital. (Frattari, 2009, p.111)

Os moradores de Jataí, independentemente do grupo ocupacional, acreditam que as ruas e demais locais públicos não são espaços seguros e que devem ser evitados. Na percepção dos mesmos o contato com estranhos também deve ser restringido com o intuito de se viver com mais segurança.

Tabela 15: Evitar lugares públicos e o contato com estranhos é uma das melhores maneiras para se viver com segurança?

Grupo Ocupacional	Concordo	Discordo	Não Sabe/ Não Responde	Total
Elite	52,4%	47,6%	0,0%	100,0%
Média	62,9%	37,1%	0,0%	100,0%
Proletária	73,1%	26,9%	0,6%	100,0%
Subproletária	63,3%	36,7%	0,0%	100,0%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

Ainda, quando pedido para os entrevistados definir um lugar perigoso, podemos constatamos que a maioria não soube situar as características dessa localidade. Entre aqueles que definiram, dizem de locais em que há a presença de tráfico e usuários de drogas, presença de elementos suspeitos e onde há ocorrência de crimes.

Tabela 16: O que define um lugar perigoso? Quais as suas características?

Grupo Ocupacional	Condições locais	Presença do tráfico, usuários de drogas	Presença de elementos suspeitos	Falta de policiamento	Onde há ocorrências de crimes	Locais de lazer	pobreza	Não sabe/não responde	Total
Elite	0,0%	17,6%	17,6%	0,0%	11,8%	11,8%	0,0%	41,2%	100,0%
Média	0,0%	20,7%	6,9%	6,9%	6,9%	6,9%	3,4%	48,3%	100,0%
Proletária	3,5%	11,8%	9,0%	2,8%	9,0%	3,5%	1,4%	59,0%	100,0%
Subproletária	0,0%	11,1%	11,1%	7,4%	11,1%	3,7%	0,0%	55,6%	100,0%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

A falta de confiança nos órgãos de segurança pública é compartilhada por moradores de Jataí pertencentes aos diferentes grupos ocupacionais, sendo que a maioria das pessoas não acredita que as ações desses órgãos sejam eficazes no que tange ao combate da violência e da criminalidade urbanas. Sendo as pessoas de ocupações de elite (85,7%) são os mais desacreditados que a segurança pública tem sido eficaz no combate a violência. Apesar de todas as críticas direcionadas à conduta e competência policial, a grande maioria dos pesquisados (entre 90% e 94%) acredita que maior policiamento pode reduzir o crime nos seus bairros.

Tabela 17: Você acredita que a segurança pública tem sido eficaz no controle da violência?

Grupo Ocupacional	Concordo	Discordo	Não Sabe/ Não Responde	Total
Elite	14,3%	85,7%	0,0%	100,0%
Média	28,6%	71,4%	0,0%	100,0%
Proletária	48,1%	51,3%	0,6%	100,0%
Subproletária	53,3%	46,7%	0,0%	100,0%

Fonte: Pesquisa primária "Violência Urbana no Estado de Goiás"

Conclusão

Como nas grandes cidades, o medo da violência e da criminalidade na cidade de Jataí aparece cada vez mais como um valor que vem fundamentando e dividindo os espaços urbanos, além de reestruturar as práticas dos jataienses. Esses efeitos têm provocado seqüelas sociais, culturais e espaciais, por meio da adoção de medidas de segurança nas moradias e, além do mais, mudanças no comportamento

dos indivíduos nas ruas, andando sempre em desconfiança em relação às ações de outros.

O sentimento de insegurança e medo é apontado por Bauman (2007) como "o mais sinistro dos demônios" que se aninha nas sociedades contemporâneas. Esses sentimentos nascem da incerteza que, por sua vez, resulta do sentimento de impotência, pois estamos longe das rédeas que controlam a sociedade. Portanto, conclui o autor, que é preciso encontrar, ou melhor, construir as ferramentas necessárias para exorcizar "o mais sinistro dos demônios" contemporâneos.

Referências Bibliográficas

BAUMAN, Zygmunt. *Comunidade: a busca por segurança no mundo atual*. Rio de Janeiro: Jorge Zahar Editor, 2003.

_____. *Confiança e medo na cidade.* Rio de Janeiro; Jorge Zahar Editor, 2005.

_____. *Tempos líquidos*. Rio de Janeiro; Jorge Zahar Editor, 2007.

BECK, Ulrich. *La société du risque*. Paris: Aubier, 2001

BOURDIEU, Pierre. Esboço de uma teoria da prática. In: ORTIZ, R. (Org.). Pierre *Bourdieu – Sociologia*. Col. Grandes Cientistas Sociais. São Paulo, Ática, p.46-81, 1994.

CALDEIRA, Teresa Pires do Rio. *Cidade de muros: crime, segregação e cidadania em São Paulo*. São Paulo: EDUSP, 2000.

COTTA, Francis Albert. A crise da modernidade e a insegurança social. *Mneme*, v. 7, n. 14, fev.mar. 2005.

DEBARBIEUX, E. A violência na escola francesa: 30 anos de construção social de objeto (1967-1997). Trad. Fátima Simões Francisco. Educação e Pesquisa, v.27, n.1, p. 163-193, 2001.

GIDDENS, Anthony. *Consequências da Modernidade*. Oeiras, Celta Editora, 1996.

FRATTARI, Najla Franco. *Insegurança: As práticas e discursos do medo na cidade de Goiânia*. Goiânia. 2009, 192 p. Dissertação de Mestrado em Sociologia – Faculdade de Ciências Humanas e Filosofia da Universidade Federal de Goiás, Goiás.

MOYSÉS, Aristides. *Goiânia: metrópole não planejada*. Goiânia: Editora da UCG, 2004.

ROCHÉ, Sebastian. *Insécurité et libertes*, Paris, Seuil, 1994.

WIEVIORKA, Michel. O novo paradigma da violência. Tempo Social; Rev. Sociol. USP, S. Paulo, 9(1): 5-41, maio de 1997.

Movimento GLTTB na mídia impressa: vinte anos de lutas e conquistas em Goiás (1988-2008).

Thuani Gonçalves da Costa[1], Luiz Mello[2]

Faculdade de Ciências Sociais, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brasil.

E-MAIL: thuanigc@gmail.com

Palavras-Chave: Direitos humanos, LGBT, Mídia impressa, Goiás.

INTRODUÇÃO

Os estudos em gênero e sexualidade nas Ciências Sociais têm impulso dentro do campo sociológico e antropológico. O primeiro, dando um enfoque maior para a investigação do comportamento sexual da população, e o segundo com base em etnografias, que estudam com riqueza de detalhes as práticas, valores e crenças sexuais em diferentes culturas. Como destaca Heilborn (2002), o aprofundamento dos estudos acerca da sexualidade se dá nos meados dos anos 60, quando os métodos contraceptivos propiciaram um acirrado debate sobre a dicotomia sexualidade e reprodução biológica. Já na década de 80, temos um salto nos estudos sobre práticas, devido à epidemia de HIV/AIDS, e também se amplia o estudo sobre a sexualidade como identidade tendo em vista a construção do sujeito moderno.

[1] Graduanda em Ciências Sociais pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Bolsista de Iniciação Científica do CNPQ, integrante do projeto de pesquisa "Movimentos sociais, direitos humanos e cidadania: um estudo sobre o movimento GLTTB em Goiás" e membro do Ser-Tão, Núcleo de Estudos e Pesquisas em Gênero e Sexualidade da UFG.

[2] É professor adjunto da Faculdade de Ciências Sociais e do Programa de Pós- Graduação em Sociologia da Universidade Federal de Goiás (UFG). Coordenador do Ser-Tão, Núcleo de Estudos e Pesquisas em Gênero e Sexualidade da UFG, e do projeto de pesquisa "Movimentos sociais, direitos humanos e cidadania: um estudo sobre o movimento GLTTB em Goiás".

O movimento homossexual após a epidemia de AIDS ganha novo impulso e passa a afirmar diferentes posições identitárias. Como destacam Ramos e Carrara (2006), a experiência dos movimentos sociais brasileiros baseou-se na experiência norte-americana. Logo essa afirmação das diversas posições identitárias surgidas na "pós-epidemia" refletiu-se na variedade de siglas que são usadas no movimento, constatando assim que o movimento homossexual é também o movimento lésbico, bissexual, transexual e travesti, e abarca as diversas formas de sexualidade**.** Porém Facchini (2005, caracteriza a década de 1990 como um período segregacionista, e descreve como a discussão sobre as siglas desvia de certa forma a atenção para questões de última instância e segrega ainda mais o movimento.

Assim a concepção do sujeito que exerce sua cidadania e sua subjetividade é posta em análise. As experiências do gênero e da sexualidade foram, sim, centrais para a construção das identidades, mas é bom lembrar que essas concepções de sujeito são determinadas culturalmente.

Esse enfoque que o texto dá aos movimentos sociais abarca os objetivos da pesquisa desenvolvida nessa iniciação cientifica que descreve como a mídia retratou ao longo de vinte anos a história e dinâmica do movimento LGBT no estado, partindo de duas fontes jornalísticas, O Popular e Diário da Manhã. A escolha dessas fontes jornalísticas se deu por estarem há mais tempo noticiando os acontecimentos em Goiás. Na Cidade de Goiás em 1935, foi fundada a firma Jaime Câmara e Companhia, que tinha como sócios Jaime Câmara e Henrique Pinto Vieira. Em 1937, a papelaria e tipografia transferiram-se para Goiânia, numa sociedade que reunia os irmãos Jaime Câmara, Joaquim Câmara Filho e Vicente Rebouças Câmara. O jornal "O POPULAR", fundado no dia 03 de Abril de 1938, inicialmente circulou como bi-semanário e tinha uma tiragem de três mil exemplares, tornando-se diário em 1944.

Já na esteira do antigo Jornal Cinco de Março, foi fundado em 12 de março de 1980, pelo jornalista Batista Custódio, o jornal "Diário da Manhã", sendo o terceiro jornal diário de Goiânia e mais tarde, com o fechamento da Folha de Goiaz, a segunda publicação do gênero. Foi o primeiro jornal diário de Goiás a circular ininterruptamente, inclusive às segundas-feiras e em cores.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal dessa pesquisa foi levantar e mapear através das reportagens a trajetória de luta política do movimento LGBT em Goiás, a partir da pesquisa em fontes documentais impressas. As reportagens mapeadas de ambos os arquivos jornalísticos somam um total de trezentas e trinta. Como nosso objetivo foi mapear as metas de lutas, as reportagens foram subdivididas em agrupamentos de dez palavras-chave. Essa divisão foi realizada com base nos assuntos descritos em cada reportagem. Os eixos temáticos são: AIDS/DST; Direitos civis; Discriminação; Crimes e mortes; Reinvidicações e declarações feitas pelos movimentos de militância; Repercussão midiática; Religião; Paradas do Orgulho gay em Goiânia; e por fim a categoria Outros, que engloba as reportagens que não atendem aos objetivos da pesquisa.

A tabela abaixo traz as reportagens publicadas em vinte anos. Os dados foram agrupados na tabela por intervalos de cinco anos, com exceção dos anos de 1988 e 1989 onde o número de reportagens é substancialmente alto. Já num segundo momento da pesquisa, que será descrito neste relatório, veremos como as metas de lutas foram divulgadas, compreendidas, repassadas ou finalmente, se efetivaram ou não.

Tabela de dados jornalísticos

Recorte Temporal (1988-2008).					
Eixos Temáticos	**1988 á 1989**	**1990 á 1994**	**1995 á 1998**	**1999 á 2003**	**2004 á 2008**
AIDS/ DST	10	8	1	2	1
Direitos civis.	3	2	11	7	9
Discriminação	9	2	3	12	7
Crimes e/ mortes.	23	20	7	8	3
Reivindicações e declarações feitas pelos movimentos de militância.	1	3	5	3	2
Apoio político, eleitorado e projetos.	4	4	8	4	9
Repercussão midiática	6	-	1	3	6
Religião	1	2	4	6	5
Paradas do Orgulho gay em Goiânia	1	-	-	6	7
Outros	8	22	16	24	10

3. METODOLOGIA

Essa pesquisa, num primeiro momento, foi desenvolvida com o auxilio do levantamento bibliográfico. As leituras de textos e livros foram feitos de forma gradual, o que mais tarde nos propiciou escrever com maior segurança sobre as diferentes temáticas.

O segundo contato com o campo de pesquisa foi feito para investigar a possível existência de arquivos jornalísticos na biblioteca da UFG. Porém foi constatada a inexistência desse tipo de arquivo jornalístico no acervo da biblioteca central localizada no campus II e na biblioteca setorial localizada no campus I.

O terceiro contato com o campo de pesquisa foi feito através da ida aos CEDOC (centros de documentação), dos jornais “O Popular” e Diário da Manhã para verificar a existência dos arquivos jornalísticos e as formas de acesso. O jornal Diário da Manhã possui sede em frente ao Terminal da Praça da Bíblia em Goiânia. Para acessar o centro de documentação do Diário da Manhã, é preciso notificar a presença na portaria do jornal, logo depois disso (a/o) responsável pelo arquivo pergunta o tipo de pesquisa e apresenta a sala do acervo. Como o levantamento demandou um tempo maior na pesquisa, a carta de apresentação foi essencial para que o meu acesso ao acervo fosse liberado.

O acesso ao material impresso arquivado foi realizado numa sala de pesquisa, onde fica acomodado em prateleiras. A manipulação das reportagens antigas exigia o uso de jaleco e máscara, pois o estado de conservação de algumas encadernações se encontrava fragilizado. Na sala existem ainda, duas mesas grandes para se abrir as reportagens que já estão encadernadas.

Esse período de mapeamento das reportagens também foi marcado por dificuldades. No Diário da Manhã a maior dificuldade encontrada neste arquivo é o lugar de conservação, que está junto à sala de pesquisa. Logo o ambiente é empoeirado e isso dificultava a permanência no local por muito tempo. Já as pastas de fotos ficam arquivadas numa sala ao lado da sala de pesquisa, se encontrando em bons estados de conservação e de identificação. Quanto à digitalização do acervo jornalístico, as reportagens que vão desde a fundação do jornal em 1980 até o ano de 2002 não se encontram digitalizados. Assim a única forma de acesso a essas reportagens é feita através da pesquisa manual em grandes encadernações feitas por intervalos de um ano cada. Essa complexificação da forma de pesquisa demandou uma minuciosa investigação por cada dia publicado ao longo do recorte proposto da pesquisa. O único acervo digitalizado no jornal corresponde aos anos de 2003 a 2007. Já os anos de 2008 e 2009 estavam em processo inicial de digitalização, quando terminei o levantamento neste arquivo. O jornal ainda possui arquivo microfilmados, que correspondem aos anos de 2003 a 2007.

O jornal “O Popular” possui sede nas organizações Jaime Câmara no Setor Serrinha, em Goiânia. O acesso ao acervo do jornal foi feito num primeiro momento no balcão de entrada da empresa Jaime Câmara, onde se recebe um crachá de visitante. Logo depois (a/o) funcionário da portaria o acompanha até o centro de documentação. Chegando ao arquivo, o funcionário do turno o recebe e pergunta qual o assunto a ser pesquisado. Primeiro o funcionário traz pastas que já estão divididas por assuntos, se não for suficiente esse tipo de pesquisa ele apresenta o acervo que se encontra digitalizado no sistema de internet do Jornal e por último dá a opção por pesquisar na máquina de microfilmagem. O ambiente de pesquisa não se encontra junto ao material da pesquisa, logo todo o material impresso deve ser solicitado ao funcionário e ele então entra no arquivo e entrega o material solicitado. A sala para pesquisa localiza-se na mesma sala do funcionário, tendo apenas uma divisória que delimita o balcão e a área de pesquisa.

Mas esse acervo também possui suas dificuldades. Nas pastas se encontravam reportagens que não são especificas de Goiás, mas de todo o centro-sul e que são recortadas de modo que sua identificação fica comprometida, sem data. A qualidade da máquina de microfilmagem não se encontra em boas condições, pois sua tela é fosca e dificulta visualizar as reportagens.

Enfim muitas foram às dificuldades encontradas o que de certa forma gerou a formação de um mapeamento frágil e delimitado. Essa fragilização ora se dá por haver reportagens sem data ou como no acervo de “O Popular”, a forma de recorte das reportagens nos faz duvidar quanto à origem da fonte.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste tópico descrevo algumas reportagens que dizem respeito às metas de lutas, reivindicações, denúncias e conquistas junto a movimentos sociais e pessoas direta ou indiretamente ligadas ao movimento. No primeiro momento, o mapeamento norteou a pesquisa. Esse levantamento nos fornece, à priori, um agrupamento de numérico que nos permitirá analisar a quantidade elevada de reportagens em alguns anos mais que outros**.** Essas reportagens foram selecionadas como amostras do material pesquisado e com base em seus conteúdos que nos informam acerca das metas e conquistas de lutas em Goiás. A primeira reportagem selecionada da década de 1980, foi publicada em 16 de fevereiro de 1988, no Diário da manhã, e foi intitulada “HOMOSSEXUALISMO: pecado, crime ou um direito de livre escolha ?”. Essa reportagem traz como capa travestis e descreve a luta sem trégua contra o preconceito que eles sofrem em Goiânia.

A segunda reportagem selecionada da década de 1980, foi publicada em 06 de maio de 1988, e foi intitulada “VIDA E PAIXÃO DE UMA LÉSBICA”. Essa reportagem traz como capa uma lésbica que descreve como foi descobrir-se lésbica e o desenrolar da aceitação perante o circulo social que participava. Descreve ainda sobre suas experiências e sobre o preconceito que sofre.

A terceira reportagem selecionada da década de 1980 foi publicada em 30 de Julho de 1989 e foi intitulado “O DIFICIL TROTTOIR: apesar dos policiais abusarem de sua autoridade, os travestis sobrevivem pela madrugada adentro”. Essa reportagem descreve a vida e as dificuldades da profissão dos travestis.

A terceira reportagem selecionada é da década de 1990 foi publicada em 18 de setembro de 1991 e foi intitulado “O Sexo por Profissão”. Essa reportagem descreve a vida dos garotos de programa gays e bissexuais que publicam anúncios nos classificados dos jornais e verifica em entrevista com um, dos dois garotos da foto de capa da reportagem, a veracidade dos anúncios.

A quarta reportagem foi publicada no dia 02 de Janeiro de 2000, no Diário da Manhã e foi intitulada, “HC FAZ CIRURGIA”. Essa reportagem traz como foto de capa Roberta Close e trata de transgenitalização e a possibilidade que o HC (Hospital das Clinicas) trouxe ao realizar em conjunto com a equipe da Dr.ª Mariluza a cirurgia para mudança de sexo anatômico.

A quinta reportagem foi publicada em 08 de agosto de 2003, no Diário da Manhã, trazendo como foto de capa Léo Mendes, ativista e colunista do jornal, e intitula-se, “IGREJA PREGA VALORES INSTITUIDOS”. Essa reportagem escrita pelo próprio Léo Mendes critica a posição do Papa, que condena e chama de Crime a homossexualidade e ainda anuncia que entregará em conjunto com grupos militantes do Estado de Goiás uma carta de apostasia ao padre da Catedral de Goiânia como protesto.

A Sexta reportagem foi publicada em 08 de novembro de 2003, em “O Popular”, e intitula-se “CONTRATO RESGUARDA HOMOSSEXUAIS”. Essa reportagem marca o primeiro registro em cartório de um contrato de sociedade civil entre dois homens que vivem juntos em Goiânia.

A Sétima reportagem foi publicada em 13 de Junho de 2004 no Diário da Manhã e foi intitulada “GOIÂNIA, CAPITAL DA HOMOFOBIA”. Essa reportagem descreve o alto índice de intolerância contra homossexuais e mostra que o preconceito é maior entre os jovens goianos de 10 a 24 anos. A reportagem fala ainda da falta de políticas públicas que atendam aos interesses dos homossexuais e mostra como será a proposta da campanha “Brasil sem Homofobia”.

A oitava reportagem foi publicada em 28 de junho de 2004 em “O Popular” e foi intitulada “MANIFESTAÇÃO GAY REÚNE 3 MIL EM GOIÂNIA”. Esta reportagem descreve como foi á parada do orgulho gay e quais foram as reivindicações desse ano. Essa parada protestava pela inclusão dos homossexuais, comemorava a quinta edição apoiada pela UNESCO e reinvidicava à aprovação de várias leis no Congresso Nacional.

A nona reportagem foi publicada em 12 de junho de 2005 no Diário da Manhã e foi intitulada “PARADA GAY EM GOIÂNIA”. Essa reportagem prevê o número de participantes da Parada do Orgulho Gay, estimado em mais de 15 mil pessoas e anuncia que a parada sairá do bosque Botafogo, às 15 horas. O texto traz os apoios dos movimentos sociais e dos estabelecimentos ligados ao público alvo das paradas, os protestos pelos projetos de lei que tramitam no Congresso Nacional com morosidade e sobre toda a estrutura do evento.

A décima reportagem foi publicada em 04 de setembro de 2005 no Diário da Manhã, intitulada “AMPLIAÇÃO DE DIREITOS DOS HOMOSSEXUAIS É SONHO DISTANTE”. Essa reportagem traz a fala de uma antropóloga professora da UFG, Maria Luiza Rodrigues, que aborda a impossibilidade da ampliação de mercado de consumo, direito de adoção e realização legal do casamento entre pessoas do mesmo sexo no Brasil e conclui a reportagem evidenciando que há muitas lutas a serem travadas ainda.

A décima - primeira reportagem foi publicada em 01 de outubro de 2006 no “O Popular”, e intitula-se “HORA DE DIZER SIM”. Essa reportagem registrou a assinatura de um contrato de parceria civil de duas mulheres que vivem juntas em Goiânia. A assinatura do contrato foi comemorada com um ‘casamento simbólico ‘ e abriu o mês da visibilidade lésbica organizado pelo Grupo Lésbico de Goiás (GLG).

A décima - segunda reportagem foi publicada em 10 de outubro de 2006 em “O Popular” e foi intitulada ”JOVENS DENUNCIAM HOMOFOBIA EM SHOPPING”. A reportagem denúncia a discriminação contra homossexuais que se beijavam na área de alimentação do Banana Shopping. Os jovens que integram o Grupo Colcha de Retalhos, da UFG, solicitaram um pedido de desculpas formal do estabelecimento.

A décima- terceira reportagem foi publicada em 09 de setembro de 2006 em “O Popular” e intitula-se “HOMOAFETIVIDADE NA FAMILIA”. A reportagem mostra o reconhecimento por parte de uma juíza da 2° vara de família de Goiânia, da união estável proposta por um homossexual que foi excluído do testamento de seu companheiro e a quem alega ter ajudado a constituir o patrimônio.

As reportagens que descrevo neste trabalho fazem parte do levantamento realizado nas fontes jornalísticas impressas. A seleção para descrevê-las foi feita a partir de seus conteúdos que associam lutas pelos direitos humanos e movimentos sociais envolvidos.

Temos uma reportagem retratando a mudança de sexo de uma transexual, assunto este que ainda está em pauta para um grande número de pessoas e, além disso, há falta de profissionais que atendam essa demanda em hospitais da rede pública. A quinta reportagem descreve o embate secular entre igreja e o controle da sexualidade. Como destaca Foucault (1999), a instituição igreja esforçou-se por acelerar o ritmo de confissão da população na contra-reforma em função das antigas práticas sexuais gregas que predominaram na Idade Média. Assim o cristianismo pode a partir da confissão, reforçar a ligação entre sexo e pecado, impondo ao indivíduo um distanciamento dos desejos carnais.

Há duas reportagens que retratam a parceria civil entre pessoas do mesmo sexo em Goiânia, e seu reconhecimento perante a justiça, condizem ao direito de uma escolha justa, pois são dois homens e duas mulheres que estão decidindo de forma livre e recipocra a condução de suas existências. Outras duas reportagens retratam as paradas do orgulho LGBT e através dessa forma de visibilidade, podemos perceber como destacam Ramos & Carrara (2006), a importância que a militância e movimento homossexual obtiveram bem como as ampliações do mercado de bens e serviços, políticas de visibilidade que mantêm relações com o mercado estabelecido e a presença do tema no espaço acadêmico.

Há outras duas reportagens que denunciam as formas de homofobia existentes em Goiânia. Como destacam Ramos & Carrara (2006), a violência compôs a formação das identidades no movimento homossexual brasileiro. Assim, essa composição ficou estabelecida de maneira que reivindicações mais pontuais se estruturaram a partir da luta contra a violência de gênero, racismo e homofobia. Logo a atuação de movimentos sociais ou militantes nessas situações foi imprescindível para a divulgação e tentativa de luta contra o preconceito.

Dentro dessa análise foi enunciada por várias vezes a importância das metas de lutas e das vozes por trás de ONGs, militantes, acadêmicos e pessoas da sociedade civil que são integrantes ou simpatizam com as causas do movimento. Os ganhos em Goiás através das reportagens são muito significativos se levarmos em consideração as relações de forte patriarcalismo existentes na “tradição” do Estado.

Porém há ainda grandes mudanças e lutas a serem travadas para garantia dos direitos humanos para a população LGBT no estado de Goiás. Como destaca Mello: “São homens e mulheres que, transcendendo os limites de classe, sexo, gênero, raça, etnia, religião, geração, nacionalidade e orientação ideológica, enfim, transcendendo praticamente todas as fronteiras, trazem em seus pensamentos, intenções atos, ainda que de forma nem sempre intencional e deliberada, a marca (estigma) im (ex) plícita, desafiando fundamentos básicos da normatividade social por meio de suas vivências amorosas e sexuais” (2005, p. 203)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O foco principal da pesquisa foi verificar em que circunstâncias a luta pela garantia de direitos sexuais e o combate à homofobia articulam-se a outras demandas da sociedade civil, local e brasileira, além de compreender como a presença do movimento LGBT goiano tem influenciado os processos de construção de uma sociedade mais justa e igualitária. A pesquisa, portanto, valeu como grande experiência e descoberta de um campo que permitiu visualizar com maior clareza as conquistas, desigualdades e demandas no estado de Goiás. A leitura de textos e livros durante a pesquisa propiciou uma imersão inicial nos campos do gênero e da sexualidade, que continuamente se encontram em expansão. O levantamento das reportagens mostrou-se formador, quanto às situações vivenciadas sendo cheias de dificuldades e aprendizagem.

Ao longo da pesquisa as reportagens foram mostrando expressivamente os assuntos-chaves das diferentes décadas. Na década de 1980, o assunto predominante era a epidemia de AIDS e os primeiros famosos a morrerem devido à doença. O que gerou uma onda ainda mais forte de discriminação contra a homossexualidade. A AIDS agora tinha uma “cara” que eram os gays. Em Goiás as travestis eram o público alvo das reportagens do final da década de 1980. Essas travestis eram presas constantemente e alvo de crimes e acusações. Na década de 1990, a AIDS continua a ser manchete, porém entra em pauta assuntos como a legalização do casamento entre pessoas do mesmo sexo, o direito a adoção de crianças por casais homossexuais e a criminalização do preconceito previsto na constituição de 1988. No século XXI, a uma mudança significativa dos debates. A homossexualidade e o consumo são vistos como interdependentes.

Reportagens sobre casamentos de pessoas do mesmo sexo são noticiadas e as denúncias são mais desveladas. O cuidado com as palavras escritas em tons pejorativos do final da década de 1990 para o inicio do século XXI são consideravelmente diferentes da década de 1980 á primeira metade da década de 1990. Os grandes veículos públicos da Capital goianiense que mantinham e mantém até hoje a população informada retratavam de forma influenciadora, sem base teórica as questões mais diversas e mantinham em nível de senso comum informações que mereciam uma abordagem coesa e com o mínimo de preceitos pessoais possíveis. Essas constatações evidenciam diferentes resultados do trabalho realizado e mostram ainda como há muitas lutas a serem travadas para a população LGBT em Goiás.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MELLO, Luiz. *Outras Famílias: a construção social da conjugabilidade homossexual no brasil*. *Cadernos Pagu*, n.24, jan./jun 2005, p.197-225

HEILBORN. Maria Luiza. *Dois é par: Gênero e identidade sexual em contexto igualitário*. Rio de Janeiro: Garamond, 2004.

FOUCAULT, Michel. *História da Sexualidade I: a vontade de saber*. 13. Ed. Rio de Janeiro: Graal, 1999.

FACCHINI, Regina. *Sopa de Letrinhas*. Rio de Janeiro. Garamond, 2005.

RAMOS, S. & CARRARA, S. *A Constituição da Problemática da violência contra Homossexuais: A Articulação entre Ativismo na Elaboração de Políticas Publicas.* Physis: Revista de Saúde Coletiva, (p.185-205). Vol.16, nº 02.

Formação cultural e resistência à razão instrumental: um recorte para professores universitários das áreas de Ciências Exatas e da Terra, Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Goiás

Nathália Batista Gouveia, Profª Drª. Maria do Rosário Silva Resende

Faculdade de Educação, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO

e-mail:nathalia_bg@hotmail.com, mrsresende@uol.com.br

Palavras-chave: Formação cultural, Formação do indivíduo, Professores Universitários

Introdução

Esse artigo é decorrente do projeto de pesquisa "Formação cultural e resistência à razão instrumental dos professores universitários: um estudo na Universidade Federal de Goiás", aprovado pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Cientifica – PIBIC (CNPq). Nesse busca-se aprofundar os estudos sobre os processos de formação do indivíduo na sociedade atual, como a razão instrumental se instala nas formas de pensamento e consequentemente nas ações presentes na sociedade. O recorte da pesquisa é a formação do professor universitário e sua resistência ou não à razão instrumental que se faz presente também no cotidiano da universidade.

Investigar acerca da temática da formação cultural é estabelecer um compromisso com a reflexão crítica e com a abrangência que esta exige, na medida em que se estende a cultura, à relação indivíduo e sociedade, não se restringindo a espaços educacionais. Sendo que, esses espaços, destacando-se a universidade, se apresentam como *locu*s de formação e produção de conhecimento, atuando de forma direta ou indireta nos vários ramos da sociedade. Nesse sentido, é preciso refletir sobre a formação do professor universitário e as suas possibilidades de atuação com a finalidade de verificar os aspectos favoráveis, os obstáculos e os impedimentos para constituição do sujeito autônomo.

Tais discussões, realizadas por Resende (2005), em sua tese de doutorado "Formação e autonomia do professor universitário: um estudo na Universidade Federal de Goiás (UFG)", originaram o projeto "Formação cultural resistência à

razão instrumental dos professores universitários: um estudo na Universidade Federal de Goiás" que se desdobrou em três sub-projetos, tendo como base o banco de dados do projeto de Resende (2005). O artigo aqui apresentado se constitui no recorte da amostra dos professores universitários da UFG, nas áreas de Ciências Exatas e da Terra, Engenharias e Ciências Agrárias. A amostra da pesquisa é composta por professores doutores com dedicação exclusiva (DE) da UFG, e o banco de dados é constituído das respostas dos professores, via questionário, a questões relacionadas à investigação apresentada no projeto.

Objetivos

O objetivo da investigação é discutir a temática da formação cultural e a resistência à razão instrumental dos professores universitários da Universidade Federal de Goiás (UFG), atendo-se a concepção de razão que sustenta a formação do homem na atualidade. Para tanto objetiva-se a análise dos dados coletados que compõem o Banco de Dados referentes à área de Ciências Exatas e da Terra, Engenharias e Ciências Agrárias, com o intuito de discutir a adesão, maior ou menor, desses professores à razão instrumental e de que modo esta adesão se vincula às áreas apresentadas, interferindo ou não no processo de formação dos professores universitários.

Os objetivos específicos consistem no empreendimento de estudos teóricos que possibilitem a discussão da temática e a análise dos dados coletados, contribuindo para o desenvolvimento da pesquisa assim como a formação acadêmica do bolsista.

Metodologia

Diante dos objetivos de investigação e discussão da temática da formação cultural e a resistência à razão instrumental dos professores universitários da Universidade Federal de Goiás (UFG), a pesquisa foi realizada a partir de dois momentos. O primeiro consistiu em um levantamento e aprofundamento teórico da Teoria Crítica da Sociedade (Escola de Frankfurt) e de outros teóricos relacionados à discussão do tema da pesquisa, o processo de formação dos indivíduos. No segundo, um estudo estatístico, a partir do *software* SPSS e uma Análise de Conteúdo dos dados. O artigo em questão apresenta as discussões teóricas e

estatísticas levantadas e analisadas durante o percurso da pesquisa, explicitando o aspecto formativo posto em discussão em sua dimensão global.

Resultados e Discussões

Para Adorno, "[...]a formação, não é outra coisa do que a cultura pelo lado de sua apropriação subjetiva." (ADORNO apud RESENDE, 2005, p. 43). A cultura por sua vez, expressa a relação sociedade/indivíduo, que vincula formação a títulos educacionais, acadêmicos. Contudo, o processo de formação abrange todos os aspectos e espaços da vida do sujeito, não se restringindo à formação pedagógica: cursos de especialização, técnicas, didáticas, etc.

Diante da realidade atual, observa-se uma grande demanda de informações que proporcionam conhecimentos fragmentados, superficiais, desvinculados de uma reflexão crítica, que é característica da formação. A fragmentação de informações não permite que o sujeito tenha uma visão global da realidade, perdendo assim a noção do todo, o que configura a alienação e a semiformação. Essas características derivam de um processo histórico-cultural em que o sistema de produção vigente, o capitalismo, não se limita à produção material, mas se relaciona à produção da vida social.

Desse modo, a apropriação subjetiva da cultura constitutiva da formação está relacionada a uma construção histórica que perpassa as transformações econômico-socias. Estas, por sua vez, de acordo com Horkheimer (2000) estão vinculadas às transformações no âmbito da razão.

A vida do espírito acompanhou automaticamente o modelo da divisão social do trabalho, marcando a substituição da razão objetiva pela razão formalizada, relativista, pois o movimento revolucionário consolidado pela burguesia que permitiu sua emancipação não cumpriu sua função real. A razão transformou-se em instrumento do processo industrial, o pensamento tornou-se uma parte e uma parcela da produção. Segundo Adorno (1996), o sonho de uma formação, que era a libertação de uma imposição, econômica e social é falsificado em apologia de um mundo organizado justamente por essa imposição.

O processo de produção instalado "[...] negou aos trabalhadores todos os pressupostos para a formação e, acima de tudo, o ócio." (ADORNO, 1996, p. 393). A condição requerida para o real processo de formação é negada aos indivíduos, sendo substituída por uma gama de atividades que impossibilitam a auto-reflexão e

a crítica. O indivíduo não dispõe de tempo para o ócio, o que o priva de momentos de lazer, descanso e, sobretudo, momentos para reflexão acerca do seu trabalho, suas ações, vivências cotidianas, enfim, de suas experiências.

Para Adorno (1996),

> [...] a formação devia ser aquela que dissesse a respeito, de uma maneira pura como seu próprio espírito, ao indivíduo livre e radicado em sua própria consciência, ainda que não tivesse deixado de atuar na sociedade e sublimasse seus impulsos. (ADORNO, 1996, p. 391).

Um indivíduo que é livre, radicado em sua própria consciência, não está desvinculado da realidade, antes precisa de um nível mínimo de adaptação ao sistema de produção para garantir sua sobrevivência, o que não significa aderir, submeter-se a ele, de modo não-refletido.

Nesse sentido, a possibilidade de formação, não é uma ruptura total com o sistema vigente, uma vez que é necessário conhecer e participar do funcionamento dessa realidade para questioná-la.

> A educação seria imponente e ideológica se ignorasse o objetivo de adaptação e não preparasse os homens para se orientarem no mundo. Porém ela seria igualmente questionável se ficasse nisto, produzindo nada além de *well ajusted people*, pessoas bem ajustadas, em conseqüência do que a situação existente se impõem precisamente no que tem de pior. Nestes termos, desde o início existe no conceito de educação para a consciência e para a racionalidade uma ambigüidade. Talvez não seja possível superá-la no existente, mas certamente não podemos nos desviar dela. (ADORNO, 1995, p. 143-144)

Formar-se é estar aberto para novas experiências, ou seja, experiências formativas que permitem ir além daquilo que é aparente, "[...] do seu aprendizado profissional estrito, na medida em que desenvolvem uma reflexão acerca de sua profissão, ou seja, pensam acerca do que fazem, e também refletem acerca de si mesmos." (ADORNO, 1995, p.54).

Mesmo sabendo que a formação não é restrita ao campo das instituições educacionais formais, ao se estudar o processo formativo dos indivíduos, não se pode negar que o professor desempenha um papel fundamental, sendo reconhecido por este. Logo, os professores precisam ser indivíduos autônomos, a fim de educar para emancipação, e tal fato está intimamente ligado a sua formação.

As universidades e seus professores são responsáveis no Brasil, em especial, pela maioria absoluta das pesquisas, portanto, do desenvolvimento do conhecimento

científico. Além disso, uma parcela significativa da população busca formação humana/profissional no espaço universitário e, posteriormente, assumem diversos papéis na sociedade. Dessa forma, é importante e necessário procurar entender como se dá a formação desse professor, em vista de sua responsabilidade social.

De acordo com Resende (2005), o que se percebe atualmente no contexto das universidades é uma invasão das leis de mercado, que impedem o processo de autonomia tanto institucional como individual, as quais comprometem as experiências formativas dos seus professores e, por conseguinte, dos seus alunos. As condições de trabalho dos docentes não são boas em decorrência de vários aspectos entre eles: o achatamento salarial, a ampliação da carga horária, e um sistema de avaliação produtivista que valoriza a quantidade em detrimento da qualidade. Dessa forma, o professor é rotulado, a partir da definição do que é ser produtivo ou não no sistema capitalista de produção. A burocratização das atividades docentes produz marcas no seu processo cotidiano de formação e "dependendo do nível dessas marcas, o professor é cada vez mais impedido de vir a ser autônomo, livre, para buscar sua liberdade e dignidade" (RESENDE, 2005, p.70).

Essa situação é característica da sociedade atual em que o conhecimento se converteu em mercadoria, por meio de um processo que se assemelha a uma linha de produção. O professor universitário obrigado a cumprir uma carga horária de ensino, ter projetos de extensão e pesquisa, produzir uma determinada quantidade de publicações, é rigorosamente pontuado. Dessa maneira, a atividade de conhecimento se transforma em uma atividade mecânica, pragmatista, impedindo a emancipação do indivíduo, pois dificulta a crítica e a reflexão, 'coisificando' o homem e suas relações.

> O trabalho produtivo, manual ou intelectual, tornou-se respeitável, e na verdade são chamados produtivos o único modo aceito de se gastar a vida, e qualquer ocupação, a busca de qualquer objetivo que resulte posteriormente rentável. (HORKHEIMER, 2000, p. 48)

Diante dessa mercantilização, o homem não se reconhece mais no seu trabalho. Constata-se, então, condições propícias a adesão à razão instrumental, pois, o conhecimento produzido não possibilita o esclarecimento. O conhecimento científico nasce de uma promessa de libertação e emancipação dos mitos por meio do esclarecimento. No entanto, devido à lógica do sistema de produção, o conhecimento cientifico adere à razão instrumental, convertendo-se ele próprio em

mito, ou seja, naquilo do qual queria se libertar. Assim, nega o seu próprio papel, que ao invés de libertar o homem acaba aprisionando-o novamente, tornando-se, conforme Horkheimer e Adorno (1985), um esclarecimento totalitário, pois não permite a crítica.

Dessa forma, é preciso um processo de constante desnudamento, pois a dúvida e o questionamento os quais possibilitam a crítica, a reflexão, na desconstrução de dogmas, de mitos e, consequentemente, da produção de um conhecimento libertador devem estar sempre presentes no processo continuo de formação do professor. Sendo que "o esclarecimento é mais que esclarecimento; natureza que se torna perceptível em sua alienação" (HORKHEIMER e ADORNO, 1985, p. 50).

Realizar um estudo sistematizado acerca da concepção de razão que sustenta a formação do homem na atualidade, particularmente, no que se refere à formação cultural dos professores universitários, é manter um olhar na relação entre indivíduo e sociedade. Pois a crítica da razão é a crítica da formação do indivíduo e da sociedade.

Partindo-se dessas discussões teóricas, a pesquisa como um todo visou investigar professores das diferentes áreas de conhecimento, para averiguar se há uma relação diferenciada no que diz respeito à adesão a razão instrumental por parte dos professores, se a área de conhecimento do professor influência/ interfere ou não nesse processo de adesão, como também em seu processo de formação e, consequentemente, na sua autonomia, na sua emancipação. Em vista disso, na pesquisa aqui apresentada, os professores foram separados por áreas de saber/conhecimento dando origem a três sub-projetos envolvidos na pesquisa "Formação cultural resistência à razão instrumental dos professores universitários: um estudo na Universidade Federal de Goiás" . O primeiro sub-projeto constitui-se das "Ciências Exatas e da Terra", "Ciências Agrárias" e "Engenharias". O segundo, por "Ciências Humanas", "Ciências Sociais e Aplicadas", "Lingüística, Letras e Artes". O terceiro por "Ciências Biológicas" e "Ciências da Saúde". Dessa forma, o artigo apresentado é referente a um dos sub-projetos, sendo um recorte da discussão teórica na análise de conteúdo da primeira área de saber/conhecimento .

A análise de conteúdo foi realizada por meio da abordagem teórica que sustenta o projeto, com base nas respostas dos professores. As questões analisadas são provenientes dos cinqüenta e seis questionários catalogadas no

banco de dados da pesquisa anterior, sendo que na grande área de conhecimento selecionada para este sub-projeto, representa uma amostra de 20 questionários.

Cada questionário composto por trinta e nove questões, objetivas e discursivas, investiga as relações dos professores com a universidade tanto no seu aspecto funcional como em seu caráter formador, estendendo-se à dinâmica pessoal de cada professor a fim de apreender a formação em seu sentido global. As questões indagam se as condições objetivas no interior da universidade possibilitam a auto-reflexão crítica dos seus professores de modo a promover e estruturar sua formação e as possibilidades de resistência à adesão a razão instrumental.

A primeira questão analisada refere-se a apontam para aspectos a concretização da expectativa econômica financeira que para a maioria (0,8)[1] dos professores, não se realizou ao ingressar na universidade, sendo o salário insuficiente para a manutenção e auxiliado por outras fontes, seja por outras rendas ou outra atividade profissional, ou ainda pela atividade dos cônjuges. Segundo Resende (2005) a não-realização das expectativas dos professores interfere em sua função e formação, sendo que impede de investir em qualificações e mantém constante a preocupação com as necessidades básicas para a sobrevivência. Em termos de maior peso no orçamento, a maioria investe em instrução, seguido de planos de saúde, alimentação, moradia, transportes e lazer (viagens).

No aspecto da formação acadêmica dos professores, em seu início, a maioria (0,85) dos professores passou no vestibular em sua primeira opção e tentativa, tendo como motivo para a escolha do curso de graduação um ideal, seguido da motivação financeira, status social e familiar. Sendo em sua maioria um ideal, há que se questionar se esse ideal não é reduzido à racionalidade predominante ou se constitui como via de emancipação. Em muitas respostas se vincula a preferências pessoais ou vinculadas a status social.

O fato de ser professor para a maioria (0,65) dos respondentes influenciou na decisão pela busca da pós-graduação, sendo que a maioria cursou mestrado com auxílio de bolsa e o doutorado com auxílio de licença e bolsa. São poucos os professores que cursam pós-doutorado, e a maioria que pretende fazer é devido a exigências da carreira acadêmica.

[1] Os dados da pesquisa serão apresentados por meio de proporções, na razão: número de respostas por amostra total, correspondente a 20 professores. Essa opção se deve ao fato da amostra ser inferior a cem, impossibilitando a apresentação de dados por porcentagem.

Para a maioria dos professores (0,3), a função do professor acadêmico está vinculada a formação de competências, seguido de uma função de formação e produção de conhecimento. A docência é vinculada a uma transmissão técnica, que satisfaça à necessidade de atuação profissional do mercado de trabalho. Contudo, em algumas respostas, os professores sinalizam a preocupação não só com as competências, mas como uma formação humana, ainda que esta não se desvincule da burocracia que se constitui a função do professor universitário, doutor, dedicação exclusiva.

- *"O exercício da profissão de docência sempre foi um verdadeiro sacerdócio para aqueles que se dedicam ao ensino, à pesquisa e a extensão. Isto em função das dificuldades encontradas que vão desde a burocracia, inadequação do quadro de pessoal, principalmente de apoio, de infra-estrutura física, laboratorial e de gestão. Ser professor significa poder contribuir na formação profissional de jovens que ingressam na universidade com esperança de um futuro melhor. Essa formação deve compreender também lições de cidadania. Significa contribuir na capacitação de profissionais que optam pela docência e/ou pesquisa. Significa estreitar o relacionamento com a comunidade contribuindo não somente na formação de recursos humanos, se possível, prestando serviços de excelência"*[2]*(RESENDE, 2005).*

Sobre a função do professor, Adorno afirma que "o êxito como professor universitário dá-se evidentemente graças à ausência de todo cálculo sobre a aquisição de influência, à renúncia a qualquer tentativa de persuasão" (ADORNO, 1995, p. 90). O professor se torna somente um mediador do processo de estabelecer uma relação entre o aluno e o conhecimento, contudo, não se trata de habilitá-lo competentemente mas de proporcionar discussões e reflexões que o permitam pensar por si.

A explicitação da função docente como formador de competências corrobora para discordância da metade (0,5) dos professores em relação à formação acadêmica recebida na medida que apontam que *"[...] apesar de ter tido uma excelente formação acadêmica, não fui preparado para uma sala de aula. A maioria dos*

[2] As respostas dos professores apresentadas no decorrer da pesquisa encontram-se no Banco de Dados referente à pesquisa de doutorado da Profª Drª Maria do Rosário Silva Resende.
RESENDE, Maria do Rosário S. **Formação e autonomia do professor universitário: um estudo na Universidade Federal de Goiás**. 2005. São Paulo: PUC, 2005. Tese Doutorado em Psicologia Social.

professores que conheço vão se adaptando e melhorando com o tempo e por iniciativa própria"(RESENDE,2005). A discordância refere-se a uma formação pedagógica, escolar e acadêmica deficitária, pontuada pela dificuldade de lidar com questões que transcendem o nível técnico, partindo-se para a busca de conhecimentos complementares, seja através de cursos ou livros.

A necessidade de apreender o *"fator pedagógico"* e o manejo da sala de aula, como muitos professores apontam não é garantida por meio de cursos e formalizações, contudo, a disposição encontrada e aberta para buscar tais conhecimentos é que mantém o aspecto formativo em possibilidade, questionando as formações pedagógicas rígidas. A formação, "na verdade, ela nem ao menos corresponde ao esforço, mas sim à disposição aberta, à capacidade de se abrir a elementos do espírito, apropriando-se de modo produtivo na consciência [...]." (ADORNO, 1995, p. 64)

Outros fatores, em termos globais interferem na formação acadêmica. Para a maioria a família (0,75) é o maior fator de interferência na formação, seguido da classe social (0,6), religião (0,45), militância política (0,25) e atividades artísticas (0,20). Tais fatores evidenciam os aspecto global da formação que não se restringem à formação acadêmica, outros espaços cotidianos são formadores e fatores em maior ou menor nível de interferência.

Em termos da atuação do professor, a maioria (0,45) concorda que um professor deve atuar nas três áreas; ensino, pesquisa e extensão sendo que estas são apontadas como indissociáveis na universidade. No entanto muitos professores pontuam que não seria necessária uma atuação obrigatória de todos os professores nas três áreas, na medida do limite da individualidade de cada um, mas é caráter indiscutível quando se pensa na universidade como um todo.

- "*Acho que um profissional completo sim, mas não necessariamente todos os professores devem ter esse perfil. Acredito, todavia, que a instituição como um todo (universidade) deveria atuar nos três segmentos" (RESENDE, 2005).*

Uma outra ressalva feita à atuação nas três áreas refere-se à indisponibilidade de tempo, contudo, quando questionados sobre a carga horária, boa parte dos professores (0,5) afirmam ser adequada, pois se utilizam somente deste horário. Outra parte (0,4) aponta que a relação entre a carga horária e as atividades que realiza é inadequada pois se estende além do horário a ser cumprido, preenchendo os fins de semana e feriados. No aspecto da carga horária também se

relaciona a escolha pela dedicação exclusiva sem a qual muitos afirmam que não seria possível atuar no ensino, extensão e pesquisa além do incentivo econômico.

A rotina da universidade impõe também obstáculos para o aprofundamento dos estudos dos professores sendo que 0,65 afirmam não haver condições para tal devido ao excesso de atividades. A atuação do professor em vários segmentos é afetada não só pela exigência das atuações, mas pelas condições de trabalho. Para maioria dos professores (0,65) a atuação é afetada sendo de forma positiva ou negativa. Positivamente os professores ressaltam a autonomia de atuação, laboratórios/equipamentos adequados e incentivos à qualificação. Negativamente estão inclusos: a falta de política para a atuação, a falta de pessoal de apoio e a burocracia.

A falta de apoio humano é um questionamento relevante, sendo que a grande maioria dos professores (0,75) afirma que não há funcionários suficientes para dar suporte às suas atividades acadêmicas como docente. Sendo que as atividades realizadas pelos funcionários são avaliadas com baixa competência e com pouca boa vontade, o que não impede que a relação com estes seja boa (0,5), marcando uma contradição.

Outras relações apontadas como boas são as relações entre o corpo docente e a administração (0,55), corpo docente e discente (0,5) e corpo docente e adufg (0,55). As relações com o Ministério da Educação (0,55) e com a Associação Nacional dos Docentes do Ensino Superior – ANDES/SN (0,6) são consideradas ruins, enquanto que as relações entre o corpo docente a administração da universidade são consideradas medianas. Desse modo, a vida do professor é afetada não só por situações intrínsecas à sua atividade, mas à vida em sociedade. Segundo Resende (2005) o professor universitário se constitui nessa conexão entre a vida econômica da sociedade, que se sustenta no seu modo de produção, as transformações culturais e o seu desenvolvimento psíquico como indivíduo.

Questionados, se as condições concretas, objetivas, favorecem uma auto-reflexão crítica, metade dos professores responde afirmativamente, a outra nega. Mesmo para a outra metade dos professores que acreditam que as condições são favoráveis, existem sempre ressalvas em relação a estrutura, condições objetivas, e a falta de tempo. No entanto, há uma disposição para abrir-se à discussão e uma consciência da realidade, ainda que algumas dessas estejam intimamente vinculados à racionalidade atual. Para Adorno,

> [...] a formação cultural é justamente aquilo para o que não existem à disposição hábitos adequados; ela só pode ser adquirida mediante esforço espontâneo e interesse, não pode ser garantida simplesmente por meio da freqüência de cursos, e de qualquer modo estes seriam do tipo "cultura geral". (ADORNO, 1995, p.64)

- "*Se o docente procura dar o melhor de si, mesmo com baixas condições de trabalho, há a possibilidade de fazer tal análise. Mesmo tendo conhecimento de que poderíamos trabalhar em melhores condições e que estas condições não nos são oferecidas por falta de vontade política, acreditamos que podemos fazer muito com o pouco que temos. Mas não é por isso que deixaremos de lutar para mais verbas, mais autonomia, etc" (RESENDE, 2005).*

Para a outra metade dos professores que avaliam as condições objetivas de forma desfavorável, as considerações são semelhantes, pois estão sempre dirigidas a estrutura física e política da universidade. Outro ponto recorrente diz respeito à falta de interesse de alguns professores para fazer uma discussão. No entanto, essa recusa é problemática pois é preciso refletir e não se conformar diante das constatações da realidade, avaliando as conseqüências para o próprio trabalho, na medida em que a formação é um abrir-se questionador e não somente delator.

- *"O cotidiano é muito denso de trabalho, o que me impede não maioria do tempo de para e de fazer uma auto-reflexão crítica. Por outro lado, o idealismo de sempre querer ser um bom profissional me obriga a para de vez em quando e analisar onde, quando e como posso melhorar na minha profissão (faço isso esporadicamente)" (RESENDE, 2005).*

A produtividade do professor no contexto de trabalho acadêmico é um aspecto de importante análise no conjunto da formação acadêmica e da adesão à razão instrumental, sendo que uma parte dos professores (0,3) vincula-a diretamente às atividades de ensino, pesquisa e extensão. A maioria (proporção de 0,45), admite que uma entre as três atividades aparece de forma predominante. Outras pontuações, mínimas, referem-se a atividades administrativas/financeiras.

A partir da classificação dessas respostas observa-se que a produtividade é estabelecida com base nos critérios oficiais de avaliação, direcionando as atividades dos professores, na medida em que estes são pontuados pelas mesmas. Para muitos professores, a qualidade do ensino está vinculada à produção através das atividades de ensino.

- "*Produção científica comprovada capacidade/ competência para a orientação de atividades de pesquisa, atividade docente" (RESENDE, 2005).*
- "*Cumprir suas atividades, de formação do profissional (oferecer disciplinas, orientar em estágios, monitorias, iniciação científica, etc.) realizar e divulgar suas pesquisas, dar respostas à comunidade em geral. Se o professor não realiza todas essas atividades, na maioria das vezes a qualidade de ensino é reduzida" (RESENDE,2005).*

As respostas dos professores revelam uma conformidade com o modo de produção estabelecido, internalizando os critérios de avaliação impostos às universidades (ensino/aulas, pesquisa/publicações/produtos e projetos de extensão). Por outro lado, alguns dos professores dessa área, indicam em suas respostas uma preocupação com a formação dos alunos e, com a postura do professor.

- "*Não tenho como ser objetivo na resposta, mas posso sonhar: fazer dos egressos (1) cidadãos conscientes e (2) mais preparados para o desempenho das atividades profissionais em relação aos mesmos seres humanos que ingressaram, tudo isto com limitação de recursos. Ou seja, uma relação positiva do que entra pelo que sai, com restrição a recursos a serem despendidos no processo" (RESENDE,2005).*

Outro fator que está muito vinculado à produtividade, são as condições oferecidas pela universidade que se colocam como obstáculo para a mesma. Existe também uma preocupação em se produzir de acordo com os "interesses" da sociedade, o que mantém a lógica da razão instrumental, na medida em que se produz um conhecimento que reforce a sociedade atual.

- "*Ser produtivo é pesquisar o que interessa a sociedade. É ver o resultado da sua pesquisa sendo usado pelo povo (industria, comercio, serviços e agricultura). Muito diferente de contar artigos, feitos muitas vezes por alunos da pós-graduação" (RESENDE, 2005).*

Mesmo diante da conformação aos modos de produção impostos a universidade, são apontados indícios de resistência à razão instrumental, ainda que mesclados a essas políticas educacionais. Em uma das respostas encontra-se que "*O professor produtivo é aquele que desempenha o seu trabalho com dedicação e qualidade e com muito amor*" *(RESENDE, 2005)*.Tal afirmação corrobora o que Adorno expõe em seu texto *Educação após Auschwitz*, que "a capacidade de amar, que de alguma maneira sobrevive, eles precisam aplicá-lá aos meios" (1995, p. 133).

Esse amor, segundo Adorno (1995) não consiste em uma pregação do mesmo ou em um idealismo, mas na *capacidade de identificação*, visto que a incapacidade para tal foi condição psicológica para que Auschwitz se tornasse possível. Sendo assim, a maior exigência para a educação é de que Auschwitz não se repita e para tanto, é necessária uma educação dirigida para a auto-reflexão crítica.

No sentido de uma auto-reflexão crítica, se perguntou aos professores se havia condições de se fazer uma análise reflexiva da sua prática em relação a sua postura teórica. A maioria dos professores que responderam a essa questão (0,72) afirmam que é possível, apenas 0,27 dos professores indicam que é impossível com a carga de trabalho existente, fazerem uma análise reflexiva de sua prática, de sua adesão teórica. Portanto, a impossibilidade de uma análise reflexiva é justificada em grande parte pelo excesso de atividades, e a possibilidade se apresenta somente em atividades destinadas a esse fim.

- "*Temos tantas atividades que não paramos para pensar em nada desta natureza" (RESENDE, 2005).*

Mesmo com o excesso de atividades, para outros professores, a possibilidade de uma análise reflexiva é apresentada a partir de diversos fatores: no tempo destinado aos estudos, no cumprimento do cargo de professor, nas reuniões com alunos e professores e no cotidiano.

- "*Refletir sobre sua conduta profissional, pessoal-familiar, econômica e social é uma atividade efetuada diariamente. A origem dos conflitos e a forma de tentar resolve-los" (RESENDE, 2005)*

Observa-se que para esses professores existem formas de realizar uma reflexão, ainda que seja a partir de reuniões, ou de um ajustar-se ao tempo que lhe permitido. Segundo Resende (2005) é preciso de um mínimo de adaptação para desenvolver uma consciência verdadeira, é preciso estar aberto para novas experiências.

A última questão em destaque analisada solicita uma definição da autonomia como professor no interior da universidade. Para uma parte dos professores (0,26) existe uma autonomia didática, de pesquisa e extensão, sendo que, para outros (0,26) a autonomia é *"relativa e restrita a determinados setores do trabalho"*, vinculada à diversidade de cargos administrativos e o poder conferido a estes. Para a grande maioria, (0,31) há uma autonomia, não especificada na medida em que as respostas são taxativas e curtas, afirmando uma autonomia "*plena*".

Diante da diversidade de apontamentos em relação à autonomia, constata-se que o entendimento do conceito limita-se a um “fazer por si mesmo”, a partir de um lugar que não privilegia o “outro”. Contudo, autonomia, é um pensar crítico, reflexivo, constante. Assim, a partir do entendimento de uma relação dialética, Marcuse (1998) expõem que os meios devem sustentar os fins, logo não se trata de decidir sozinho, mas decidir para promover “o progresso humano na liberdade” (MARCUSE, 1998, p. 151).

Considerações finais

Nesse sentido, mediante a análise apresentada, conclui-se que existem fatores de resistência, assim como de adesão à razão instrumental e tal duplicidade é devido, segundo Adorno (1996), ao aspecto defensivo da cultura, pois exclui o que possa identificar seu caráter suspeito. Assim, “a única possibilidade de sobrevivência que resta à cultura é a auto-reflexão crítica sobre a semiformação, em que necessariamente se converteu.” (ADORNO, 1996, p. 410).

Há sem dúvida professores que se submetem de modo irrefletido, conformado, e professores que tem uma clareza do sistema em que estão imersos e criam modos, experiências, capazes de produzir auto-reflexão sobre si mesmo e sobre o trabalho que desenvolvem. O fato de se estar vinculado a uma determinada grande área de conhecimento é fator de interferência mínima para o processo de adesão à razão instrumental, sendo que este processo, ao ser comparado com as outras duas grandes áreas (Biológicas e Humanas) dos sub-projetos que compõem o projeto de pesquisa encontra as mesmas ressonâncias mantendo suas particularidades.

Os fatores de adesão e instrumentalização da razão não são determinados pela pertença ou não a uma determinada área de conhecimento ou a um aspecto formativo. Antes, estão vinculados ao conjunto da realidade social, à lógica que permeia e determina os processos econômicos e penetra na vida social, reduzindo as singularidades tornando o indivíduo irreconhecível a si, mas idêntico à realidade dominada. E nesse mundo instrumentalizado, o professor universitário, “[...]o indivíduo só sobrevive enquanto núcleo impulsionador de resistência” (ADORNO, 1995, p. 154).

É preciso, como afirma Resende (2005), encontrar brechas em meio a tal racionalidade, a tais condições, para promover resistências frente à

instrumentalização da razão. Logo, é necessário comprometer-se com o desenvolvimento de indivíduos autônomos, não-conformados, condição essencial para a constituição de uma verdadeira formação cultural, não só de professores, mas também dos alunos.

A possibilidade de discussão da temática da formação cultural em seu aspecto global permite o movimento dialético de crítica da sociedade e do conhecimento que em reciprocidade promovem reflexões que são a base para transformação da sociedade, para uma verdadeira formação. Por fim, esta pesquisa para além de uma contribuição em nível acadêmico e social, proporcionou experiências formativas que vão além do apreendido em sala de aula, constituindo um espaço de auto-reflexão e crítica na tentativa de constituição não só professores autônomos e emancipados, mas também alunos. Sem dúvida, o contato com a iniciação científica foi uma excelente experiência formativa no interior da universidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ADORNO, Theodor W. **Educação e Emancipação**. Tradução Wolfgang Leo Maar. Rio de Janeiro: Paz e Terra, 1995.

_____. Tabus que pairam sobre a profissão de ensinar. In: ADORNO, Theodor W. **Palavras e Sinais: modelos críticos 2**. Tradução de Maria Helena Ruschel; supervisão de Álvaro Valls. Petrópolis: Vozes, 1995.

_____. Teoria da semicultura. **Educação & Sociedade: revista quadrimestral de Ciência da Educação/ Centro de Estudos Educação e Sociedade (Cedes)**, São Paulo, v. XVII, nº 56, p. 388-411, dez, 1996.

HORKHEIMER, Max, ADORNO, Theodore W. O conceito de esclarecimento. In: **Dialética do esclarecimento**. Tradução Guido Antonio de Almeida. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 1985.

HORKHEIMER, Max. Meios e fins. In:_____**Eclipse da razão**. São Paulo: Centauro Editora, 2000.

MARCUSE, Herbert. Ética e revolução. In:_____**Cultura e Sociedade, volume II/Herbert Marcuse**. Rio de Janeiro: Paz e Terra, 1998.

RESENDE, Maria do Rosário S. **Formação e autonomia do professor universitário: um estudo na Universidade Federal de Goiás**. 2005. São Paulo: PUC, 2005. Tese Doutorado em Psicologia Social.

Efeitos de Correlação Eletrônica sobre a Primeira Hiperpolarizabilidade de Cadeias de Poliacetileno Fluoretadas.

L. M. de Abreu, T. L. Fonseca*

Instituto de Física, Universidade federal de Goiás, CP 131, 74001-970, Goiânia, GO, Brasil.

E-mail: tertius@if.ufg.br

Resumo

Com os métodos *ab initio* de Hartree-Fock (HF) e de Möller-Plesset em segunda ordem (MP2) investigamos o impacto direto e o indireto da inclusão de efeitos de correlação eletrônica sobre propriedades elétricas de cadeias de poliacetileno fluoretadas ($C_{2n}F_nH_{n+2}$). Usando parâmetros geométricos convergidos calculamos as propriedades elétricas longitudinais desses sistemas com os modelos MP2/6-31G(d) e HF/6-31G(d). Os resultados obtidos mostram que a inclusão dos efeitos de correlação eletrônica aumenta substancialmente o valor da primeira hiperpolarizabilidade das cadeias de poliacetileno fluoretadas. Utilizando razões convergidas entre os resultados MP2 e HF determinamos para o momento de dipolo e a primeira hiperpolarizabilidade os valores assintóticos de 0.251 u.a. e 25345.90 u.a., respectivamente. Para a polarizabilidade linear por subunidade o valor assintótico é de 452.67 u.a..

Palavras chave: Hiperpolarizabilidade, Möller-Plesset, Poliacetileno Fluoretado.

1. Introdução

Nos últimos anos, as propriedades óticas não lineares (NLO) de polímeros orgânicos conjugados têm sido estudadas visando futuras aplicações em tecnologias fotônicas [1-3]. Um dos aspectos importantes para a aplicabilidade de materiais orgânicos é que as moléculas constituintes devem apresentar grandes primeiras hiperpolarizabilidades (β). Do ponto de vista microscópico, essa condição pode ser obtida combinando-se os efeitos de delocalização eletrônica e assimetria na

distribuição de cargas [4,5]. A delocalização é fornecida por um segmento conjugado contendo ligações simples e múltiplas o que torna a distribuição dos elétrons π altamente deformável sob a ação de um campo elétrico externo. A assimetria pode ser obtida por meio da incorporação, nas extremidades da cadeia, de átomos ou grupos com diferentes afinidades eletrônicas, isto é, grupos doadores (D) e aceitadores (A) de elétrons. Nesses compostos os valores de β/N - em que N é o número de subunidades – em função do crescimento da cadeia tendem a zero como uma conseqüência da diminuição do acoplamento entre os grupos D-A. Outra classe de cadeias orgânicas que têm sido analisadas são os sistemas do tipo AB, nos quais a assimetria é fornecida por átomos de diferentes afinidades eletrônicas presentes ao longo do segmento conjugado. Diferentemente dos D-A, o comportamento assintótico de β/N para as cadeias AB é diferente de zero devido à distribuição assimétrica de cargas em cada subunidade.

No trabalho anterior [6] o método de Hartree-Fock (HF) foi usado para determinar a estrutura eletrônica e as polarizabilidades de cadeias de poliacetileno fluoretadas (PFHA). Neste trabalho realizamos um estudo *ab initio* usando o método de Möller-Plesset em Segunda Ordem (MP2) [7] do momento de dipolo, da polarizabilidade linear e da primeira hiperpolarizabilidade de cadeias de PFHA. Os resultados mostram que a inclusão de efeitos de correlação eletrônica (CE) aumenta os valores obtidos para a primeira hiperpolarizabilidade, isso sugere de forma mais forte que substituições laterais de átomos em cadeias poliméricas podem gerar materiais com NLO mais eficientes. Devemos ressaltar, entretanto, que para as cadeias de PFHA os valores de β/N em função do crescimento da cadeia tendem a zero de forma similar ao comportamento observado para cadeias com grupos D-A.

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo investigar os efeitos de correlação eletrônica sobre as propriedades elétricas das cadeias de poliacetileno fluoretadas. Para acessar tais efeitos comparamos os cálculos HF e MP2 obtidos para o momento de dipolo, a polarizabilidade linear e a primeira hiperpolarizabilidade em função do crescimento das cadeias poliênicas.

3. Metodologia

A geometria convergida (GC-HF) e as polarizabilidades para a geometria convergida determinadas pelo método de Hartree-Fock foram apresentados no trabalho anterior [6]. No mesmo trabalho mostramos que o conjunto de funções base 6-31G(d) é apropriado para uma descrição adequada das propriedades elétricas das cadeias de PFHA.

Neste trabalho o impacto direto de efeitos de correlação eletrônica foi determinado através de cálculos das polarizabilidades no nível MP2 para a GC-HF. Realizamos também a otimização de geometria das cadeias de PFHA representadas pela série $C_{2n}F_nH_{2n+2}$, com até 40 átomos de carbono, usando o modelo MP2/6-31G(d). Para o estudo do impacto indireto, determinamos primeiramente a geometria convergida no nível MP2 (GC-MP2) obtida a partir dos parâmetros geométricos otimizados (que para esse segmento conjugado já estavam convergidos) do oligômero com n = 20. Para as cadeias com GC-MP2 as polarizabilidades foram obtidas nos níveis HF e MP2 com o conjunto de funções base 6-31G(d).

Considerando que as componentes longitudinais das respostas elétricas são os termos dominantes, todas as cadeias foram orientadas ao longo do eixo y (direção longitudinal). Aqui, as propriedades elétricas das cadeias de PFHA foram determinadas numericamente pela técnica de campo finito. Essa técnica se baseia na perturbação da energia eletrônica usando valores de campo elétrico. Assim, o momento de dipolo, a polarizabilidade linear e a primeira hiperpolarizabilidade podem ser determinados por meio de ajustes de mínimos quadrados dos valores da energia eletrônica total escrita em termos de uma série de potências na intensidade do campo elétrico [8]:

$$E = E_0 - \mu_y F_y - \alpha_{yy} F_{yy} - \beta_{yyy} F_{yyy}$$

Nesta expressão F representa o campo elétrico externo aplicado ao longo do eixo y, E_0 representa a energia da molécula na ausência de campo, μ_y representa o momento de dipolo permanente e α_{yy} e β_{yyy} representam as componentes longitudinais da polarizabilidade linear e primeira hiperpolarizabilidade, respectivamente. Todos os cálculos foram realizados usando o programa Gaussian03 [9].

4. Resultados e Discussão

3.1 Geometria

A Figura 1 e a Tabela 1 apresentam os parâmetros geométricos para as partes central e terminais das cadeias de PFHA para 2 ≤ n ≤ 20 obtidos a partir da otimização completa das geometrias no nível MP2/6-31G(d). As geometrias de equilíbrio mostram que as cadeias são lineares e planas, desta forma, a direção longitudinal (y) foi definida contento o centro das duplas ligações das extremidades da cadeia (ver Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da molécula ($C_8F_4H_6$) de PFHA.

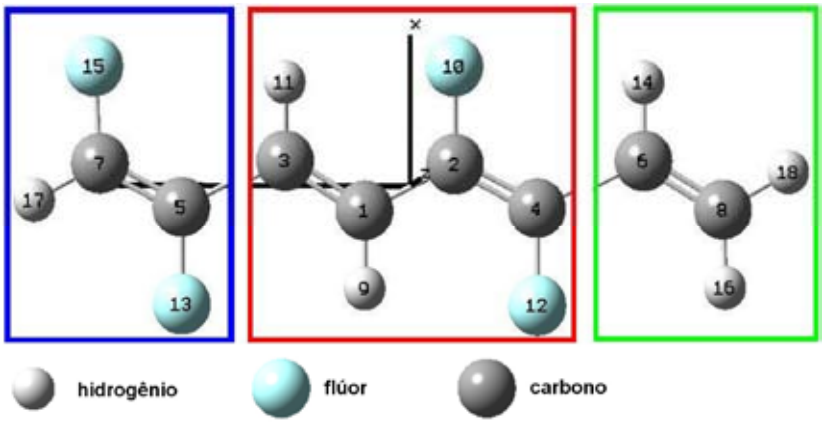


Tabela 1. Parâmetros geométricos otimizados para o oligômero $C_{2n}F_nH_{n+2}$ com 2 < n < 20 obtidos no nível MP2/6-31G(d).

	Distâncias (Å)										
n	C_5C_7	C_1C_3	C_1C_2	C_2C_4	C_6C_8	C_7H_{17}	C_7F_{15}	C_1H_9	C_2F_{10}	C_8H_{16}	C_8H_{18}
2	-	1.340	1.449	1.342	-	1.082	1.356	1.086	1.364	1.084	1.084
4	1.343	1.356	1.434	1.354	1.345	1.083	1.354	1.085	1.363	1.084	1.084
6	1.343	1.361	1.428	1.359	1.346	1.083	1.353	1.085	1.363	1.084	1.084
8	1.344	1.365	1.424	1.362	1.346	1.083	1.353	1.086	1.362	1.084	1.084
10	1.344	1.366	1.422	1.364	1.346	1.083	1.353	1.086	1.362	1.084	1.084
12	1.344	1.367	1.421	1.365	1.346	1.083	1.353	1.086	1.362	1.084	1.084
14	1.344	1.368	1.420	1.365	1.346	1.083	1.353	1.086	1.362	1.084	1.084
16	1.344	1.369	1.420	1.366	1.346	1.083	1.353	1.086	1.362	1.084	1.084
18	1.344	1.369	1.419	1.366	1.346	1.083	1.353	1.086	1.362	1.084	1.084
20	1.344	1.369	1.419	1.366	1.346	1.083	1.353	1.086	1.362	1.084	1.084

	Ângulos (°)									
n	$C_7C_5C_3$	$C_3C_1C_2$	$C_1C_2C_4$	$C_4C_6C_8$	$C_1C_2H_9$	$C_1C_2F_{10}$	$C_5C_7H_{17}$	$C_5C_7F_{15}$	$C_6C_8H_{16}$	$C_6C_8H_{18}$
2	-	126.63	122.91	-	115.68	116.56	125.37	119.82	121.60	120.89
4	126.53	126.72	122.56	122.99	116.65	116.57	125.34	119.72	121.64	120.82
6	126.51	126.68	122.54	123.00	116.72	116.91	125.34	119.71	121.64	120.82
8	126.50	126.67	122.54	122.99	116.77	117.02	125.34	119.70	121.64	120.82
10	126.49	126.65	122.55	122.99	116.79	117.11	125.33	119.70	121.64	120.82
12	126.49	126.65	122.54	122.99	116.82	117.14	125.33	119.70	121.64	120.82
14	126.49	126.64	122.56	122.99	116.83	117.18	125.33	119.70	121.64	120.82
16	126.49	126.64	122.55	122.99	116.84	117.19	125.33	119.70	121.64	120.82
18	126.49	126.64	122.56	122.99	116.84	117.21	125.33	119.70	121.64	120.82
20	126.48	126.64	122.55	122.99	116.84	117.21	125.33	119.70	121.64	120.82

O padrão de convergência dos parâmetros geométricos dos oligômeros de tamanho crescente (ver Tabela 1) nos permitiu definir uma geometria convergida para esses compostos. Desta forma, as propriedades elétricas longitudinais puderam ser determinadas para moléculas maiores, com até 100 átomos de carbono no nível HF e até 36 átomos de carbono no nível MP2. Os resultados mostram que efeitos de correlação eletrônica afetam levemente os comprimentos e ângulos de ligação das cadeias de PFHA. As alterações mais significativas nos comprimentos e nos ângulos de ligação acontecem para a parte central das cadeias, em particular para os comprimentos C_1C_3, C_2C_4 e para o ângulo $C_1C_2C_3$ em que as variações são da ordem de 3.0%. É importante observar que, diferentemente do que ocorre para os comprimentos e ângulos de ligação, a inclusão de efeitos de CE altera de forma importante os valores obtidos para o grau de alternância dos comprimentos de ligação.

Estudos teóricos têm mostrado que variações no grau de alternância dos comprimentos de ligação (Δr) [definido como a diferença entre os comprimentos das ligações simples e dupla] podem provocar mudanças substanciais nas respostas elétricas de moléculas orgânicas conjugadas [1,2]. Para as cadeias de PFHA podemos definir, na unidade central, dois parâmetros geométricos: um (Δr^a) envolvendo a ligação dupla (-HC=CH-) e outro (Δr^b) envolvendo a ligação dupla (-FC=CF-). A Tabela 2 apresenta os resultados de Δr^a e Δr^b das cadeias de PFHA obtidos para as geometrias otimizadas nos níveis MP2/6-31G(d) e HF/6-31G(d).

Tabela 2. Grau de alternância dos comprimentos de ligação (Å) da subunidade central dos oligômeros ($C_{2n}F_nH_{n+2}$) obtidos com geometria otimizada.

	Δr^a			Δr^b		
n	MP2	HF	Δ%	MP2	HF	Δ%
2	0.107	0.146	26.7	0.109	0.139	21.6
4	0.080	0.123	35.0	0.078	0.126	38.1
6	0.069	0.119	42.0	0.067	0.122	45.1
8	0.062	0.118	47.5	0.059	0.121	51.2
10	0.058	0.118	50.8	0.056	0.120	53.3
12	0.056	0.118	52.5	0.054	0.120	55.0
14	0.055	0.117	53.0	0.052	0.120	56.7
16	0.054	0.117	53.8	0.051	0.120	57.5
18	0.053	0.117	54.7	0.050	0.120	58.3
20	0.053	0.117	54.7	0.050	0.120	58.3

Os resultados mostram que o padrão de convergência observado no nível HF se mantém nos cálculos MP2, no entanto, a inclusão de efeitos de correlação eletrônica têm grande impacto sobre os valores de Δr. Para a cadeia com n = 20 os valores MP2 para Δr^a e Δr^b são, respectivamente, 0.053 Å e Δr^b = 0.050 Å. Isto representa uma redução de 54.7% e 58.3% quando comparados com os correspondentes valores obtidos no nível HF [6]. Devemos ressaltar que a redução no valor de Δr favorece o aumento da delocalização dos elétrons π ao longo do segmento conjugado. Note que a inclusão de átomos de flúor leva a uma leve assimetria nos valores de Δr na parte central da cadeia. Esta leve diferença também é observada para as partes terminais da cadeia.

Os valores dos parâmetros geométricos convergidos, obtidos a partir da geometria de equilíbrio do oligômero com n = 20, nos modelos MP2/6-31G(d) e HF/6-31G(d), são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros geométricos convergidos para cadeias de PFHA obtidos nos modelos MP2/6-31G(d) e HF/6-31G(d).

	Centro			Extremidades	
Distâncias (Å)	MP2	HF		MP2	HF
C_1C_3	1.369	1.328	C_5C_7	1.344	1.316
C_1C_2	1.419	1.448	C_6C_8	1.346	1.322
C_2C_4	1.366	1.331	C_7F_{15}	1.353	1.328
C_1H_9	1.086	1.072	C_8H_{17}	1.083	1.070
C_2F_{10}	1.362	1.334	C_8H_{18}	1.084	1.072

Ângulos (°)		MP2	HF		MP2	HF
	$C_1C_2C_3$	122.55	122.80	$C_3C_5C_7$	126.48	126.64
	$C_1C_2C_4$	126.64	126.56	$C_4C_6C_8$	122.99	123.39
	$C_1C_2H_9$	116.84	116.08	$C_5C_7F_{15}$	119.70	120.59
	$C_1C_2F_{10}$	117.21	115.90	$C_5C_7H_{17}$	125.33	124.83
				$C_6C_8H_{16}$	121.64	122.09
				$C_6C_8H_{18}$	120.82	120.78

3.2 Distribuição de Cargas e Momento de Dipolo

Um parâmetro importante para avaliação da assimetria ao longo da cadeia poliênica é a distribuição de cargas na subunidade central e nas extremidades da molécula. A magnitude da carga na subunidade central (Δq) é definida de forma conveniente como a soma das cargas parciais associadas às ligações duplas na subunidade central [$\Delta q = q^{C1C3} + q^{C2C4}$]. De forma similar a magnitude da carga nas extremidades (Δq^F e Δq^H) é definida como a soma das cargas parciais associadas às ligações duplas das extremidades da cadeia [$\Delta q^F = q^{C5C7}$] e [$\Delta q^H = q^{C6C8}$]. A Tabela 4 apresenta os valores de Δq, Δq^F e Δq^H obtidos a partir das cargas de Mulliken para as geometrias GC-HF e GC-MP2.

Tabela 4. Distribuição de cargas na subunidade central e nas extremidades das cadeias de PFHA.

	GC-HF		GC-MP2	
	HF/6-31G(d)	MP2/6-31G(d)	HF/6-31G(d)	MP2/6-31G(d)
N	Δq (e)	Δq (e)	Δq (e)	Δq (e)
1	- 0.408	- 0.358	- 0.417	- 0.365
2	- 0.037	- 0.032	- 0.032	- 0.029
3	- 0.012	- 0.011	- 0.013	- 0.012
4	- 0.006	- 0.006	- 0.008	- 0.007
5	- 0.004	- 0.003	- 0.005	-0.005
6	- 0.003	- 0.003	- 0.004	- 0.004
7	- 0.002	- 0.002	- 0.003	- 0.003
8	- 0.001	- 0.001	- 0.002	- 0.002
9	- 0.001	- 0.001	- 0.002	- 0.002

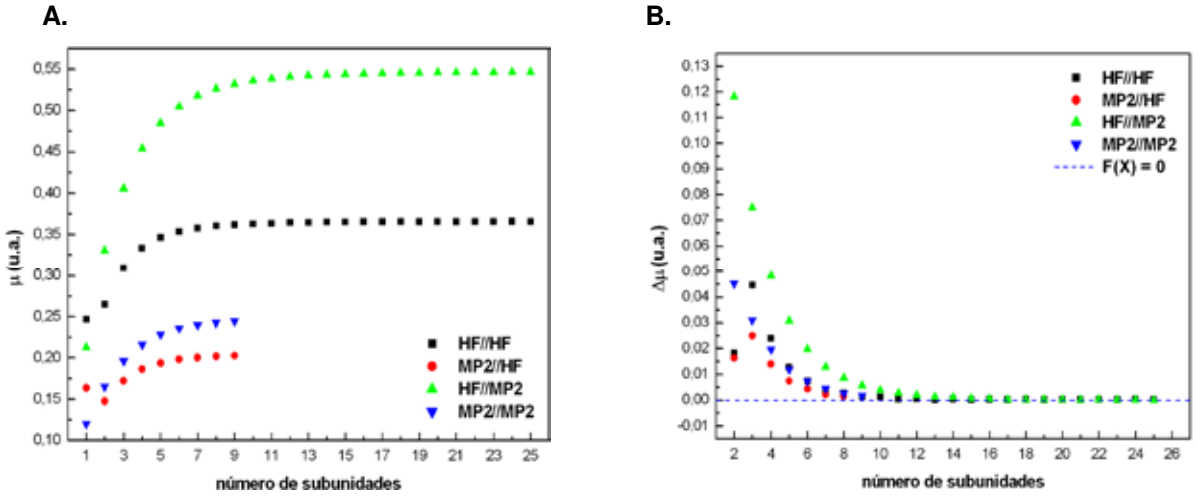
	GC-HF		GC-MP2	
	HF/6-31G(d)		MP2/6-31G(d)	
N	Δq^F (e)	Δq^H (e)	Δq^F (e)	Δq^H (e)
2	0.001	0.036	0.018	0.010

3	0.004	0.037	0.025	0.010
4	0.006	0.038	0.028	0.009
5	0.007	0.038	0.030	0.009
6	0.007	0.038	0.031	0.008
7	0.007	0.038	0.032	0.008
8	0.007	0.038	0.032	0.008
9	0.007	0.038	0.032	0.008

Os resultados apresentados mostram que Δq decresce e tende a zero com o aumento da cadeia poliênica, enquanto que Δq^F e Δq^H exibem um padrão de convergência. Este comportamento reflete a importância da contribuição das extremidades da molécula na assimetria da distribuição de cargas para cadeias maiores e sugere um padrão de convergência para momento de dipolo e para a primeira hiperpolarizabilidade.

Os resultados obtidos mostram que o momento de dipolo deste sistema cresce rapidamente para cadeias menores e segue um regime de saturação com o crescimento da cadeia poliênica, ver Figura 2A. O regime de saturação desta propriedade é evidenciado na Figura 2B que ilustra o comportamento do momento de dipolo por subunidade [Δμ = |μ(N) - μ(N-1)|]. Note que o valor de Δμ tende a zero com o incremento de subunidades.

Figura 2. Momento de dipolo (esquerda) e momento de dipolo por subunidade (direita) para as cadeias de PFHA.



Em geral, efeitos de CE têm grande impacto sobre as propriedades elétricas de polímeros. Os efeitos de CE afetam de duas maneiras as propriedades elétricas de

sistemas poliméricos. Mudanças na estrutura eletrônica têm um impacto direto, enquanto que alterações na geometria de equilíbrio têm um impacto indireto sobre as propriedades elétricas de cadeias poliméricas. Em comparação com os resultados HF/6-31G(d)//HF/6-31G(d) (notação usual que representa: modelo de cálculo das propriedades elétricas//método de otimização de geometria), a inclusão do efeito direto de CE (MP2//HF) diminui os valores para o momento de dipolo das cadeias de PFHA, enquanto que a inclusão do efeito indireto de CE (HF//MP2) aumenta. Para a cadeia com N = 9, por exemplo, os resultados obtidos incluindo os efeitos direto e indireto são, respectivamente, 0.203 u.a. e 0.532 u.a.. Isto representa uma redução da ordem de 44.1% no primeiro caso e um aumento da ordem de 46.6 % no segundo em relação ao correspondente valor HF//HF do momento de dipolo.
Embora os resultados apresentados não mostrem o valor convergido, uma estimativa bastante realista para o momento de dipolo incluindo os efeitos de CE pode ser dada a partir do fator de escala definido pela razão entre os resultados MP2 e HF. A Tabela 5 apresenta as razões (R_μ) entre os resultados MP2 e HF obtidos para μ_y com geometrias GC- MP2 e GC- HF.

Tabela 5. Razão entre os momentos de dipolo obtidos para geometrias convergidas nos níveis MP2 e HF.

	R_μ				
N	(MP2//HF) / (HF//HF)	(HF//MP2) / (HF//HF)	(MP2//MP2) / (HF//HF)	(MP2//MP2) / (MP2//HF)	(MP2//MP2) / (HF//MP2)
1	0.66	0.86	0.47	0.73	0.56
2	0.56	1.25	0.63	1.13	0.50
3	0.56	1.31	0.64	1.15	0.49
4	0.56	1.36	0.65	1.16	0.47
5	0.56	1.40	0.66	1.18	0.47
6	0.56	1.43	0.67	1.19	0.47
7	0.56	1.45	0.67	1.19	0.46
8	0.56	1.46	0.67	1.20	0.46
9	0.56	1.47	0.68	1.20	0.46

Observe que a razão MP2//HF/HF//HF converge rapidamente. Esta rápida convergência nos permite incorporar a contribuição direta dos efeitos de correlação eletrônica ao momento de dipolo por meio do fator de escala $R_\mu^{MP2//HF/HF//HF} = 0.56$. Usando esse fator de escala, o valor estimado para o momento de dipolo das cadeias de PFHA incluindo o efeito direto de CE é da ordem de 0.203 u.a.. Note que

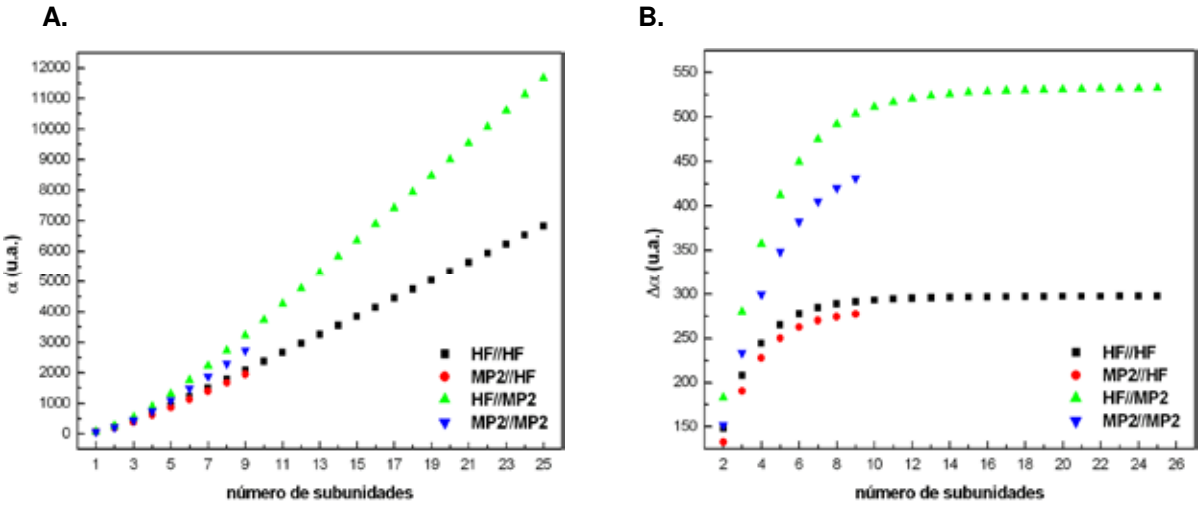
o resultado assintótico para o momento de dipolo pode ser obtido diretamente a partir dos cálculos HF usando a GC-MP2. Neste caso o valor estimado incluindo o efeito indireto de CE é de 0.546 u.a..

O momento de dipolo das cadeias de PFHA combinando os efeitos direto e indireto de CE foi obtido a partir da razão convergida MP2//MP2/HF//MP2, $R_{\mu}^{MP2//MP2/HF//MP2}$ = 0.46. Para μ_y o modelo MP2//MP2 prediz um valor assintótico de 0.251 u.a..

3.3 Polarizabilidade Linear

Os comportamentos da polarizabilidade linear e da polarizabilidade linear por subunidade [$\Delta\alpha = |\alpha(N) - \alpha(N-1)|$] em função do crescimento da cadeia são apresentados na Figura 3.

Figura 3. Polarizabilidade linear (esquerda) e polarizabilidade linear por subunidade (direita) para as cadeias de PFHA.



Como esperado, os resultados obtidos mostram que a polarizabilidade linear tanto para os cálculos HF quanto para os cálculos MP2 cresce com o número N de subunidades do oligômero. É importante observar que para cadeias maiores, N ≥ 7, α exibe um crescimento linear com N. Este comportamento reflete o caráter aditivo desta propriedade. Como a polarizabilidade linear não depende da assimetria, mas da delocalização eletrônica, os altos valores obtidos para esta propriedade mostram que os elétrons π deste sistema possuem grande mobilidade. Devemos ressaltar que a inclusão do efeito direto de correlação eletrônica reduz levemente enquanto a inclusão do efeito indireto aumenta substancialmente os valores obtidos para a

polarizabilidade linear das cadeias de PFHA. Por exemplo, para a cadeia com N = 9, os valores da polarizabilidade linear considerando o efeito direto e o efeito indireto de CE são, respectivamente, 1951.77 u.a. e 3229.83 u.a.. Isto representa, no primeiro caso, uma redução da ordem de 6.2 % e, no segundo caso, um aumento da ordem de 40.5% em relação ao correspondente valor HF//HF. Note que Δα cresce inicialmente com aumento do número de subunidades e segue um padrão de convergência para cadeias maiores, comportamento também apresentado por outros polímeros conjugados.

As razões (R_α) entre os resultados MP2 e HF obtidos para a polarizabilidade linear com geometrias GC-MP2 e GC-HF são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Razão entre as polarizabilidades lineares obtidas para geometrias convergidas nos níveis MP2 e HF.

	R_α				
N	(MP2//HF) / (HF//HF)	(HF//MP2) / (HF//HF)	(MP2//MP2) / (HF//HF)	(MP2//MP2) / (MP2//HF)	(MP2//MP2) / (HF//MP2)
1	0.91	1.07	0.94	1.04	0.89
2	0.90	1.18	1.00	1.11	0.85
3	0.91	1.26	1.06	1.17	0.84
4	0.92	1.33	1.12	1.22	0.84
5	0.92	1.40	1.18	1.27	0.84
6	0.93	1.45	1.22	1.32	0.84
7	0.93	1.49	1.26	1.35	0.85
8	0.94	1.52	1.29	1.38	0.85
9	0.94	1.55	1.32	1.41	0.85

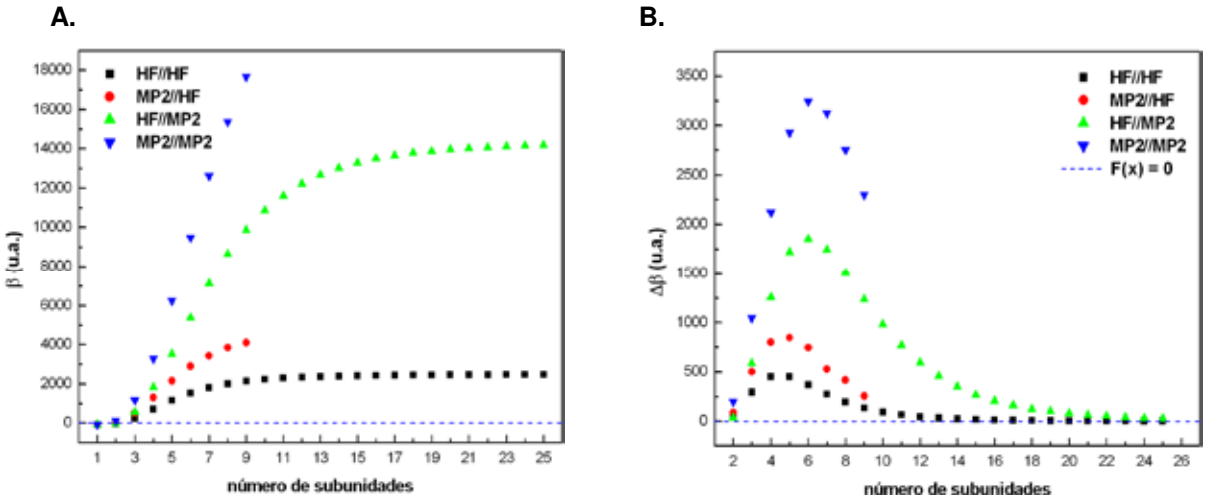
Observe que as razões (R_α) entre os resultados MP2 e HF para a polarizabilidade linear exibem o mesmo padrão de convergência observado para o momento de dipolo. Desta forma, a partir da razão convergida $R_\alpha^{MP2//MP2/HF//MP2}$ = 0.85, o valor assintótico de Δα incluindo os efeitos direto e indireto de CE foi estimado em 452.67 u.a.

3.4 Primeira Hiperpolarizabilidade

Os resultados obtidos tanto para o modelo MP2/6-31G(d) quanto para o modelo HF/6-31G(d) mostram que as cadeias de PFHA apresentam, inicialmente, sinal negativo para a primeira hiperpolarizabilidade. A mudança de sinal ressalta a

presença de duas contribuições distintas: uma por parte das extremidades da cadeia e outra por parte da região central. Quando as cadeias são pequenas prevalecem os efeitos da região central (negativo) enquanto que nas cadeias maiores prevalecem os efeitos das extremidades da molécula (sinal positivo). Em nossa convenção o sinal positivo significa que a primeira hiperpolarizabilidade possui o mesmo sentido que o momento de dipolo. A Figura 4A mostra o comportamento da primeira hiperpolarizabilidade para as cadeias de PFHA. De forma similar ao momento de dipolo, a primeira hiperpolarizabilidade cresce rapidamente para cadeias menores e segue um padrão de convergência para cadeias maiores. O padrão de convergência desta propriedade é evidenciado no comportamento da primeira hiperpolarizabilidade por subunidade [$\Delta\beta = |\beta(N) - \beta(N-1)|$] em função do crescimento da cadeia, apresentado na Figura 4B.

Figura 4. Primeira hiperpolarizabilidade (esquerda) e primeira hiperpolarizabilidade por subunidade (direita) para as cadeias de poliacetileno fluoretadas.



Os resultados apresentados mostram que a inclusão do efeito direto de correlação eletrônica aumenta substancialmente os valores obtidos para a primeira hiperpolarizabilidade das cadeias de PFHA. Um aumento ainda mais importante é observado para os resultados obtidos com a inclusão do efeito indireto. Para a cadeia com 18 átomos de carbono (N = 9), por exemplo, os resultados com o efeito direto e o indireto de correlação eletrônica são 4107.89 u.a. e 9873.01 u.a., respectivamente. Isto representa um aumento da ordem de 91.7% e 360.7% em relação ao correspondente valor obtido no nível HF//HF. Note, no entanto, que estes

resultados não correspondem aos valores convergidos da primeira hiperpolarizabilidade deste sistema.

É importante observar que as razões MP2//HF/HF//HF e MP2//MP2/HF//MP2 para os resultados de β_{yyy} mostram um rápido padrão de convergência. Desta forma, assim como para o momento de dipolo o valor estimado para a primeira hiperpolarizabilidade incluindo o efeito direto de correlação eletrônica pode ser obtido a partir do valor convergido da razão (R_β) entre os resultados MP2 e HF. A Tabela 7 apresenta as razões entre os valores obtidos para as GC-MP2 e GC-HF nos modelos MP2/6-31G(d) e HF/6-31G(d) para a primeira hiperpolarizabilidade.

Tabela 7. Razão entre as primeiras hiperpolarizabilidades obtidas com geometrias convergidas nos níveis MP2 e HF.

	R_β				
N	(MP2//HF) / (HF//HF)	(HF//MP2) / (HF//HF)	(MP2//MP2) / (HF//HF)	(MP2//MP2) / (MP2//HF)	(MP2//MP2) / (HF//MP2)
1	1.06	0.91	0.74	0.67	0.78
2	0.55	0.28	4.20	7.64	4.81
3	1.96	2.13	4.58	2.33	2.15
4	1.84	2.54	4.65	2.53	1.83
5	1.85	3.03	5.36	2.89	1.77
6	1.89	3.51	6.18	3.27	1.77
7	1.90	3.93	6.97	3.67	1.77
8	1.92	4.30	7.66	3.99	1.78
9	1.92	4.61	8.25	4.30	1.79

A partir da razão convergida $R_\beta^{MP2//HF/HF//HF}$ = 1.92, o valor assintótico estimado para a primeira hiperpolarizabilidade incluindo o efeito direto de CE é de 4760.98 u.a.. O valor assintótico da primeira hiperpolarizabilidade considerando o efeito indireto de CE é de 14187.34.

O valor estimado para a primeira hiperpolarizabilidade incluindo os efeitos direto e indireto de correlação eletrônica para este sistema foi obtido a partir da razão convergida MP2//MP2/HF//MP2, $R_\beta^{MP2//MP2/HF//MP2}$ = 1.79. Para β_{yyy} o valor assintótico previsto pelo modelo MP2//MP2 é da ordem de 25345.90 u.a.. Este resultado é aproximadamente 10 vezes o valor obtido anteriormente no modelo HF//HF e mostra a importância da inclusão dos efeitos de correlação eletrônica para uma descrição realista da primeira hiperpolarizabilidade das cadeias de PFHA.

5. Conclusão

Neste trabalho pudemos avaliar o impacto dos efeitos de correlação eletrônica sobre a geometria de equilíbrio e sobre as propriedades elétricas das cadeias de poliacetileno fluoretadas. Estes efeitos mostraram-se responsáveis por importantes mudanças na geometria de equilíbrio e nas propriedades elétricas desse sistema. Utilizando razões convergidas entre os resultados MP2 e HF pudemos estimar os valores assintóticos do momento de dipolo, da polarizabilidade linear por subunidade e da primeira hiperpolarizabilidade em, respectivamente, 0.251 u.a., 452.67 u.a. e 25345.90 u.a.. O grande valor obtido para a primeira hiperpolarizabilidade sugere que as cadeias de PFHA possuem grande potencial para aplicação em tecnologias fotônicas e que maior atenção teórica e experimental deve ser dada a sistemas poliméricos com substituições laterais.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

[1] P. Prasad and D.J. Williams, Introduction to Nonlinear Optical Effects in Molecules and Polymers, Wiley, New York, 1991.
[2] S.R. Mader, C.B. Gorman, F. Meyers, J.W. Perry, G. Bourhill, J.L. Brédas and B.M. Pierce, Science 265 (1994) 632.
[3] F. Meyers, S.R. Mader, B.M. Pierce and J.L. Brédas, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994) 10703.
[4] D. Jacquemin, E.A. Perpete e J.M. André, J. Chem. Phys. 120 (2004) 10317.
[5] D. Jacquemin, O. Quinet, . Champagne e J.M. André, J. Chem. Phys. 120 (2004) 9401.
[6] de Abreu, L. M. ; Fonseca, T.L. . Cálculos Hartree-Fock da Primeira Hiperpolarizabilidade de Cadeias de Poliacetileno Fluoretadas. In: V Congresso de Pesquisa Ensino e Extensão, 2008, Goiânia.

[7] C. Moller e M.S. Plesse, Phys. Rev. 46 (1934) 618.

[8] A. Szabo and N.S. Ostlund, Modern Quantum Chemistry, McGraw-Hill, 1982.

[9] Gaussian 03, Revision, M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, P.M.W. Gill, B.G. Johnson, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, T.A. Keith, G.A. Petersson, J.A. Montgomery, K. Raghavachari, M.A. Al-Laham, V.G Zakrzewski, J.V. Ortiz, J.B. Foresman, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, A. Nanayakkara, M. Challacombe, C.Y. Peng, P.Y. Ayala, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, E.S. Replogle, R. Gomperts, R. L. Martin, D.J. Fox, J.S. Binkley, D.J. Defrees, J. Baker, J.P. Stewart, Head-Gordon, C. Gonzalez and J.A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1995.

Estudo de agregação de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas em meio biológico

Ariadne Gomes Carvalho[a,*], Michelly Christine dos Santos[a], Emília Celma de Oliveira Lima[a]

[a]*Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970, Brasil*

*E-mail: ariadnegcarvalho@hotmail.com

Palavras-chave: nanopartículas magnéticas, potencial zeta, agregação

1 INTRODUÇÃO

Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro, predominantemente magnetita e maguemita (HAJDÚ, *et al.,* 2008), recebem atenção crescente em diferentes campos da física, medicina, biologia e ciência de materiais devido a suas propriedades multifuncionais tais como tamanho pequeno e superparamagnetismo. (SJÖGREN *et al.,* 1997; ROGER *et al.,* 1999; KIM *et al.,* 2003).

Atualmente suspensões coloidais de nanopartículas de óxido de ferro estabilizados em água são de renovado interesse devido especialmente a sua utilização em aplicações biomédicas (HADJÚ *et al.,* 2008),. Para esses fins, tais nanopartículas podem ser funcionalizadas bioquimicamente e são potenciais sistemas de dispositivos médicos que podem ser utilizados em diferentes campos médicos e biológicos de aplicação (PETRI-FINK *et al.,* 2007).

Para fazer das aplicações bem sucedidas, na maioria dos casos, os colóides magnetizáveis têm de ser mantidos em suspensão por estabilização, seja estérica e/ou eletrostática, com um revestimento consistindo de íons (MASSART, 1981), como ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (FAUCONNIER *et al.,* 1997), ou polímeros, sintéticos ou biológicos (MORNET, 2004**)** como BSA (albumina de soro bovino) (MIKHAYLOVA *et al.,* 2004), dextran (MORNET, 2004) e polietilenoglicol (KIM *et al.,* 2003), entre outros.

Após serem funcionalizadas e sofrerem as modificações adequadas em sua superfície as nanopartículas passam a ter uma larga aplicação. Destas aplicações há destaque para separação celular (ROGER *et al.,* 1999), agente de contraste para ressonância magnética nuclear (HALAVAARA, *et al.,* 2002), sistema de vetorização de fármacos (GOMES-LOPERA; PLAZA; DELGADO, 2001), tratamento magnético hipertérmico (BABINCOVÁ *et al.,* 2000) e administração de vacinas (KREUTER, 1991). Esta funcionalização pode alterar as interações das nanopartículas com as células no que condiz com a eficiência de sua adesão e internalização, do mesmo

modo que visa melhorar a biocompatibilidade, resistir à adsorção de proteínas e aumentar o tempo de circulação das nanopartículas no organismo (ZHANG; KOHLER; ZHANG, 2002).

As propriedades da superfície das partículas são particularmente investigadas em maiores detalhes uma vez que a superfície parece ser o fator determinante para captação e citotoxicidade (PETRI-FINK *et al.,* 2007). Contudo há na literatura estudos que demonstram que interação eletrostática entre a nanopartícula carregada positivamente e a membrana plasmática carregada negativamente é decisiva na internalização das nanopartículas nas células (PETRI-FINK *et al.,* 2005). Há ainda relatos que nanopartículas com potencial de superfície negativo demonstraram alta afinidade por sítios catiônicos na superfície celular (WILHELM *et al.,* 2003).

Poucos estudos foram feitos sobre a estabilidade coloidal de nanopartículas em meio de cultura. A aglomeração e subseqüente sedimentação das nanopartículas levantam preocupações quando se considera o tamanho, o tempo e a toxicidade dependente da dose (MURDOCK et al., 2008).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo preparar e estudar suspensões coloidais aquosas de nanopartículas de maguemita que foram funcionalizadas com citrato, trifosfato e ortofosfato. Assim como, suspensões coloidais de magnetita que foram funcionalizadas com monocamada de laurato e posteriormente, funcionalizadas com laurato e dodecilamina (surfactantes aniônico e catiônico, respectivamente), formando bicamadas. Testes em meio de cultura celular foram realizados para avaliar o efeito dos diferentes valores de potencial zeta na agregação das nanopartículas em meio biológico.

3 METODOLOGIA

3.1 Preparação das nanopartículas de óxido de ferro

3.1.1 Preparação das nanopartículas de magnetita

Nanopartículas de magnetita foram precipitadas a partir da adição de amônia concentrada em soluções aquosas de cloreto de ferro (II) e de ferro (III) sob vigorosa

agitação (VAN EWIJK; VROEGE; PHILIPSE, 1998). Após a sedimentação e com o auxilio de um magneto, o precipitado negro foi lavado diversas vezes para remoção de íons sobressalentes.

3.1.2 Preparação das nanopartículas de maguemita

Nanopartículas de maguemita foram obtidas através da oxidação da magnetita obtida pelo método descrito no item 3.1.1. Esta foi realizada através da adição de solução de nitrato férrico e de ácido nítrico 2M sob agitação e em alta temperatura (VAN EWIJK; VROEGE; PHILIPSE, 1998). Com o auxilio de um magneto o precipitado foi sedimentado, lavado com solução aquosa de ácido nítrico e posteriormente dispersado em água deionizada.

3.2 Caracterização das nanopartículas de magnetita e maguemita

3.2.1 Estrutura cristalina e diâmetro médio estimado

A análise de difração de raios X (DRX) da magnetita e de maguemita foi realizada em um equipamento XRD 6000 (Shimadzu) equipado com um tubo de radiação Cu-Kα. Os dados foram obtidos em 2Θ de 15º a 80º, no modo *Fixed Time,* com velocidade de scan de 2º/min. O diâmetro médio do domínio nanocristalino foi estimado usando a fórmula de Debye-Scherrer.

3.3 Funcionalização das nanopartículas de maguemita

3.3.1 Funcionalização das nanopartículas complexadas com citrato

Para a preparação de nanopartículas complexadas com citrato foi preparada uma solução aquosa de baixa concentração de acido cítrico, a qual foi adicionada à suspensão coloidal iônica de maguemita e mantida sob agitação vigorosa por 30 minutos. Após isso o fluido foi centrifugado e dialisado.

3.3.2 Funcionalização das nanopartículas complexadas com ortofosfato

As nanopartículas complexadas com ortofosfato foram preparadas através da adição da solução de ortofosfato 0,3M ao fluido iônico, que permaneceu sob agitação durante 24 horas. Após isso o fluido foi centrifugado e dialisado.

3.3.3 Funcionalização das nanopartículas complexadas com trifosfato

As nanopartículas complexadas com trifosfato foram preparadas através da adição da solução de trifosfato 0,3M ao fluido iônico, que permaneceu sob agitação durante 24 horas. Após isso o fluido foi centrifugado e dialisado.

3.4 Funcionalização das nanopartículas de magnetita

3.4.1 Funcionalização das nanopartículas com monocamadas de laurato

Para a formação da monocamada, as nanopartículas foram dispersas em água a 70-75 ºC. O ácido láurico foi então adicionado, o pH foi ajustado para 8 e a mistura foi mantida sob agitação por 10 minutos. As nanopartículas de magnetita funcionalizadas com uma única camada de laurato, evidenciadas pelo caráter hidrofóbico que adquirem, foram sedimentadas com um magneto e lavadas várias vezes com água destilada.

3.4.2 Funcionalização das nanopartículas com bicamadas laurato/laurato (FBL)

Para a preparação das nanopartículas de magnetita funcionalizadas com bicamadas laurato/laurato, 2,5 g das nanopartículas funcionalizadas com monocamadas de laurato foram dispersas em água destilada a 70-75 ºC. Ácido láurico (0,75 g) foi adicionado sob agitação contínua por 10 minutos e o pH foi ajustado para 8. A suspensão coloidal aquosa de nanopartículas foi dialisada contra água deionizada para remoção de laurato livre. A amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos para remover grandes agregados.

3.4.3 Funcionalização das nanopartículas com bicamadas laurato/dodecilamina (FBLD)

As nanopartículas funcionalizadas com bicamadas laurato/dodecilamina foram preparadas a partir da dispersão de 2,5 g das nanopartículas de magnetita funcionalizadas com monocamadas de laurato em água destilada. A uma temperatura de 70-75 ºC e sob agitação, foi adicionada a dodecilamina (0,5 g) e o pH foi ajustado para 8. A suspensão coloidal aquosa de nanopartículas foi dialisada para eliminar dodecilamina em excesso e centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos.

3.5 Caracterização das nanopartículas funcionalizadas por DRIFTS

Medidas de espectroscopia vibracional na região do infravermelho foram realizadas em um espectrofotômetro FTIR Bomem. Foram obtidos os espectros

utilizando-se a técnica de reflectância difusa (DRIFTS) e a região espectral variou de 4000 a 400 cm^{-1}.

3.6 Caracterização das suspensões coloidais aquosas de nanopartículas

3.6.1 Teor de ferro total

Para determinar o teor de ferro total presente nas suspensões coloidais obtidas foram realizadas medidas de espectroscopia de absorção atômica usando um espectrofotômetro Perkim Elmer 5000.

3.6.2 Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta

As medidas de diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas em suspensão foram obtidas por medidas de espalhamento dinâmico de luz em um equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments).

Os valores de potencial zeta das nanopartículas funcionalizadas nas suspensões coloidais foram calculados usando medidas de mobilidade eletroforética realizadas em um equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments). Para a realização das medidas, uma pequena quantidade em volume da suspensão coloidal foi diluída para 2000 µL com água deionizada, de modo a obter uma solução bem diluída.

3.6.3 Estudo de agregação em meio biológico

A agregação em meio de cultura foi estudada através das medidas de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das suspensões coloidais em contato com o meio de cultura MEM (ALLOUNI et al., 2008). Este estudo foi feito realizando medidas na hora imediata à adição da suspensão ao meio de cultura, após 1 hora, após 24 horas e 48 horas depois.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das nanopartículas de maguemita

As análises dos difratogramas de DRX revelaram a estrutura cúbica espinélio inversa, característica da maguemita (WANG; SAXENA, 2002). Mesmo que haja alta cristalinidade na amostra o difratograma pode ser semelhante ao da magnetita, visto que a maguemita é uma fase metaestável da mesma.

O diâmetro médio do domínio cristalino foi determinado a partir da largura a meia altura (full-width at half maximum FWHM) do pico de reflexão mais intenso, usando a equação de Scherrer (CULLITY, 1978), que no caso da magnetita, se refere ao plano de difração (311). Os diâmetros médios encontrados para maguemita e para a magnetita foram de ~8 nm.

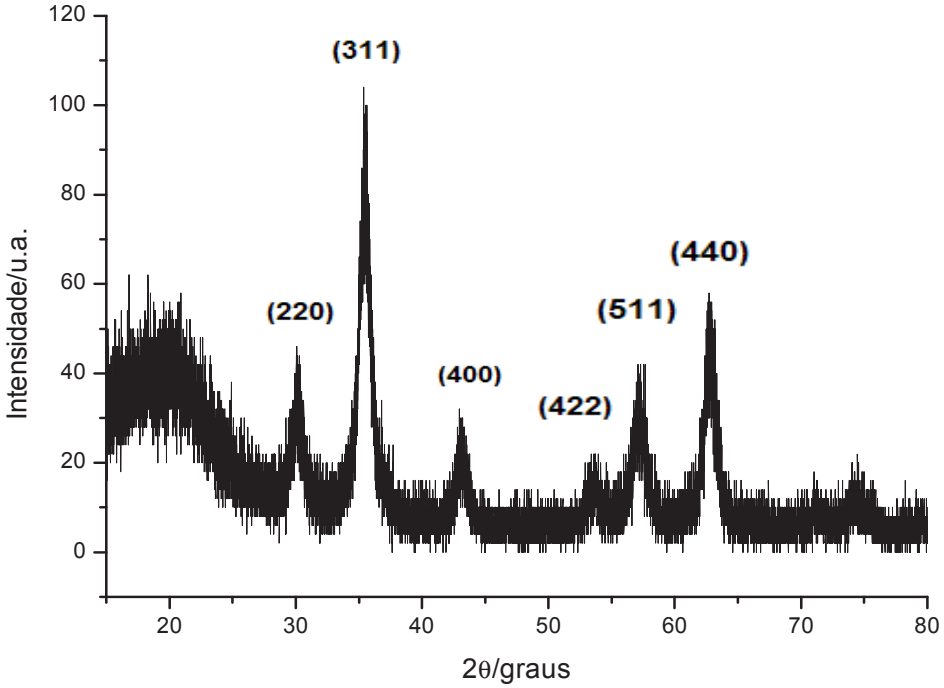


Figura 1. Difratograma das nanopartículas magnéticas.

A Tabela 1 possui dados do teor de Fe (II) e Fe (III) para as amostras estudadas. A presença de Fe (II) na composição das amostras confirma a existência de suspensões coloidais aquosas de nanopartículas de magnetita, uma vez que a magnetita pode ser identificada pelo fato de apresentar Fe (II) e Fe (III) em sua estrutura na proporção 1:2 (CHAUDHURI; LACK; COATES, 2001). Sabendo que a maguemita é originada através da oxidação da magnetita espera-se obter uma relação elevada de Fe (II): Fe (III) nas amostras funcionalizadas a partir da maguemita, enquanto para amostras funcionalizadas a partir de magnetita espera-se obter o oposto. A presença de Fe (III) nas amostras de magnetita funcionalizada indica que houve uma leve oxidação da amostra devido ao contato com o ar atmosférico, fato que é previsto na literatura, devido ao fato da maguemita ser mais estável do que a magnetita (FERGUSON; HASS, 1958).

Tabela 1. Relações entre ferro total, Fe (II) e Fe (III) das amostras.

Amostras	Fe (II): Fe (III)	Fe (II): Fe_{total}
Citrato	0, 077	0, 071
Orto-Fosfato	0, 037	0, 036

Tri-Fosfato	0, 045	0, 043
FBL	0, 25	0, 20
FBLD	0, 625	0, 38

4.2 Caracterização das suspensões coloidais aquosas de nanopartículas

A Tabela 2 possui dados de ferro total e o número estimado de partículas por mL. Para estimar o nº de partículas utilizou-se a densidade da maguemita encontrada na literatura (4,86 $g.cm^{-3}$). As concentrações em Fe nas amostras estudadas variavam entre 8,3 mg/mL e 31,6 mg/ml e o número estimado de nanopartículas/cm^3 foi de 10^{15} a 10^{16}.

Tabela 2. Concentração de ferro total e número de partículas/mL das amostras

Amostra	Concentração de Fe (mg/mL)	Número de partículas/cm^3 ($x10^{16}$)	Diâmetro Médio (nm)
Citrato	8,3	0,94	7,0
Orto-Fosfato	22,2	2,76	7,7
Tri-Fosfato	16,7	2,07	7,7
FBL	18,9	1,86	8,0
FBLD	31,6	3,11	8,0

A Tabela 3 apresenta os valores de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das amostras utilizadas. A razão para a variação no valor do potencial zeta das nanopartículas se deve aos seus ligantes em sua superfície. O ácido cítrico confere valor de potencial negativo, pois possui grupos carboxilatos (COO^-), aniônicos, ou seja, ao sofrerem desprotonação se tornam íons com carga negativa.

Já as amostras contendo fosfato apresentaram potencial negativo por possuírem íons com carga negativa em sua superfície, mas que neste caso provem da desprotonação do ácido fosfórico H_3PO_4. Esta desprotonação dá origem ao íon PO_4^{4-} que é então passivo de funcionalização superficial nas nanopartículas. A amostra de ortofosfato contém um grupo PO_4^{4-}, enquanto a amostra contendo trifosfato possui três íons PO_4^{4-} em sua estrutura sendo, portanto uma cadeia mais longa do que a primeira.

Devido à presença de grupos carboxilato nas nanopartículas de magnetita funcionalizadas com bicamadas laurato/laurato, provindo do ácido láurico, a superfície das nanopartículas adquire altos valores de carga negativa. Na suspensão coloidal aquosa das nanopartículas funcionalizadas com bicamadas laurato/dodecilamina, a presença de grupos amino, catiônicos, pertencentes à dodecilamina oferece à superfície das nanopartículas uma distribuição de cargas positivas.

Tabela 3. Potencial-zeta e diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas estudadas.

Amostras	Potencial-Zeta (mV)	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)
Citrato	-34,4	88
Orto-Fosfato	-47,4	89
Tri-Fosfato	-51,1	40
FBL	-48,5	92,4
FBLD	+26,2	79,2

4.3 Estudo da agregação em meio biológico

A figura 1 apresenta os gráficos de medidas de potencial zeta e a figura 2 apresenta os gráficos das medidas do diâmetro hidrodinâmico das soluções diluídas de citrato, ortofosfato, trifosfato, FBL e FBLD em contato com o meio de cultura nas concentrações de 1mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L e 50 mg/L.

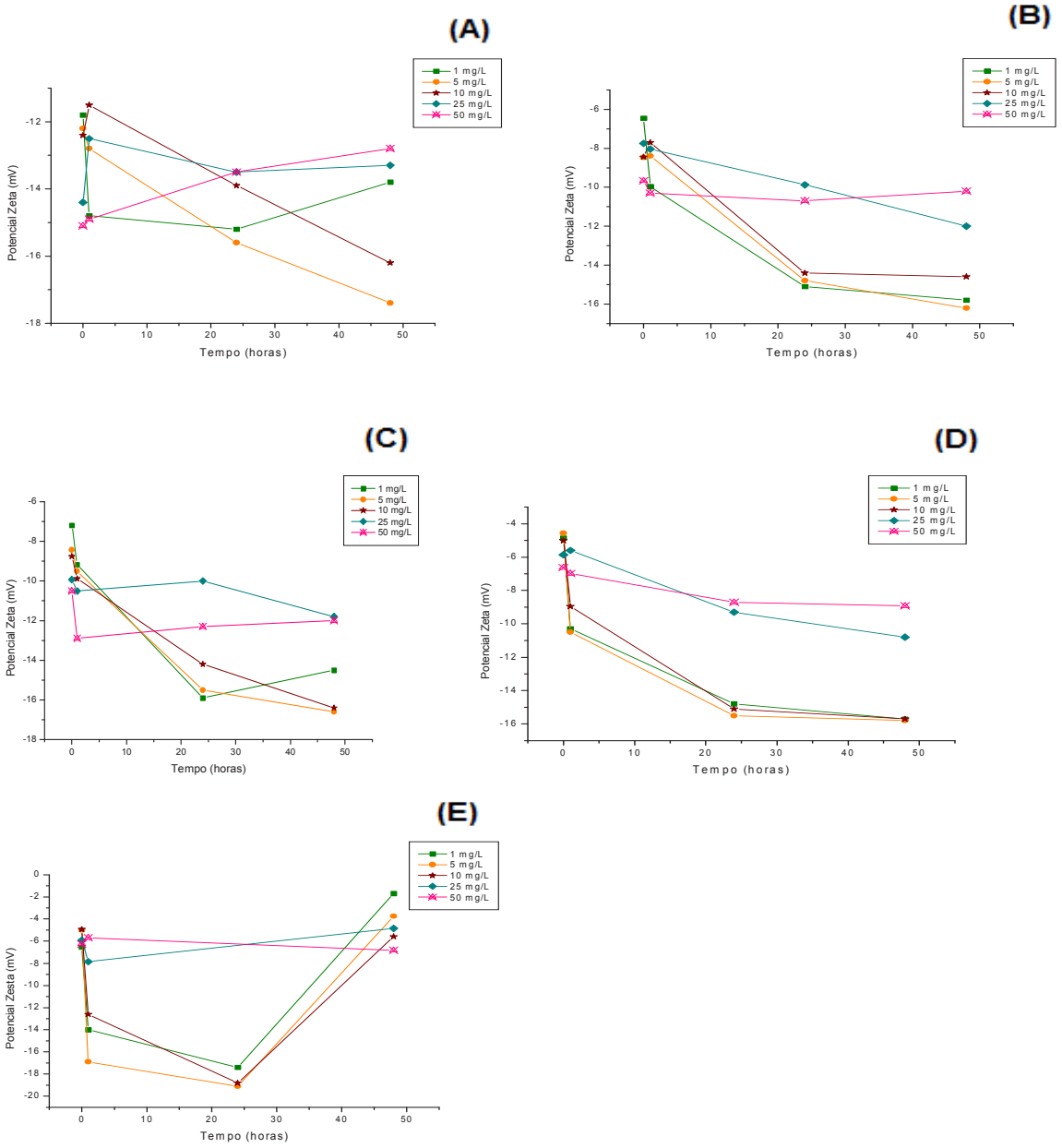


Figura 1. Potencial zeta em função do tempo de contato: (A) amostra de citrato em MEM; (B) amostra de ortofosfato em MEM; (C) amostra de trifosfato em MEM; (D) amostra de FBL em MEM e (E) amostra de FBLD em MEM.

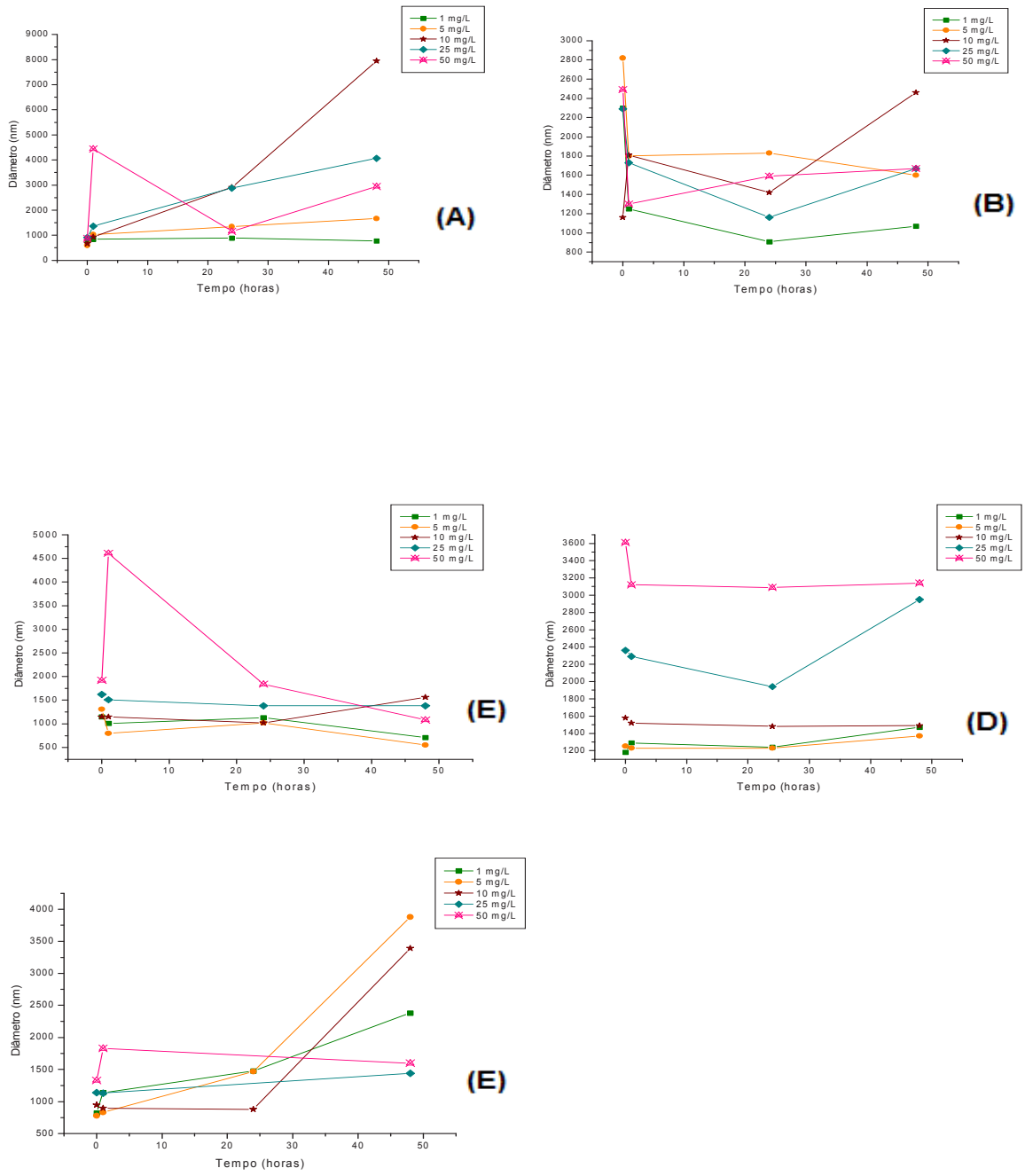


Figura 2. Diâmetro hidrodinâmico em função do tempo de contato: (A) amostra de citrato em MEM; (B) amostra de ortofosfato em MEM; (C) amostra de trifosfato em MEM; (D) amostra de FBL em MEM e (E) amostra de FBLD em MEM.

Os gráficos mostram que houve variação de potencial zeta, assim como de diâmetro hidrodinâmico nas nanopartículas funcionalizadas em contato com o meio de cultura celular.

As amostras contendo citrato, ortofosfato, trifosfato e FBL apresentam valores de potencial zeta negativo que em contato com o meio de cultura celular se mostraram mais elevados do que nas suspensões coloidais. Do mesmo modo a amostra contendo FBLD, que possui potencial zeta positivo, teve o potencial zeta diminuído pelo contato com o meio de cultura. O diâmetro hidrodinâmico de todas as amostras aumentou consideravelmente desde o primeiro contato com o meio de cultura, o que confirma a agregação das nanopartículas.

Sabendo que a estabilidade coloidal das suspensões aquosas de nanopartículas funcionalizadas se deve a repulsão eletrostática e/ou a efeitos estéricos, pode-se afirmar que tais variações de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico levam a agregação das nanopartículas e subseqüente sedimentação.

5 CONCLUSÕES

Nesse trabalho, foi possível preparar e caracterizar suspensões coloidais aquosas de nanopartículas funcionalizadas com citrato, ortofosfato, trifosfato, bicamadas laurato/laurato e com bicamadas laurato/dodecilamina. Assim como caracterizar as suspensões coloidais aquosas das nanopartículas funcionalizadas. Estas nanopartículas funcionalizadas apresentaram agregação em meio de cultura celular a diferentes concentrações, sendo confirmadas através das variações das medidas de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLOUNI, Z.E.; CIMPAN, M.R.; HOL. P.J.; SKODVIN, T.; GJERDET, N.R. Agglomeration and sedimentation of TiO_2 nanoparticles in cell culture medium. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.68, p.83-87, 2009.

BABINCOVÁ, M.; SOURIVONG, P.; LESZCZYNSKA, D.; BABINEC, P. Blood-specific whole-body electromagnetic hyperthermia. **Medical Hypotheses** v.55, Ed.6, p.459-460, 2000.

CHAUDHURI, S. K.; LACK, J. G.; COATES, J. D. Biogenic magnetite formation through anaerobic biooxidation of Fe(II). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2844-2848, 2001.

CULLITY, B.D. Elements of X-ray Diffraction, Massachusetts:Addison Wesley: **Reading**, 1978.

FAUCONNIER, N.; PONS, J. N.; ROGER, J.; BEE, A. Thiolation of maghemite nanoparticles by dimercaptosuccinic acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 194, p. 427-433, 1997.

FERGUSON, G.A.; HASS, M. Magnetic structure and vacancy distribution in $-Fe_2O_3$ by neutron diffraction. **Phys. Review**, v.112, n.4, p.1130-1131, 1958.

GOMES-LOPERA, S.; PLAZA, R.; DELGADO, A. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 240, p.40, 2001.

HALAVAARA, J.; TERVAHARTIALA P.; ISONIEME, H.; HÖCKERSTEDT, K. Efficacy of sequential use of superparamagnetic iron oxide and gadoliniem in liver MR imaging. **Acta Radiologica** v.43, p.180-185, 2002.

HAJDÚ, A.; TOMBÁCZ, E.; ILLÉS, E.; BICA, D.; VÉKÁS, L. Magnetite nanoparticles stabilized under physiological conditions for biomedical application. **Colloid and Polymer Science** v.135, p.29-37, 2008.

JAIN, T. K.; MORALES, M. A.; SAHOO, S. K.; LESLIE-PELECKY, D. L.; LABHASETWAR, V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. **Molecular Pharmaceutics**, v. 2, n. 3, p. 194-205, 2005.

JING, Z.; WU, S. Synthesis, characterization and magnetic properties of gamma-Fe2O3 nanoparticles via a non-aqueous medium. **Solid State Chem**., v.177, n.4-5, p.1213-1218, 2004.

KIM, D.K.; MIKHAYLOVA, M.; ZHANG, Y.; MUHAMMED, M. **Chemistry of Materials** v.15, p.1617, 2003.

KREUTER, J. **Journal of Controlled Release** v.16, p.169, 1991.

MASSART, R.; **IEEE Transactions on magnetics** v.MAG-17, p.1247, 1981.

MIKHAYLOVA, M.; KIM, D.K.; BERRY, C.C.; ZAGORODNI, A.; MUHAMMET, TOPRAK.; CURTIS, A.S.G.; MUHAMMED, M. BSA immobilization on amine-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Chemistry of Materials** v.16, p.2344-2354, 2004.

MORNET, S.; VASSEUR, S.; GRASSET, F.; DUGUET, E.; Journal of Material Chemistry v.14, p.2161, 2004.

MURDOCK, R.C.; BRAYDICH-STOLLE, L.; SCHRAND, A.M.; SCHLAGER, J.J.; HUSSAIN, S.M. **Toxicological Science**, v.101, p.239, 2008.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds**. 5. ed. New York: Wiley, 1997.

PETRI-FINK, A.; STEITZ, B.; FINKA, A.; SALAKLANG, J.; HOFMANN, H. Effect of cell media on polymer coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS): colloidal stability, cytotoxicity, and cellular uptake studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v.68, p.129-137, 2008.

PETRI-FINK, A.; CHASTELLAIN, M.; JUILLERAT-JEANNERET, L.; FERRARI, A.; HOFMANN, H. Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells. **Biomaterials**, v. 26, p.2685-2694, 2005.

ROGER, J.; PONS, J.; MASSART, R.; HALBREICH, A.; BACRI, J. **European Physical Journal: Applied Physics** v.5, p.321, 1999.

SANTOS, M. C.; LIMA, E. C. D.; SOARES, P. R. O. ; NUNES, P. R.; GUILLO, L. A.. Estudo do efeito do potencial de superfície na internalização de nanopartículas de magnetita em células cultivadas. In: V Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão, 2008.

SJÖGREN, C.; JOHANSSON, C.; NAEVESTAD, A.; SONTUM, P.; BRILEY-SAEBO, K.; FAHLVIK, A. **Magnetic Resonance Imaging** v.15, Ed.1, p.55, 1997.

VAN EWIJK, G.A.; VROEGE, G.J; PHILIPSE, A.P. Convenient preparation methods for magnetic colloids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** v.201, p.31-33, 1999.

WANG, Z.W.; SAXENA, S.K. Pressure induced phase transformations in nanocrystalline maghemite (−Fe2O3). **Sol. State Comm**., v.123, n.5, p.195-200, 2002.

WILHELM, C.; BILLOTEY, C.; ROGER, J.; PONS, J. N.; BACRI, J. -C.; GAZEAU, F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of theirsurface coating. **Biomaterials**, v. 24, p. 1001-1011, 2003.

ZHANG, Y.; KOHLER, N.; ZHANG, M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. **Biomaterials**, v. 23, p. 1553-1561, 2002.

Geração de estados de Fock em modos viajantes via vácuo comprimido.

Thiago M. Carrijo[a] e Ardiley T. Avelar.[b]

Endereço eletrônico: [a]thiagomureebe@hotmail.com, [b]ardiley@gmail.com.

Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, 74.001-970, Goiânia (GO) Brasil.

Palavras-chave: Estados de Fock, vácuo comprimido, divisor de feixe.

1 Introdução

Os estados quânticos eletromagnéticos podem estar confinados em cavidades QED ou em modos viajantes. No primeiro caso, o campo eletromagnético está confinado na cavidade, o qual pode ser alterado através da entrada de átomos propagantes, os quais trocam fótons com o campo. E o conhecimento do estado final na cavidade se dá através da medida dos estados do átomo [1]. Já no último caso, pode-se gerar estados quânticos por meio da manipulação do campo eletromagnético através de dispostivos ópticos lineares e não-lineares e com fotodetectores [2].

Existem várias propostas de geração de estados quânticos do campo eletromagnético. Brattke e colaboradores [3] criaram um esquema em cavidade para gerar campos eletromagnéticos com um número fixo de fótons, usando o forte acoplamento entre átomos excitados e um modo da cavidade. Brune e colaboradores [4] criaram estados de gato de Schroedinger a através da manipulação de fótons em uma cavidade QED, com estado coerente inicialmente, com a ocorrência de interação não ressonante entre átomos e modos do campo. Ghosh e Gerry [5] mostraram a geração de estados com distribuição sub-poissoniana a partir da interação entre um estado coerente quantizado em uma cavidade e um átomo de dois níveis. Maia e colaboradores [6] proporam um esquema de gerar estados de Fock altamente excitados através da passagem de átomos ressonantes em uma cavidade que comtém campo eletromagnético no estado coerente. E, como último exemplo, Benmoussa e Gerry [7] proporam um esquema pra

gerar estados de Fock em modo viajante através da injeção de um estado coerente e de um fóton em um meio Kerr.

Os estados de Fock possuem várias potenciais aplicações em avançados campos de pesquisa, tais como comunicação quântica segura [8], criptografia quântica [9], capacidade de codificação ótima em canais quânticos [10], alta precisão em interferometria quântica [11] etc. Entretanto, sua geração em laboratório não é uma tarefa trivial, principalmente no que se diz respeito a campos altamente excitados. Outro estado, que é utilizado nesse trabalho, é o estado de vácuo comprimido, o qual possui várias propostas de geração [12] e que será discutido adiante.

2 Objetivos

O objetivo do presente trabalho é gerar estados de Fock em modos viajantes, a partir de um estado de vácuo comprimido e de fontes de um fóton, utilizando divisores de feixe e detectores.

3 Metodologia

A metodologia utilizada foi a aplicação da teoria de Óptica Quântica juntamente com recursos computacionais, como programas de computação algébrica, e a utilização de recentes artigos da área. Em específico, foi utilizado o formalismo da quantização do campo eletromagnético e a descrição quântica de dispositivos como os divisores de feixe e os detectores de fótons. A cerca dos estados utilizados no trabalho e desses dispositivos, segue uma rápida descrição.

3.1 Estados de Fock

Os estados de Fock do campo eletromagnético são estados que possuem um número bem definido de fótons [13]. Podem ser descritos a partir do hamiltoniano $\hat{H}$ do campo, conforme a equação de autovalor

$$\hat{H}|n\rangle = E_n|n\rangle, . \tag{1}$$

onde E_n é a energia do campo associada ao n-ésimo estado de Fock. Os estados de Fock também são autoestados do operador de número $\hat{n}$, definido como $\hat{n} = \hat{a}^\dagger \hat{a}$, onde $\hat{a}^\dagger$ e $\hat{a}$ são os operadores de criação e aniquilação, respectivamente. A ação desses operadores nos estados de Fock é dada por:

$$\hat{a}^\dagger |n\rangle = \sqrt{n+1}|n+1\rangle, \qquad \hat{a}|n\rangle = \sqrt{n}|n-1\rangle. \tag{2}$$

Os estados de Fock satisfazem uma relação de completeza

$$\hat{I} = \sum_{n=0}^{\infty} |n\rangle\langle n|, \tag{3}$$

ou seja, eles formam uma base para o espaço de Hilbert do campo eletromagnético quantizado. O que significa que qualquer estado do campo possui uma expansão em estados de Fock. Seja $|\psi\rangle$ um estado qualquer, tem-se

$$|\psi\rangle = \sum_{n=0}^{\infty} C_n |n\rangle. \tag{4}$$

3.2 Estado de vácuo comprimido

Conside três observáveis $\hat{A}$, $\hat{B}$ e $\hat{C}$ que satisfazem a relação de comutação $[\hat{A}, \hat{B}] = i\hat{C}$. A seguinte relação de incerteza é válida:

$$\left\langle \left(\Delta\hat{A}\right)^2 \right\rangle \left\langle \left(\Delta\hat{b}\right)^2 \right\rangle \geq \frac{1}{4} |\left\langle \hat{C} \right\rangle|^2. \tag{5}$$

Um estado quântico é dito comprimido se [13]

$$\text{ou} \qquad \left\langle \left(\Delta\hat{A}\right)^2 \right\rangle < \frac{1}{4} \qquad \text{ou} \qquad \left\langle \left(\Delta\hat{B}\right)^2 \right\rangle < \frac{1}{4}. \tag{6}$$

A partir dessa definição, é construído um operador de compressão dado por

$$\hat{S}(\xi) = \exp \frac{1}{2} \left(\xi^* \hat{a}^2 - \xi \hat{a}^{\dagger 2}\right), \tag{7}$$

o qual, atuado num estado $|\psi\rangle$ do campo eletromagnético, gera um estado comprimido.

O estado de vácuo comprimido é, então definido como

$$|\xi\rangle = \hat{S}(\xi)\,|0\rangle, \tag{8}$$

onde $\xi = r\,\mathrm{e}^{i\theta}$, sendo $0 < r < \infty$ e $0 \leq \theta < 2\pi$. Pode-se escrever o estado de vácuo comprimido, de acordo com equação (4), em uma expansão na base de Fock com

$$C_{2n} = (-1)^n \frac{\sqrt{(2n)!}}{2^n n!\sqrt{\cosh r}}\,\mathrm{e}^{in\theta}(\tanh r)^n. \tag{9}$$

A distribuição estatística de fótons desse estado está mostrada na figura (1).

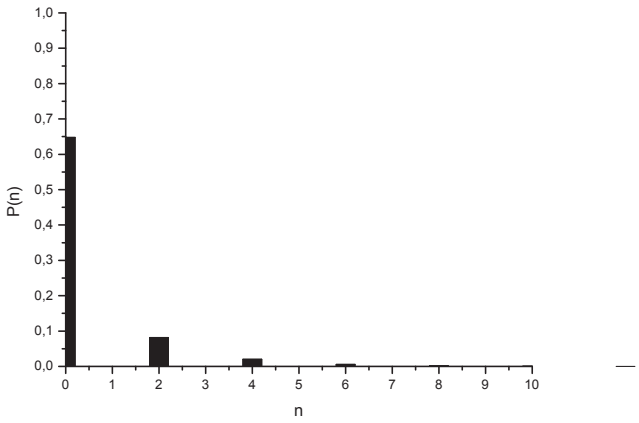


Figura 1: Distribuição estatística de fótons do vácuo comprimido.

3.3 Divisores de feixe

Um divisor de feixe é um dispositivo óptico linear que possui duas entradas e duas saídas [13]. No tratamento quântico desse dispositivo, segundo a representação de Schroedinger, o operador densidade $\hat{\rho}$ do sistema é transformado segundo a relação $\hat{\rho}_{out} = \hat{R}^{\dagger}\hat{\rho}\hat{R}$. Se o estado for puro, $|\psi\rangle_{out} = \hat{R}|\psi\rangle$, onde $|\psi\rangle$ é o estado de entrada, o operador de evolução do divisor de feixe ideal é dado por:

$$\hat{R}_{ab} = \exp i\theta\left(\hat{a}^{\dagger}\hat{b} + \hat{a}\hat{b}^{\dagger}\right), \qquad 0 \leq \theta < 2\pi, \tag{10}$$

onde

$$T = \cos(\theta) \qquad \text{e} \qquad R = i\,\mathrm{sen}(\theta). \tag{11}$$

Se o divisor de feixe é ideal, ele possui a propriedade de reversibilidade e praticamente não causa perdas.

3.4 Fotodetectores

Os fotodetectores são dispositivos que detectam a presença desde centenas de fótons até mesmo de um fóton apenas [14]. Um exemplo é o fotodiodo de avalanche, o qual utiliza o efeito fotoelétrico em suas detecções. Os fótons que atingem o fotodiodo, criam pares elétron-buraco, os quais criam outros pares por efeito avalanche, gerando uma corrente que pode ser medida.

A capacidade de distinguir entre um ou mais fótons depende da intensidade do campo eletromagnético que chega ao fotodector. Campos muito intensos diminuem a resolução da medida, enquanto campos suficientimente fracos podem ser medidos com precisão de um único fóton.

Quanto à eficiência, um fotodiodo possui em média 80% de eficiência quântica, com um número desprezível de avalanches elétrons e buracos não ocasionadas por absorção de fótons.

3.5 'Cavar buracos' em um estado $|\psi\rangle$

Para serem atingidos os objetivos desse trabalho, utilizou-se o processo de 'cavar buracos' na distribuição estatística de um estado quântico do campo eletromagnético. Considere um estado $|\psi\rangle$ expandido na base de Fock. 'Cavar um buraco' na componente $|n\rangle$ desse estado, significa submetê-lo a uma evolução tal que o estado final $|\psi'\rangle$ não possua a componente $|n\rangle$ em sua expansão. Os termos 'cavar buracos' ou 'furar buracos' [15, 16, 17] são termos comerciais que, por conveniência, serão utilizados nesse trabalho.

3.6 Arranjo experimental

O arranjo experimental teórico utilizado consiste em dois divisores de feixe, dois detectores, duas fontes de um fóton e uma fonte de estado de vácuo comprimido, conforme figura (2). O arranjo, entretanto, pode ser extendido utilizando-se divisores, cada um com um detector, idênticos ao segundo divisor do esquema ilustrado. O número desses elementos depende de qual estado de Fock se quer gerar. O aparato todo é a junção de um arranjo elaborado por Dakna e colaboradores [18] com outro elaborado por Escher e colaboradores [19].

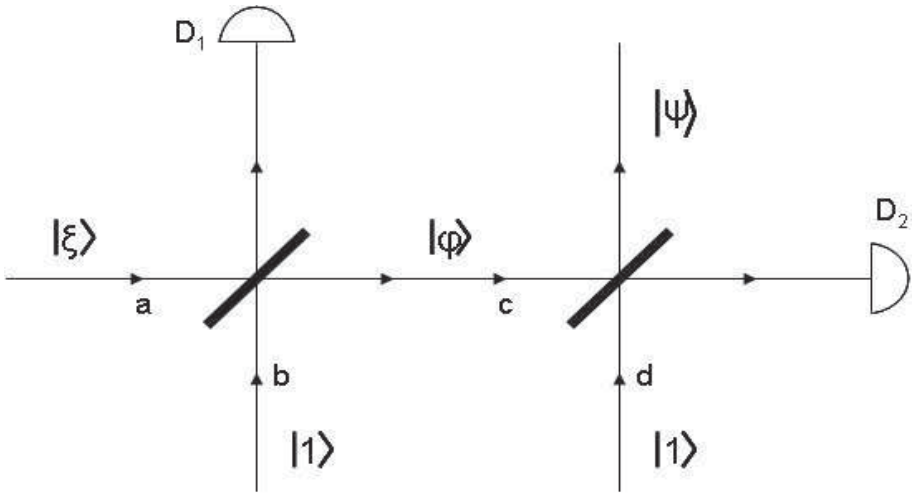


Figura 2: Esquema experimental para gerar os estados de Fock.

4 Resultados

Para se gerar o estado de Fock desejado, primeiramente removeu-se o estado de vácuo de um estado de vácuo comprimido efetuando-se uma medida e depois foram cavados buracos no estado de saída de um dos modos do primeiro divisor de feixe. Os resultados foram obtidos a partir da teoria através de cálculos efetuados em programas de computação algébrica. Segue-se, portanto, uma descrição dos procedimentos efetuados e dos resultados obtidos.

4.1 Remoção do vácuo

O primeiro divisor de feixe da configuração é alimentado por um estado de vácuo comprimido $|\xi\rangle_a$ no modo a e por um fóton $|1\rangle_b$ no modo b. Já o segundo divisor de feixe possui como entrada o estado $|\phi\rangle_c|1\rangle_d$, onde $|\phi\rangle_c$ é o estado de saída no modo a do primeiro divisor. Caso se deseje gerar estados de Fock $|n\rangle$ com $n > 3$, é necessário acrescentar mais divisores de feixe iguais ao segundo, onde $|\psi\rangle$ é a entrada do modo c do terceiro divisor e assim por diante até o último divisor.

Para que se consiga gerar o estado de número desejado, é necessário que o detector D_1 detecte o estado de vácuo e que os detectores de D_2 até D_m detectem um fóton cada.

Considerando a expansão na base de Fock do estado de vácuo comprimido da equação (9), de acordo com [18], tem-se que

$$|\phi\rangle_a = R\hat{a}^\dagger T^{\hat{n}}|\xi\rangle_a. \tag{12}$$

Um pouco de álgebra fornece

$$|\phi\rangle_a = \sum_{n=0}^{\infty} \overline{C}_{2n+1}|2n+1\rangle, \tag{13}$$

onde

$$\overline{C}_{2n+1} = C_{2n}T^{2n}R\sqrt{2n+1}. \tag{14}$$

A probabilidade de se adicionar um fóton ao estado de vácuo comprimido é a probabilidade de se detectar o estado de vácuo no modo b. Seja $\mathcal{P}_0$ essa probabilidade,

$$\mathcal{P}_0 = |{}_b\langle 0|\hat{R}_{ab}|\xi\rangle_a|1\rangle_b|^2, \tag{15}$$

onde $\hat{R}_{ab}$ é o operador de divisor de feixe definido na equação (10). Usando-se essa definição e a dada pela equação (11), é possível mostrar que

$$\mathcal{P}_0 = \||\phi\rangle_a\| = |\overline{C}_{2n+1}|^2. \tag{16}$$

A adição de um fóton no estado de vácuo comprimido é realizada com a finalidade de se eliminar o vácuo, para que seja possível a geração de estados de Fock.

4.2 Cavando buracos

. O resultado da atuação do conjunto de N divisores de feixe idênticos ao segundo divisor mostrado na figura (2) no modo d, segundo referência [19], age no estado $|\phi\rangle_c$ através de um operador efetivo $\hat{B}$ definido como $\hat{B} = \hat{B}_N \ldots \hat{B}_2 \hat{B}_1$, onde

$$\hat{B}_k = R_k^{\hat{n}} (\hat{n} - n_k) \sum_{n'=0}^{\infty} |n'\rangle_{dc}\langle n'|, \tag{17}$$

sendo R_k a reflectância do k-ésimo divisor de feixe e n_k é definido de modo que

$$R_k = i\sqrt{\frac{n_k}{1+n_k}}, T_k = \frac{1}{1+n_k}. \tag{18}$$

O estado de saída no modo d é então dado por

$$|\psi\rangle_a^{(N)} = \mathcal{N}_N \sum_{n=0}^{\infty} \overline{C}_{2n+1} \prod_{k=1}^{N} \left[R_k^{2n+1} (2n+1-n_k)\right] |2n+1\rangle_a, \tag{19}$$

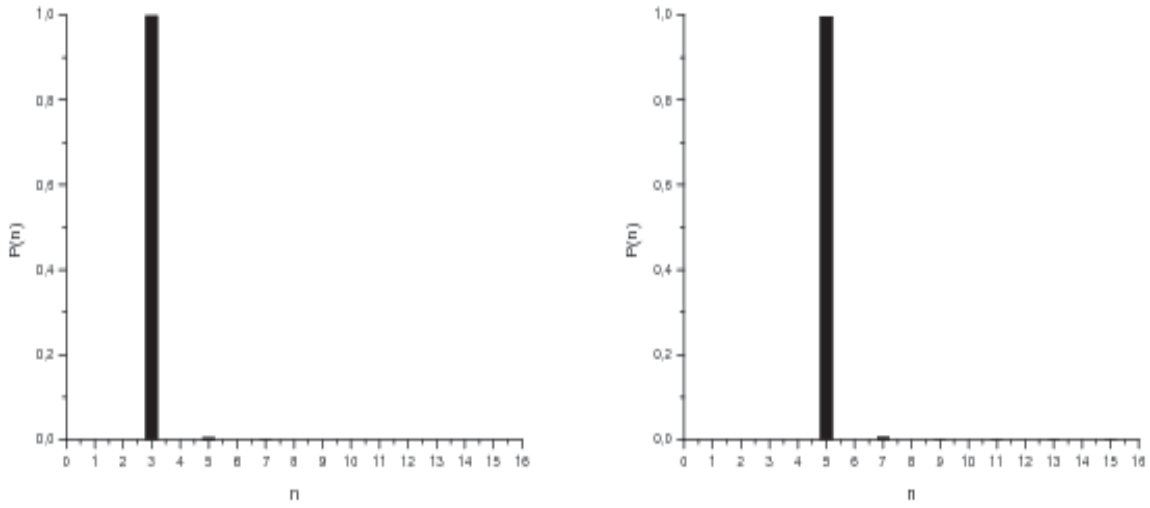
onde $\mathcal{N}_N$ é a constante de normalização. A geração de estados de Fock é feita a partir do processo de cavar buracos nesse estado de saída. Se hover $k+1$ divisores de feixe no esquema experimental, pode-se escolher k valores distintos para n_k. Com isso, obtém-se k buracos nos estados $|n\rangle$ com $n = n_k$. Se $n_k = 2k-1$, pode-se gerar um estado Fock $n = k+2$. A fidelidade ao estado de número é calculada através da expressão $P_n^{(N)} = |\langle n|\psi\rangle_a^{(N)}|^2$, ou seja

$$P_n^{(N)} = |\overline{C}_n \prod_{k=1}^{N} \left[R_k^n (n-n_k)\right]|^2. \tag{20}$$

De acordo com a equação (20), a fidelidade depende do parâmetro de compressão (r) e da transmitância (T) do primeiro divisor de feixe. Escolhendo-se arbitrariamente $r = T = 0,5$, e furando buracos primeiramente em $n_1 = 1$ e depois em $n_1 = 1$ e $n_2 = 3$, obtém-se estados de Fock 3 e 5 com fidelidades $P_3^{(1)} = 0.98$ e $P_5^{(1)} = 0.98$, respectivamente. Os gráficos da fidelidade desses estados estão na figura (3).

A probabilidade de sucesso do experimento é calculada através da expressão

$$\mathcal{P}_t^{(N)} = \mathcal{P}^{(N)} \mathcal{P}_0, \tag{21}$$



(a) (b)

Figura 3: Para $r = T = 0,5$, a distribuição estatística de fótons do estado $|\psi\rangle_a^{(N)}$: (a) com um buraco em $|1\rangle$ e fidelidade de 98% (b) com dois buracos, um em $|1\rangle$ e outro em $|3\rangle$ com fidelidade de 98%
.

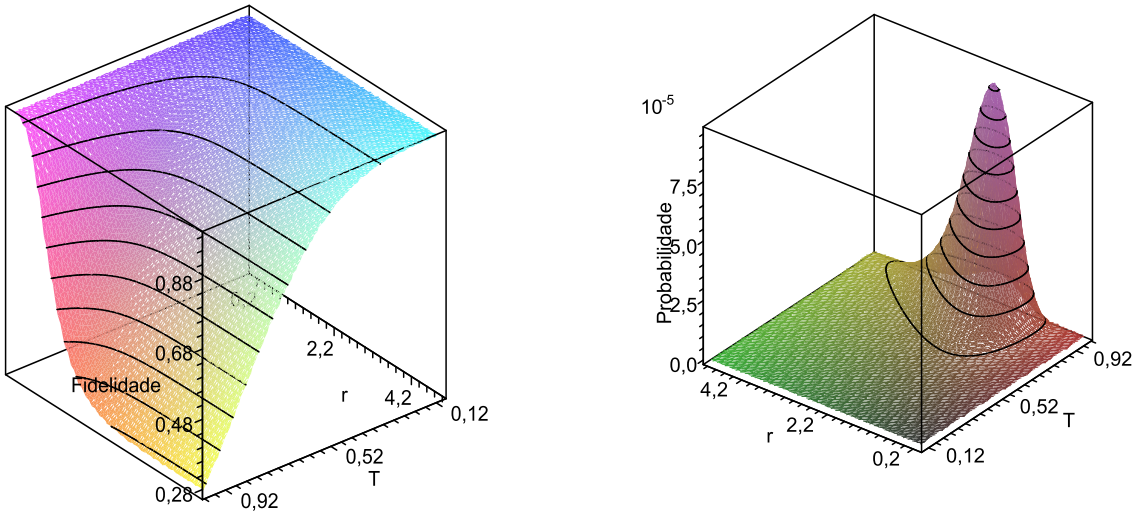
sendo $\mathcal{P}^{(N)}$ a probabilidade de sucesso de se cavar N buracos. Segundo referência [19], essa probabilidade é dada por

$$\mathcal{P}^{(N)} = \mathcal{N}_N^{-2} \prod_{k=1}^{N} \frac{T_k^4}{(1 - T_k^2)}. \tag{22}$$

Tem-se então que, para gerar os estados de Fock 3 e 5, as probabilidades são $\mathcal{P}^{(1)} = 0,5 \times 10^{-5}$ e $\mathcal{P}^{(1)} = 0,6 \times 10^{-8}$.

A probabilidade, assim como a fidelidade, depende de r e T. Ou seja, dependendo da escolha que se fizer para esses dois parâmetros, pode-se aumentar a probalidade, diminuindo a fidelidade e vice-versa. Os gráficos que mostram essa dependência, com respeito à geração de estado de Fock 5, estão na figura (4). O gráfico da probabilidade revela que é possível obter valores de probabilidades próximos de 10^{-4} para altos valores de T. Entretanto, o gráfico da fidelidade revela que esta cai quando T aumenta.

Outros estados de Fock ímpares maiores que 5 também podem ser gerados através do esquema experimental utilizado nesse trabalho.



(a) (b)

Figura 4: Gráficos de (a) fidelidade em função de T e r e (b) probabilidade em função de T e r.

5 Conclusão

Foi desenvolvido com sucesso um método para gerar estados de Fock a partir de um estado de vácuo comprimido e fontes de um fóton. Comparativamente ao trabalho de Sanaka [20], obteve-se fidelidades e probabilidades muito maiores com respeito à geração do estado $|5\rangle$. Entretanto, o trabalho de Sanaka utiliza estado coerente ao invés de estado de vácuo comprimido.

Referências

[1] P. Filipowicz, J. Javanainen, P. Meystre, J. Opt. Soc. Am. B **3** 906 (1986); F.W. Cummings, A.K. Rajagopal, Phys. Rev. A **39** 3414 (1989); B.T.H. Varcoe, S. Brattke, M. Weidinger, H. Walther, Nature (London) **403** 743 (2000).

[2] G.M. D'Ariano, L. Maccone, M.G.A. Paris, M.F. Sacchi, Phys. Rev. A **61** (2000) 053817; K. Sanaka, Phys. Rev. A **71** 021801(R) (2005).

[3] S. Brattke, B.T.H. Varcoe, H. Walther, Phys. Rev. Lett. **86** 3534 (2001).

[4] M. Brune, S. Haroche, J.M. Raimond, L. Davidovich, N. Zagury, Phys. Rev. A **45** 5193 (1992).

[5] H. Ghosh, C.C. Gerry, J. Opt. Soc. Am. B **14** 2782 (1997).

[6] L.P.A. Maia, B. Baseia, A.T. Avelar, J.M.C. Malbouisson, J. Opt. B: Quantum Semiclass. Opt. **6** 351 (2004).

[7] A. Benmoussa, C.C. Gerry, Phys. Lett. A **365** 258-261 (2007).

[8] H. Zbinden, J. Cryptol. **13**, 207 (2000); K.M. Gheri *et al.*, Phys. Rev. A **58**, R2627 (1998); S.J. van Enk, J.I. Cirac, P. Zoller, Phys. Rev. Lett. **79**, 5178 (1997); S.J. van Enk, J.I. Cirac, P. Zoller, Science **279**, 205 (1998).

[9] T. Jennewein et al, Phys. Rev. Lett. **84**, 4729 (2000).

[10] C.M. Caves e P.D. Drummond, Rev. Mod. Phys. **66**, 481 (1994).

[11] M.J. Holland e K. Burnett, Phys. Rev. Lett. **71**, 1355 (1993).

[12] M.J. Everitt et al., Phys. Rev. A **69**, 043804 (2004); K. Moon and S. Girvin, Phys. Rev. Lett. 95, 140504 (2005);T. Ojanen and J. Salo, Phys. Rev. B 75, 184508 (2007).

[13] M.A. Nielsen, I.L. Chuang, *Quantum Computation and Quantum Information*. 1. ed. Cambridge-UK: Cambridge University Press, 2000.

[14] U. Leonhard, *Measuring the Quantum State of Light*. Cambridge-UK: Cambridge University Press, 1997.

[15] C.C. Gerry, A. Benmoussa, Physics Letters A **303**, 30 (2002).

[16] B. Baseia, J.M.C. Malbouisson, Chinese Physics Letters **18**, 1467 (2001).

[17] A.T. Avelar, B. Baseia, Optics Communications **239**, 281 (2004).

[18] M. Dakna, J. Clausen, L. Knöll, and D.-G. Welsch, Phys. Rev. A **59**, 1658 (1999).

[19] B.M. Escher, A.T. Avelar, T.M. da Rocha Filho, and B. Baseia, Phys. Rev. A **70**, 025801 (2004).

[20] K. Sanaka, Phys. Rev. A **71**, 021801(R) (2005)

Alterações físicas e químicas do solo após a aplicação de calcário e gesso agrícola em área de plantio direto

Flávio Araújo Pinto[1], Helder Barbosa Paulino[2]

[1] Graduando de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Campus Jatobá, BR 364, KM 192, Jataí, GO, CEP 75800-000. Bolsista PIBIC

[2] Professor Adjunto do Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Campus Jatobá, BR 364, KM 192, Jataí, GO, CEP 75800-000.

E-mail: flavioaraujo10@gmail.com

Palavras-chave: gesso, plantio direto

INTRODUÇÃO

A região dos Cerrados apresenta uma crescente utilização do plantio direto, o qual é compreendido por um conjunto ordenado de ações, cujo resultado almejado é a sustentabilidade agrícola, principalmente pela estabilidade que o sistema promove ao solo. Entretanto, a utilização contínua do plantio direto, com freqüente insuficiência de palhada sobre o solo, aliado às sucessivas adubações superficiais, tem resultado em alguns problemas, tais como, compactação e concentração de nutrientes na superfície do solo, com conseqüente redução no potencial produtivo das culturas SILVEIRA NETO, (2004).

O sistema plantio direto caracteriza-se por uma combinação de práticas, baseado na baixa movimentação do solo, na sua permanente cobertura e na rotação de culturas, visando a sustentabilidade produtiva e ambiental. Consiste na semeadura direta sem o preparo convencional do solo, na pequena perturbação na estrutura física, na preservação da vida biológica do mesmo, mantendo praticamente intacta a cobertura morta formada por restos culturais das colheitas anteriores, preservando a camada de palhada formada na superfície e assegurando um solo menos susceptível à erosão LANDERS, (1994).

A palhada é um fator fundamental para a consolidação do plantio direto e é originada dos restos vegetais das culturas anteriores. Porém, a formação e manutenção de cobertura morta em condições de clima tropical vem sendo fator limitante para o estabelecimento do sistema de plantio direto, principalmente no caso dos cerrados brasileiros. Este obstáculo, aliado às sucessivas adubações

superficiais, pode resultar em alterações nos atributos físicos e químicos do solo TEIXEIRA NETO, (2002).

A palhada armazenada na superfície do solo é de fundamental importância para as culturas, devido a conservação de água na superfície do solo, maior capacidade de infiltração e retenção, evitando consideravelmente as perdas por evaporação QUAGGIO, (2000).

FALLEIRO et al. (2003), mostraram que, alguns anos após o estabelecimento do sistema plantio direto, as camadas do solo mais superficiais apresentaram propriedades químicas, físicas e biológicas diferenciadas em comparação ao sistema convencional. O solo sob plantio direto encontra-se, normalmente em melhor estado, apresentando, principalmente na sua camada superficial, melhor estrutura, maiores teores de matéria orgânica e maior atividade microbiana, em conseqüência proporciona maior controle de erosão e economia com as operações de incorporação de calcário e preparo do solo.

A utilização contínua do plantio direto pode resultar em aumento da densidade do solo em diversas profundidades, reduzindo a porosidade. O trânsito de máquinas nas operações de plantio, pulverização e colheita promovem compactação, com conseqüente redução nos valores de macroporosidade, CASTRO, (1998).

Segundo QUEIROZVOLTAN et al. (2000), em solos compactados, as raízes das plantas não utilizam adequadamente os nutrientes disponíveis, uma vez que o desenvolvimento de novas raízes, responsáveis pela absorção de água e nutrientes, fica reduzido. Além disso, esses autores mencionam que a quantidade de oxigênio na rizosfera pode ser limitante nos processos metabólicos. Em solos compactados, o menor desenvolvimento do sistema radicular resulta em menor volume de solo explorado pelas raízes e, consequentemente, menor absorção de água e nutrientes.

A degradação da estrutura do solo decorrente da compactação tem provocado efeitos negativos em suas propriedades físicas, químicas e biológicas, com prejuízo ao desenvolvimento de plantas e, consequentemente, à produção de alimentos CAMARGO e ALLEONI, (1997).

Apesar de todos esses entraves ao plantio direto, recentemente NICOLODI et al. (2008) demonstrou que áreas de PD por longo período de tempo, mesmo com pH abaixo da faixa considerada ideal, saturação por alumínio elevada, teores de alumínio trocável considerados inadequados, saturação por bases inferior aos níveis

adequados, vem apresentando altos rendimentos de grãos, chegando a superar as produtividades dos solos considerados ideais nos termos da fertilidade.

A ação do calcário na neutralização da acidez geralmente é limitada ao local de sua aplicação. A correção da acidez subsuperficial é dificultada pelo aumento da retenção de cátions em decorrência da geração de cargas elétricas variáveis negativas com elevação do pH do solo. Além disso, os ânions resultantes de sua dissolução, responsáveis pela correção da acidez, reagem com outros cátions (Al^{3+}, Mn^{2+} e Fe^{2+}) na camada de deposição do calcário. No entanto, o aumento do pH na superfície do solo pode acelerar a velocidade com que o HCO_3, acompanhado por Ca e Mg, movimenta-se em profundidade para neutralizar a acidez CAIRES, (2003).

Os efeitos da calagem em profundidade somente devem ocorrer quando o pH (em água), na zona de dissolução do calcário, atingir valores da ordem de 5,2 a 5,6 RHEINHEIMER et al.. (2000). A formação e a migração de $Ca(HCO_3)_2$ e $Mg(HCO_3)_2$, para as camadas mais profundas do solo, constituem a hipótese que melhor justifica a diminuição da acidez em subsuperfície, pela prática da calagem em superfície ou incorporado, no sistema plantio direto COSTA, (2000).

O gesso agrícola ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$ – sulfato de cálcio hidratado) contém cerca de 20% de cálcio, 15% de enxofre, 0,7% de P_2O_5 e 0,6% de flúor. FURTINI NETO et al., (2001). É um subproduto da indústria de fertilizantes fosfatados, que ocorre em forma similar também em jazidas, pode ser usado na melhoria do ambiente radicular em profundidade. Este produto quando aplicado ao solo, após dissolução, devido à sua rápida mobilidade na camada arável, irá lixiviar para a subsuperfície, resultando em melhor crescimento radicular e maior absorção de água e nutrientes pelas raízes das plantas, favorecendo o aprofundamento das raízes e permitindo às plantas superar veranicos e usar mais eficientemente os nutrientes aplicados ao solo CARVALHO e RAIJ, (1997).

O gesso, além de melhorar as condições químicas em profundidade é, também, uma fonte de enxofre para as plantas, aspecto importante, uma vez que a deficiência deste nutriente é generalizada nos solos dos Cerrados (SOUSA et al., 1997). O $S\text{-}SO_4^{2-}$ do gesso distribui-se regularmente pelo perfil do solo ao invés de ficar acumulado em alguma camada SOUSA e RITCHEY, (1986).

OBJETIVOS

A pesquisa desenvolvida teve como meta avaliar o efeito da aplicação de gesso agrícola em alguns atributos químicos do solo e na produtividade de grãos de soja e milho de segunda safra em uma área em sistema de plantio direto, com e sem incorporação, na região do Sudoeste Goiano.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Fazenda Primavera, situada no Município de Serranópolis (GO), localizado nas coordenadas 18°13'49'' S e 51°58'41'' W, e altitude de 840 m. O clima da região, conforme classificação de Köppen, é do tipo AWa caracterizado como tropical úmido e seco, com estação chuvosa no verão e seca no inverno. A precipitação média anual é de 1.600 mm e a temperatura média anual de 22°C.

Durante a condução da cultura da soja no primeiro ano a pluviosidade acumulada foi de 1.400 mm, sendo que a precipitação pluviométrica foi bem distribuída neste período, e atendeu as necessidades hídricas para a produção máxima da cultura da soja, que variam entre 450 e 700 mm/safra (Doorembos & kassam, 1994).

O solo da área experimental foi classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, com textura argilosa (Embrapa, 2006). A vegetação original da área experimental era do tipo Cerrado, a qual foi desmatada em 1984 e cultivada no sistema convencional (gradagens aradora e niveladora) até 1989 com plantio unicamente de soja, posteriormente sendo cultivada no sistema de plantio direto, com a mesma cultura. A partir de 1992, até a presente data, a área está sendo cultivada em sucessão soja/milho safrinha.

Previamente à instalação do experimento fez-se uma coleta de amostras de solo para determinação dos atributos químicos e granulométricos (Tabela 1) (Embrapa, 1999), das camadas de 0-5, 5-10, 10-20 e 20-40 cm.

No presente trabalho, os tratamentos foram dispostos em blocos completos balanceados ao acaso, em esquema de parcelas subsubdivididas, com quatro repetições. Nas parcelas, com área de 413,78 m^2 (6,13 x 67,5 m), foram utilizados dois manejos: sistema de plantio direto (PD) e plantio direto com revolvimento (PC); nas subparcelas, com área de 82,76 m^2 (6,13 x 13,5 m), foram aplicadas as cinco doses de gesso agrícola: 0, 1, 2, 4 e 6 Mg ha^{-1} e, as subsubparcelas, foram

constituídas pelas quatro camadas de amostragem: 0-5, 5-10 10-20 e 20-40 cm.

Na instalação do experimento aplicou-se calcário dolomítico com 94% de PRNT, 33,65 $g.kg^{-1}$ de CaO e 16,6 $g.kg^{-1}$ de MgO e 99,1% de reatividade. A aplicação foi realizada a lanço na superfície do solo, na dose de 1,6 $Mg.ha^{-1}$, a qual foi calculada pelo método de saturação por bases, para elevá-la a 60%, na camada de 0-20 cm. O gesso agrícola foi proveniente de uma indústria de produção de ácido fosfórico em Catalão-GO. A aplicação do calcário ocorreu 22 dias antes da semeadura da soja, juntamente com a distribuição manual de gesso agrícola, em superfície, em aplicação única.

Nas parcelas sob plantio direto com revolvimento, tanto o calcário quanto o gesso foram incorporados a 20 cm de profundidade, por meio de duas gradagens com uso de grade aradora, seguida de nivelamento da área por meio de grade niveladora. Nas parcelas sob plantio direto utilizou-se a mesma dose de calcário recomendada para a camada de 0-20 cm de profundidade, não sendo incorporada devido ao sistema de manejo, esse procedimento foi realizado apenas na instalação do experimento.

A cultura utilizada foi a da soja (*Glycine max* (L.) Merrill, cv 98Y11, Pioneer no ano agrícola de 2007/2008 e a (*Glycine max* (L.) Merrill, cv TMG 123 RR Fundação MT), no ano agrícola de 2008/2009. A adubação de plantio foi de 400 kg ha^{-1} da fórmula NPK, 02-20-18, sendo realizada na linha de semeadura, nas duas safras de soja. A soja foi semeada em 21 de outubro de 2007 e em 25 de outubro de 2008, com espaçamento de 45 cm entrelinhas e densidade de 400.000 sementes ha^{-1}, para se atingir o stand de 16 plantas m^{-1}. Os demais tratos culturais foram realizados conforme recomendações técnicas para a cultura nesta região, no entanto não foi realizada a inoculação das sementes e também não foi feita adubação de cobertura na área.

Após a maturação, a soja foi colhida, sendo a área útil de cada subparcela correspondente a 24 m^2, para a safra 2007/2008 e de 3,6m^2 para a safra 2008/2009. Havendo uniformidade no número de plantas colhidas entre os tratamentos. Após a colheita, as plantas foram trilhadas, sendo então determinada a produção de grãos a 13% de umidade.

Amostras de solo foram coletadas após a colheita da soja, na safra 2007/2008 e 2008/2009, ao acaso, nas linhas e entre as linhas da cultura. A coleta de solo foi realizada por meio de pá-de-corte após ter sido cavado uma pequena

trincheira de 45 cm de comprimento no sentido perpendicular à linha de plantio, iniciando-se no meio de uma entrelinha indo até o meio da outra entrelinha.

Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Análise de Solos da Universidade Federal de Goiás, *Campus* Jataí, as quais foram preparadas para comporem amostras de terra fina seca ao ar para posterior análise dos componentes químicos do solo. Assim foram determinados os teores de Ca^{2+} e Mg^{2+} (KCl 1N), K^{+} (Mehlich-1), S-sulfato (método turbidimétrico, Vitti & Suzuki, 1978) e CTC efetiva (soma de bases + Al) (Embrapa 1999).

Após a colheita da safra de verão 2007/2008, semeou-se, no dia 18 de fevereiro de 2008 como normalmente acontece na região, a cultura do milho em sucessão à soja. Utilizou do híbrido (Zea maids (L.) Merrill, híbrido 390, Decalb) na quantidade de 4,8 plantas por metro, na expectativa de uma população final de 55.000 plantas por hectare. A adubação de plantio foi de 120 $kg.ha^{-1}$ da fórmula MAP, com adubação de cobertura de 200 kg ha^{-1} da fórmula 20-00-25. Após a safra 2008/2009 semeou-se no dia 7 de março de 2009 o híbrido (Zea maids (L.) Merrill, híbrido 30S31 Pioneer) no espaçamento de 0,8m, na expectativa de uma população final de 55.000 plantas por hectare, utilizando a mesma adubação da safrinha anterior.

A colheita do milho foi feita após a maturação e perda de umidade dos grãos, no dia 15 de julho de 2008 e no dia 27 de julho de 2009 onde se colheu as espigas das 4 linhas centrais da parcela, com cinco metros de comprimento, desprezou-se duas linhas em cada extremidade das parcelas (bordadura), perfazendo uma área útil de 18m² por parcela. Após a colheita foram feitas as determinações dos componentes de produção da cultura realizadas em Laboratório da UFG/Jataí. A colheita do restante das subparcelas foi feita com maquina e a palhada distribuída uniformemente na área, ficando a área em repouso até cultivo subseqüente da soja na safra.

As análises estatísticas foram efetuadas para os teores de nutrientes no solo e produtividade de grãos de soja. Após análise de variância, as interações foram desdobradas, quando necessário e, os tratamentos qualitativos comparados pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, calculando a DMS através do quadrado médio combinado, e os tratamentos quantitativos através de regressão. Todas as análises foram efetuadas utilizando-se o aplicativo computacional SAEG (Sistema para Análise Estatística).

RESULTADOS

• EXPERIMENTO 1 SOJA SAFRA 2007/2008

Tabela 1: Caracterização química e granulométrica de um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, em quatro diferentes camadas, no Município de Serranópolis-GO.

Cam.	pH	P	S	Ca	Mg	K	Al	H + Al	CTC	SB	m	MO	Argila	Silte	Areia
cm	H_2O	---g dm^{-3}---		----------$cmol_c$ dm^{-3} ----------							%	----------g dm^{-3}----------			
0-5	5,4	7,7	9,3	3,5	1,6	0,56	0,08	4,8	10,4	5,6	0,8	53,9	360	130	510
5-10	5,3	18,2	12,8	2,3	1,4	0,34	0,08	5,6	9,6	4,0	0,8	37,6	410	100	490
10-20	5,3	2,6	15,3	1,6	1,0	0,16	0,10	4,3	7,0	2,7	1,4	28,9	460	80	460
20-40	5,3	0,7	50,3	0,9	0,3	0,10	0,07	3,5	4,7	1,2	1,5	22,8	540	100	360

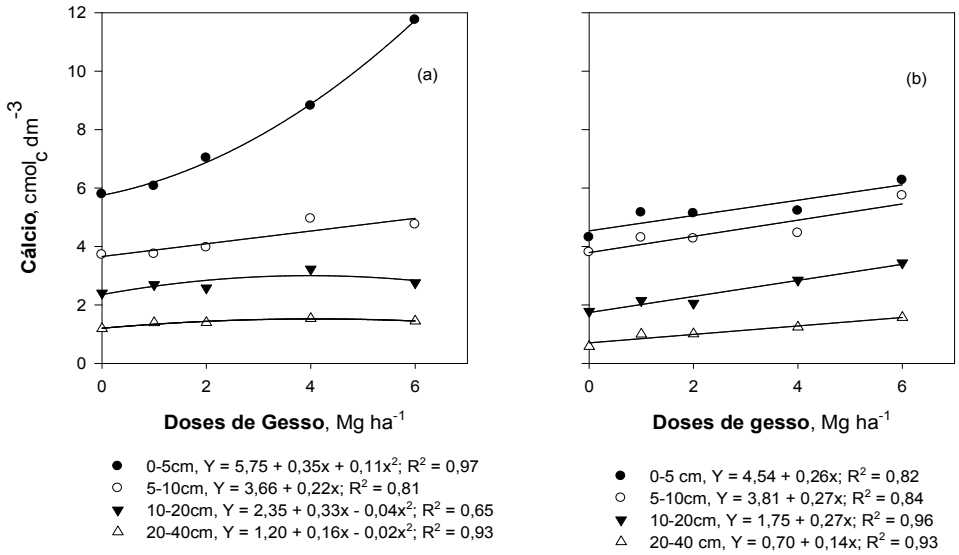


Figura 1: Teores de Ca^{2+} em profundidade, em um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, em função de doses de gesso, em sistema de plantio direto (a) e em plantio convencional (b).

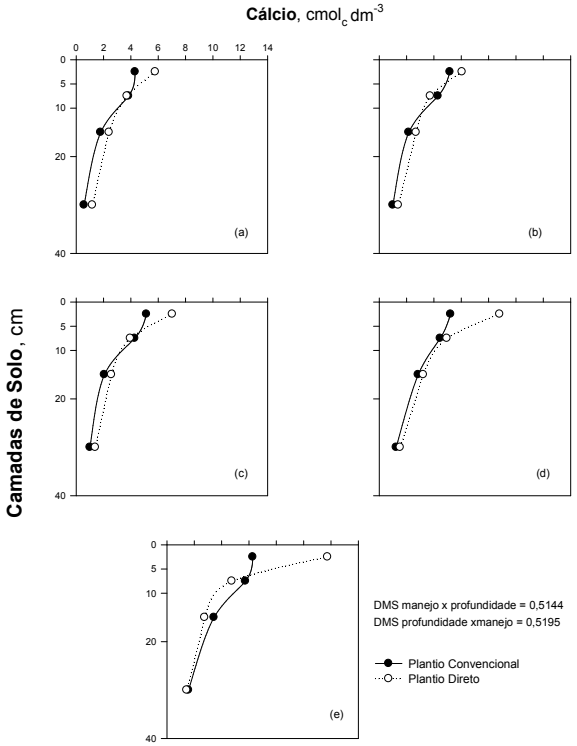


Figura 2: Teores de Ca^{2+} em um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, sob dois sistemas de manejo do solo. (Tukey a 5%): sem gesso (a), 1 Mg ha^{-1} (b), 2 Mg ha^{-1} (c), 4 Mg ha^{-1} (d) e 6 Mg ha^{-1} (e).

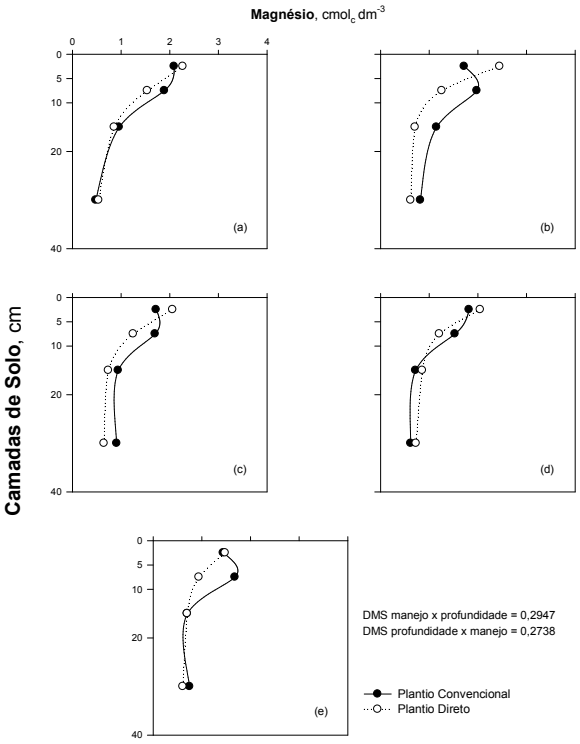


Figura 3: Teores de Mg^{2+} em um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, sob dois sistemas de manejo do solo. (Tukey a 5%): sem gesso (a), 1 Mg ha^{-1} (b), 2 Mg ha^{-1} (c), 4 Mg ha^{-1} (d) e 6 Mg ha^{-1} (e).

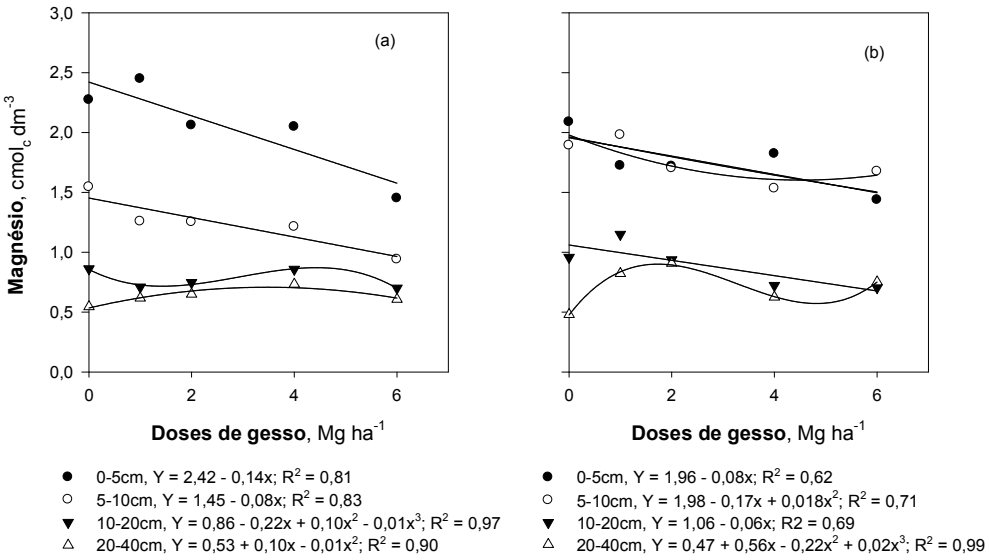


Figura 4: Teores de Mg^{2+} em profundidade, em um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, em função de doses de gesso, em sistema de plantio direto (a) e em plantio convencional (b).

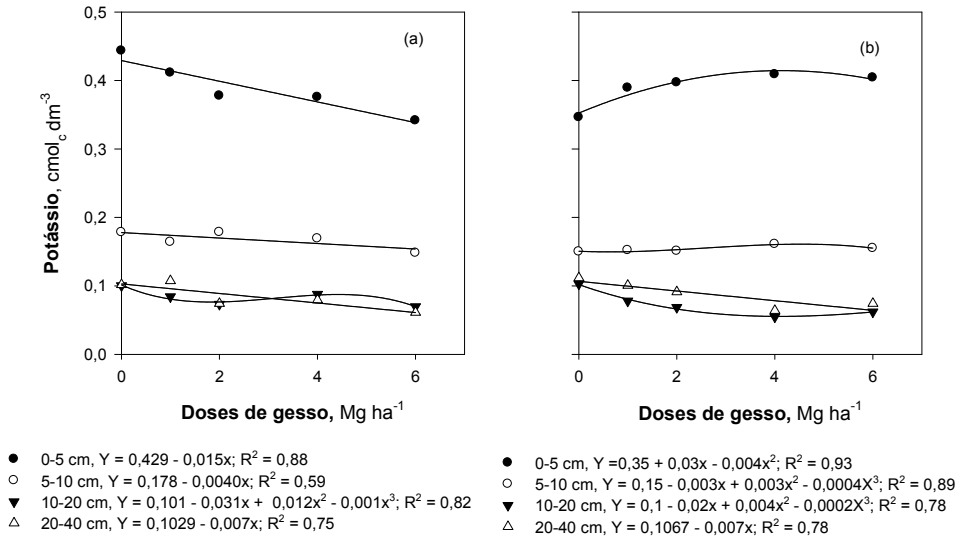


Figura 5: Teores de K^+ em profundidade, em um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, em função de doses de gesso, em sistema de plantio direto (a) e em plantio convencional (b).

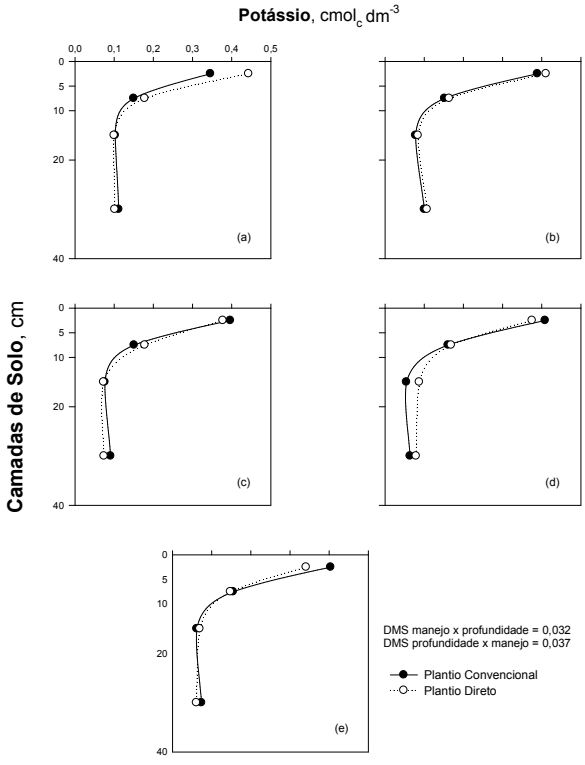


Figura 6: Teores de K^+ em um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, sob dois sistemas de manejo do solo. (Tukey a 5%): sem gesso (a), 1 Mg ha^{-1} (b), 2 Mg ha^{-1} (c), 4 Mg ha^{-1} (d) e 6 Mg ha^{-1} (e).

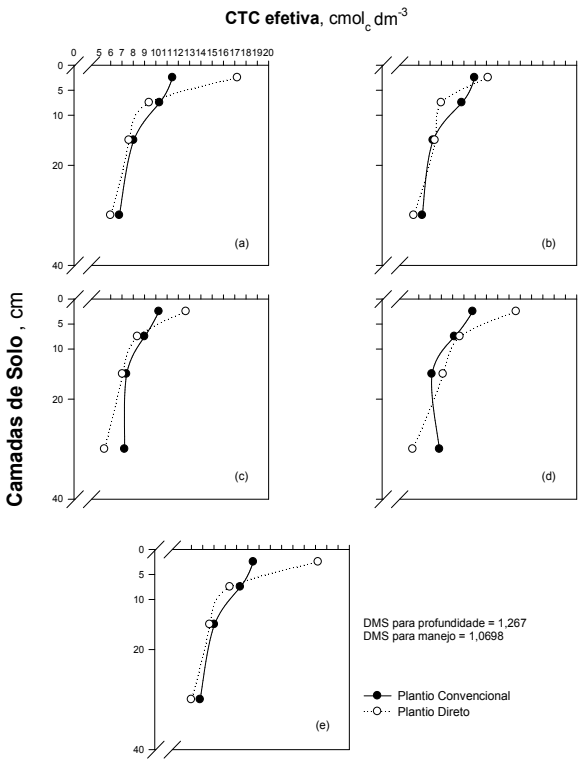


Figura 7: Capacidade de troca de cátions efetiva em um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, sob dois sistemas de manejo do solo. (Tukey a 5%): sem gesso (a), 1 Mg ha^{-1} (b), 2 Mg ha^{-1} (c), 4 Mg ha^{-1} (d) e 6 Mg ha^{-1} (e).

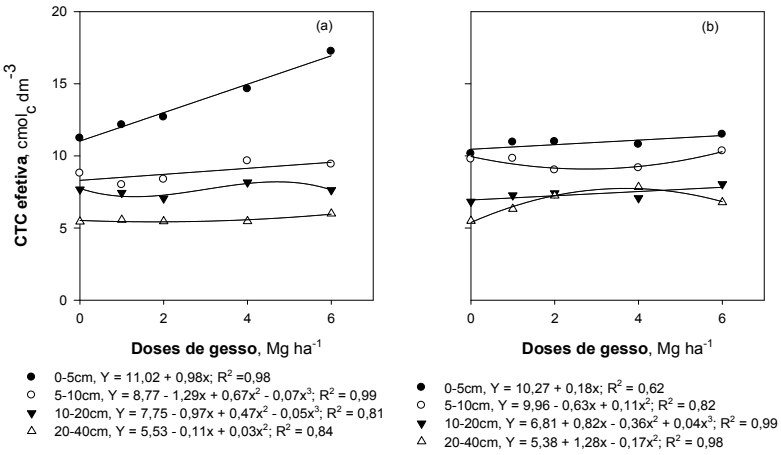


Figura 8: Capacidade de troca de cátions efetiva, em profundidade, em um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, em função de doses gesso, em sistema de plantio direto (a) e em plantio convencional (b).

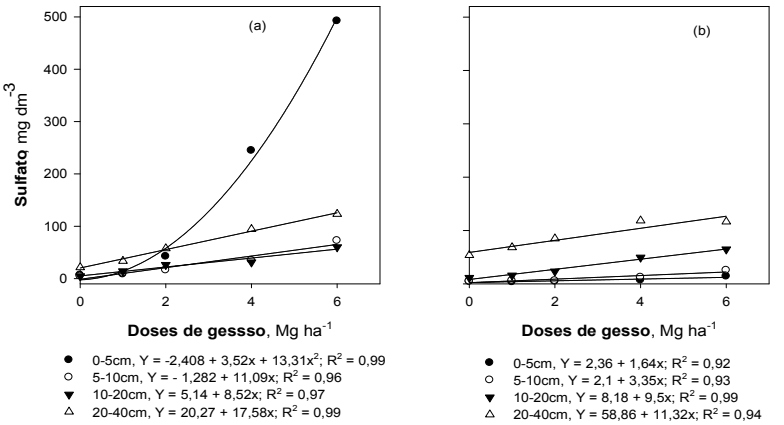


Figura 9: Teores de S-SO_4^{-2}, em profundidade, em um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, em função de doses gesso, em sistema de plantio direto (a) e em plantio convencional (b).

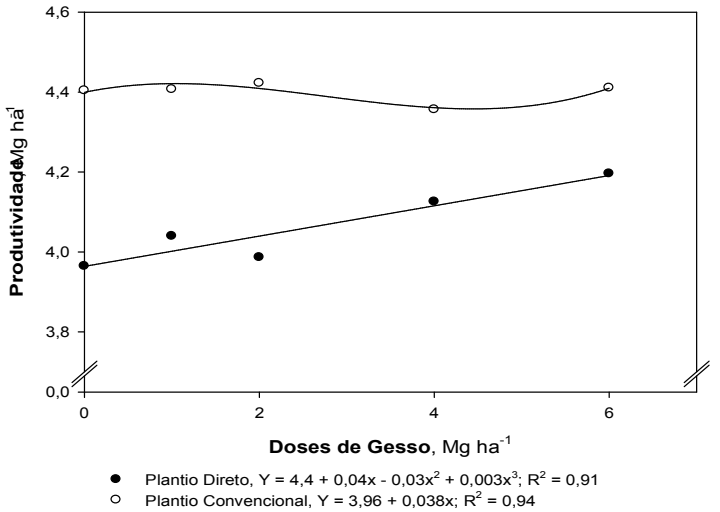


Figura 10: Produtividade de grãos de soja em função de doses de gesso em sistema de plantio direto e em plantio convencional.

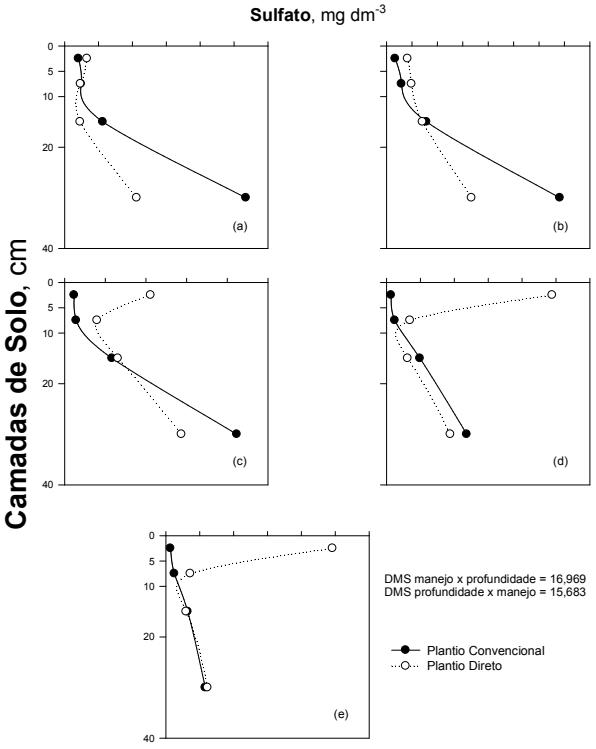


Figura 11: Teores de $S\text{-}SO_4^{2-}$ em um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, sob dois sistemas de manejo do solo. (Tukey a 5%): sem gesso (a), 1 Mg ha^{-1} (b), 2 Mg ha^{-1} (c), 4 Mg ha^{-1} (d) e 6 Mg ha^{-1} (e).

• RESULTADOS EXPERIMENTO 1 MILHO SEGUNDA SAFRA (SAFRA 2007/2008)

Tabela 2: Efeito da aplicação de gesso agrícola, em sistemas de plantio direto e convencional sobre as características agronomicas do milho safrinha 2008, na região sudoeste do Estado de Goiás.

Sistema de Cultivo	Nº Médio de Fileiras	Comprimento Médio de Espigas	Peso Médio de 100 Grãos
Convencional	16,14 a	13,73 a	8,97 a
Direto	16,09 a	13,28 b	8,68 b

Tabela 3: Efeito da aplicação de gesso agrícola, em sistemas de plantio direto e convencional sobre a produtividade do milho safrinha 2008.

Sistema de Cultivo	Doses (Kg/ha)					Média (Kg/ha)
	0	1	2	4	6	
Convencional	5138,7777 Aa	4771,1111 Aa	4916,2777 Aa	4692,9444 Aa	4964,8888 Aa	4896,777
Direto	4548,0555 Ab	4886,8333 Aa	4793,6111 Aa	4913,5000 Aa	4621,8333 Ab	4752,722
Média	4843,3888	4828,9444	4854,9444	4803,2222	4793,3333	

Tabela 4: Equações de regressão para os componentes de produção do milho de segunda safra em área de plantio direto, com aplicação de diferentes doses de gesso agrícola, incorporados e em superfície na região sudoeste do Estado de Goiás.

Componente de produção	Equação de regressão	Coeficiente de determinação (R^2)
Nº médio de fileiras	y = 16,105 + 0,0042x	5,00%
Comprimento médio de espigas (cm)	y = 13,579 - 0,0285x	58,11%
Peso de 1000 grãos (g)	y = 8,907 - 0,0316x	89,30%

• RESULTADOS EXPERIMENTO 2 SOJA SAFRA 2008/2009

Tabela 5: Equações de regressão para os componentes de produção da soja em área de plantio direto, com aplicação de diferentes doses de gesso agrícola, incorporados e em superfície na região sudoeste do Estado de Goiás.

Componente de produção	Equação de regressão	Coeficiente de determinação (R^2)
Nº de vagens por planta para o PC	y = -0,4465x2 + 2,8719x + 30,477	55,96%
Nº de vagens por planta para o PD	y = -0,9331x + 34,442	96,97%
Nº médio de grãos por planta (PC)	y = -1,3119x2 + 8,3902x + 80,861	33,60%
Nº médio de grãos por planta (PD)	y = -2,8207x + 90,114	96,49%
Comprimento medio de plantas (cm) (PC)	y = -0,3781x + 92,258	58,52%
Comprimento medio de plantas (cm) (PD)	y = 0.6431x2 - 3.074x + 90.723	93,08%
Massa de cem grãos em gramas (PC)	y = 0,09x2 - 0,5085x + 13,952	57,04%
Massa de cem grãos em gramas (PD)	y = -0,0709x2 + 0,2856x + 13,731	76,49%
Produtividade em $Kg.ha^{-1}$ (PC)	y = -113,6x2 + 663,93x + 2180,9	97,97%
Produtividade em $Kg.ha^{-1}$ (PD)	y = -163,64x + 2979,2	90,93%

• RESULTADOS EXPERIMENTO 2 MILHO SEGUNDA SAFRA (SAFRA 2008/2009)

A colheita foi realizada no dia 27 de julho de 2009, assim os dados referentes ao experimento serão encaminhados posteriormente no próximo relatório.

RESULTADOS GERADOS:

Como produto do presente projeto, teve-se um artigo encaminhado para Revista Brasileira de Ciência do Solo, dois resumos para o XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, respectivamente sob títulos: Gesso agrícola em sistema de plantio direto e convencional na região do sudoeste Goiás, Aplicação de doses de gesso incorporado e em superfície em área de plantio direto no sudoeste goiano. Gesso agrícola em milho safrinha em sistemas de cultivo.

Devido a grande quantidade de dados já obtidos os mesmos não serão discutidos no decorrer deste e sim nos trabalhos desenvolvidos com os resultados obtidos.

CONCLUSÕES

De modo geral, o experimento apresentou resultados diferentes com relação ao primeiro e segundo ano, com relação a produtividade das safra de soja verão, bem como na safra de milho de segunda safra (safrinha);

O comportamento dos nutrientes no solo, no primeiro ano após a aplicação de gesso agrícola, apresentam-se diferentes ao longo do perfil nas áreas revolvidas e não revolvidas, bem como recebem influência do teor de gesso aplicado;

O volume de resultados obtidos exigirá trabalho para publicação, uma vez que geraram resultados bastante interessantes e úteis ao agricultor da região;

A coleta dos dados de física de solo ocorrerá após a colheita da segunda safra de milho (agosto 2009), para verificação do efeito do revolvimento sobre as características físicas no tempo e se esse revolvimento as prejudica. Optou-se pela não coleta no primeiro ano, pois os resultados seriam diferentes, e o que se espera não é obter a diferença, mas sim o efeito deste no solo, e se um revolvimento nessas áreas causa prejuízos nas suas características físicas.

REFERÊNCIAS

CAIRES, E. F.; BLUM, J.; BARTH, G.; GARBUIO, F.J. & KUSMAN, M.T. Alterações químicas do solo e resposta da soja ao calcário e gesso aplicados na implantação do sistema plantio direto. **R. Bras. Ci. Solo**, 27:275-286, 2003.

CARVALHO, M. C. S. & RAIJ, B. van. Calcium sulphate, phosphogypsum and calcium carbonate in the amelioration of acid subsoils for root growth. **Plant and Soil**, v.192, p.37-48, 1997.

DIAS, L. E.; ALVAREZ, V. H.; COSTA, L. M. & NOVAIS, R. F. Dinâmica de algumas formas de enxofre em colunas de solos tratados com diferentes doses de fósforo e gesso. **R. Bras. Ci. Solo**, 18:373-380, 1994.

DOOREMBOS, J. KASSAM, A. H. **Efeito da água no rendimento das culturas**. Campina Grande: UFPB, 1994. 306p.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos.** Brasília: Embrapa Produção de Informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306p.

EMBRAPA. **Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes**. Embrapa Solos, Embrapa Informática Agropecuária. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370 p.

ERNANI, P. R.; ALMEIDA, J. A. de; SANTOS, F. C. Potássio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F. de; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B. &

NEVES, J. C. L. (Eds). **Fertilidade do Solo.** Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.551-594.

FALLEIRO, R. M; SOUZA, C. M.; SILVA, C. S. W.; SEDIYAMA, C. S.; SILVA, A. A. & FAGUNGES, J. L. Influência dos sistemas de preparo nas propriedades químicas e físicas do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.27, p.1097-1104, 2003.

FALLEIRO, R. M; SOUZA, C. M.; SILVA, C. S. W.; SEDIYAMA, C. S.; SILVA, A. A. & FAGUNGES, J. L. Influência dos sistemas de preparo nas propriedades químicas e físicas do solo. **R. Bras. Ci. Solo,** 27:1097-1104, 2003.

FRANCHINI, J. C.; BORKERT, C. M.; FERREIRA, M. M. & GAUDÊNCIO, C. A. Alterações na fertilidade do solo em sistemas de rotação de culturas em semeadura direta. **R. Bras. Ci. Solo,** 24:459-467, 2000.

JORGE, R. F.; PASSOS, R. R.; BORGES, E. N.; CORRÊA, G. F. & GONTIJO, I. Efeito de sistemas de preparo no rendimento, nutrição e características agronômicas da soja cultivada em solo de cerrado. **Biosci. J.**, 20:187-196, 2004.

KLEPKER, D. & ANGHINONI, I. Características físicas e químicas do solo afetadas por métodos de preparo e modos de adubação. **R. Bras. Ci. Solo,** 19:395-401, 1995.

KLUTHCOUSKI, J.; FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D.; RIBEIRO, C. M. & FERRARO, L. A. **Manejo do solo e o rendimento de soja, milho, feijão e arroz em plantio direto**. Scientia Agrícola, Piracicaba, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162000000100016&lng=en&nrm=iso > acesso em: 09/02/2009.

MEURER, E. J.; RHEINHEIMER, D. & BISSANI, C. A. Fenômenos de Sorção em Solos. In: MEURER, E.J. (Ed.). **Fundamentos da Química do Solo**. Porto Alegre: Evangraf, 2006. p.117-162.

NICOLODI, M.; GIANELLO, C.; ANGLINONI, I.; MARRÉ, J. & MIELNICZUK, J. Insuficiência do Conceito Mineralista para expresser a fertilidade do solo percebida pelas plantas cultivadas no sistema de plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v32, p. 2735-2744, 2008.

NOGUEIRA, M. A. & MELO, W. J. Enxofre disponível para a soja e atividade de arilsulfatase em solo tratado com gesso agrícola. **R. Bras. Ci. Solo,** 27:655-663,

2003.

QUAGGIO, J. A.; RAIJ, B. van; GALLO, P. B. & MASCARENHAS, H. A. A. Respostas da soja à aplicação de calcário e gesso e lixiviação de íons no perfil do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v.28, p.375-383, 1993.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba. Ceres/POTAFOS. 1991. 343 p.

SILVA, N. M.; RAIJ, B van; CARVALHO, L. H.; BATAGLIA, O. C. & KONDO, J .I. Efeitos do calcário e do gesso nas características químicas do solo e na cultura do algodão. **Bragantia**, Campinas, v. 56, n. 2, p.389-401, 1997.

SOUSA, D. M. G de; LOBATO, E. & REIN, T. A. **Uso do gesso agrícola nos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997, 20 p. (Embrapa-CPAC. Circular Técnica, 32).

SOUSA, D. M. G. & RITCHEY, K. D. Uso de gesso no solo de cerrado. In: SEMINÁRIO SOBRE O USO DE FOSFOGESSO NA AGRICULTURA, 1, 1986, Brasília. **Anais**... Brasília: EMBRAPA-DDT, 1986. p.119-144.

SOUSA, D. M. G. de; MIRANDA, L. N. de & OLIVEIRA, S. A. de. Acidez do solo e sua correção. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F. de; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B. & NEVES, J. C. L. (Eds). **Fertilidade do Solo.** Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.205-274.

VEZZANI, F. M. **Qualidade do sistema solo na produção agrícola. Porto Alegre**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. 184p. (Tese de Doutorado).

VITTI, G. C.; LIMA, E. & CICARONE, F. Cálcio, Magnésio e Enxofre. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006, p.299-325.

Taninos hidrolisáveis de folhas de *Eucalyptus microcorys*

Gilmara Aparecida Corrêa Fortes[a], Suzana da Costa Santos[a,*]

[a]*Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970, Brasil*

E-mail: suzana@quimica.ufg.br

Palavras-chave: *Eucalyptus microcorys*, taninos hidrolisáveis, elagitaninos

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Eucalyptus microcorys* F. Muell, conhecida como Tallowwood, ocorre na costa nordeste de New South Wales e sudeste de Queensland, Austrália. Estas são regiões de clima quente e úmido com chuvas predominantes no verão (MOORE *et al.*, 2004). Devido às semelhanças de clima, esta espécie foi trazida para o centro-oeste do Brasil principalmente por fornecer madeira de boa qualidade, que pode ser usada para confecção de móveis, postes, dormentes e na construção civil.

Além do uso madeireiro, esta espécie também apresenta grande potencial medicinal, pois seu óleo essencial é rico em 1,8-cineol (86,7%) (FOUDIL-CHERIF *et al.*, 2000; ESTANISLAU *et al.*, 2001), substância com atividade expectorante e antisséptica das vias respiratórias. A espécie *E. globulus* Labill. é a principal fonte desta substância, porém ela é de difícil cultivo em regiões de clima quente como o centro-oeste brasileiro.

Moore e colaboradores (2004) detectaram a presença de taninos hidrolisáveis nas folhas de *E. microcorys*, observando inclusive que esta classe de compostos representa aproximadamente 90% dos metabólitos secundários desta planta, ficando o óleo essencial com apenas 2%.

Taninos hidrolisáveis, incluindo o dímero macrocíclico Oenoteina B, já foram isolados no gênero *Eucalyptus*, nas espécies *E. viminalis, E. consideniana* e *E. alba* (SANTOS; WATERMAN, 2001; YOSHIDA *et al.*, 1992) e no gênero *Eugenia*, na espécie *Eugenia uniflora* (LEE *et al.*, 1997).

Vários estudos comprovaram atividades farmacológicas para esta classe de substâncias, dentre estas atividades podem-se citar: antiviral e principalmente antitumoral (OKUDA *et al.*, 1989a).

Esta espécie de *Eucalipto* que se adaptou bem ao clima e solo do Cerrado Goiano apresenta grande potencial para seu aproveitamento econômico, tanto em relação à utilização da madeira para confecção de móveis, como também para fins medicinais, pela utilização do óleo essencial e dos taninos hidrolisáveis contidos em suas folhas.

2. OBJETIVOS

Realizar o isolamento e elucidação estrutural de taninos hidrolisáveis presentes nas folhas da espécie *E. microcorys*.

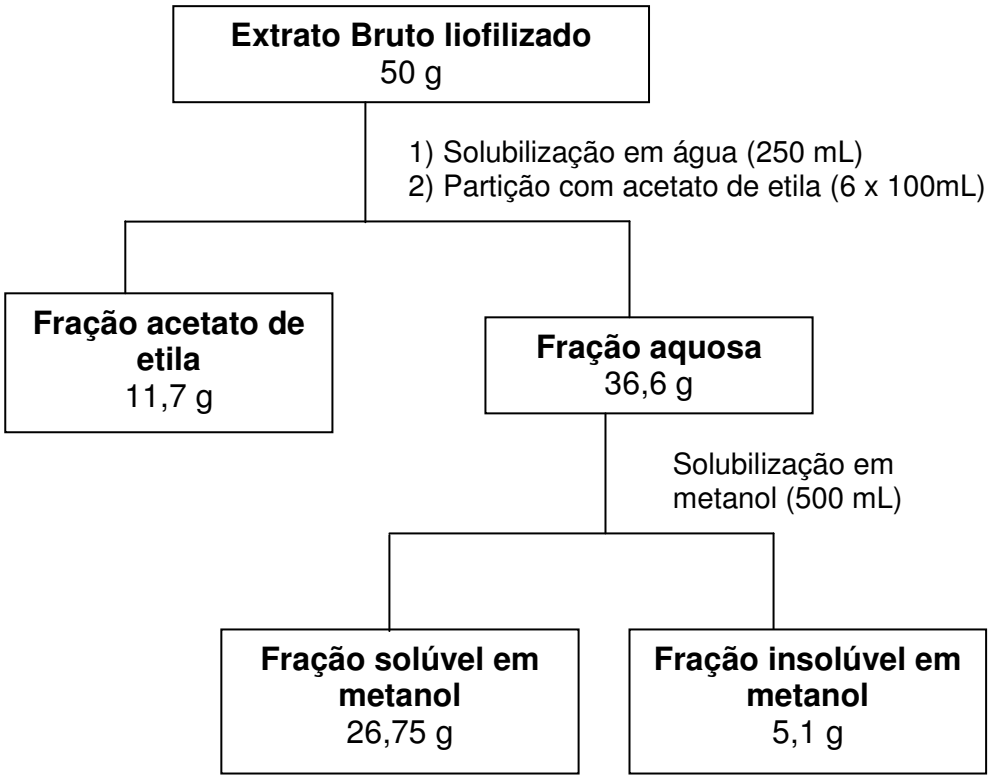
3. METODOLOGIA

3.1. Preparação do extrato bruto

Folhas de *E. microcorys* foram coletadas nos meses de julho e outubro de 2004 na reserva ambiental do IBAMA (FLONA-Silvânia). Após a secagem, que foi realizada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as folhas foram moídas em moinho de facas. Uma massa de 670 g de folhas foi extraída exaustivamente com acetona:água 50% (HAGERMAN, 1988), total de 5 litros. A acetona foi evaporada sob vácuo e o extrado aquoso foi filtrado em funil de Buchner para eliminação de clorofilas e graxas (WATERMAN; MOLE, 1994). Este extrato aquoso foi então liofilizado e obteve-se 56,15 g de extrato seco.

3.2. Fracionamento do extrato bruto com acetato de etila e metanol

Uma parte do extrato bruto seco (50 g) foi solubilizada em 250 mL de água destilada. Efetuou-se então partição com acetato de etila (6 x 100 mL), utilizando-se funil de separação. As frações orgânicas reunidas foram evaporadas em evaporador rotativo e obteve-se 11,7 g de fração acetato de etila (Esquema 1). A fase aquosa foi liofilizada e obteve-se 36,6 g de fase aquosa. Uma parte desta fase aquosa (32 g) foi parcialmente solubilizada em 500 mL de metanol. Após filtração à vácuo, separou-se a fração insolúvel em metanol (5,1 g) e evaporou-se o filtrado, obtendo-se assim a fração solúvel em metanol (26,75 g).



Esquema 1. Fracionamento do extrato bruto com acetato de etila e metanol

3.3. Cromatografia da fração solúvel em metanol

3.3.1. Cromatografia da fração solúvel em metanol em Diaion HP-20

A fração solúvel em metanol foi dividida em duas porções (13,42 e 13,33g) e cada uma foi submetida à cromatografia em coluna com Diaion HP-20 como adsorvente (coluna de adsorvente 27 x 4 cm). Utilizou-se gradiente de água, água/metanol (20, 40, 60 e 80% metanol) até metanol puro (Esquema 2). Foram coletadas 55 frações em cada coluna, que foram reunidas em seis frações principais após análise por cromatografia em camada delgada (Figura 1), tendo sílica-gel como adsorvente e ácido fórmico, formiato de etila e tolueno (1:7:1) como eluente e revelação com solução de $FeCl_3$/HCl.

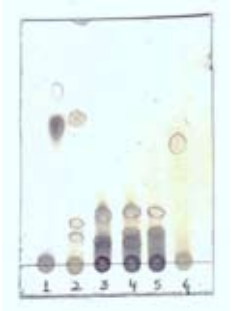
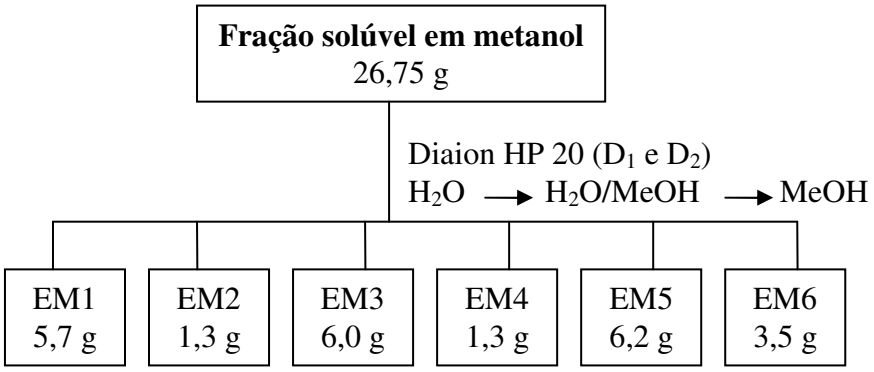


Figura 1. Cromatografia em camada delgada do fracionamento em Diaion HP-20



Esquema 2. Cromatografia em Diaion HP-20 da fração solúvel em metanol

3.3.2. Fracionamento da fração EM3

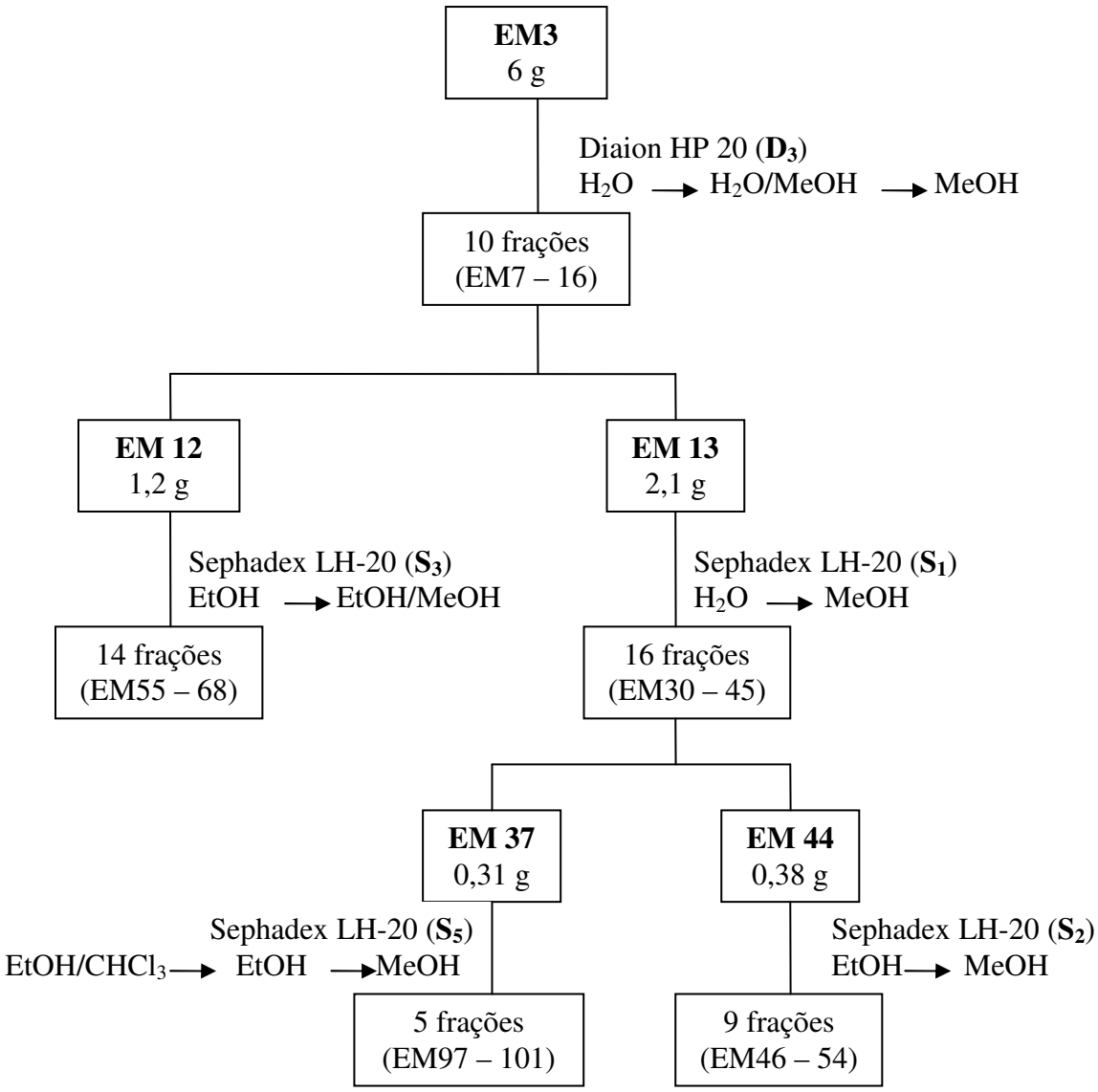
A fração EM3 (6,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna com Diaion HP-20 como adsorvente (coluna de adsorvente 27 x 4 cm). Utilizou-se gradiente de água, água/metanol (5, 10, 15 ....50% metanol) e metanol puro (Esquema 3). Foram coletadas 63 frações, que foram reunidas em dez frações principais após análise por cromatografia em camada delgada, com as mesmas condições usadas anteriormente. Essas 10 frações receberam os códigos: EM7 a EM16.

A fração EM13 (2,1 g) foi refracionada em coluna com Sephadex LH-20 como adsorvente (coluna de adsorvente 28 x 4 cm). Utilizou-se gradiente de água, água/metanol (10, 20, 30 ....90% metanol) e metanol. Foram coletadas 60 frações, que foram reunidas em 16 frações principais (EM 30 a EM45) após análise por cromatografia em camada delgada (ccd).

A fração EM44 (0,38 g) foi refracionada em coluna com Sephadex LH-20 (coluna de adsorvente 26 x 1,8 cm). Utilizou-se gradiente de etanol, etanol/metanol (10, 20, 30....90% metanol) e metanol. Foram coletadas 44 frações, que foram reunidas em 9 frações principais (EM 46 a EM54) após análise por ccd.

A fração EM37 (0,31 g) foi refracionada em coluna com Sephadex LH-20 (26 x 1,8 cm). Gradiente: etanol/clorofórmio (1:1 e 7:3), etanol, etanol/metanol (10, 20, 30....80% metanol) e metanol. Foram coletadas 36 frações, que foram reunidas em 5 frações principais (EM 97 a EM101) após análise por ccd.

A fração EM12 (1,2 g) foi refracionada em coluna com Sephadex LH-20 (28 x 4 cm). Gradiente: etanol, etanol/metanol (10, 20, 30....90% metanol) e metanol. Foram coletadas 56 frações, que foram reunidas em 14 frações principais (EM 55 a EM68) após análise por ccd (Esquema 3).



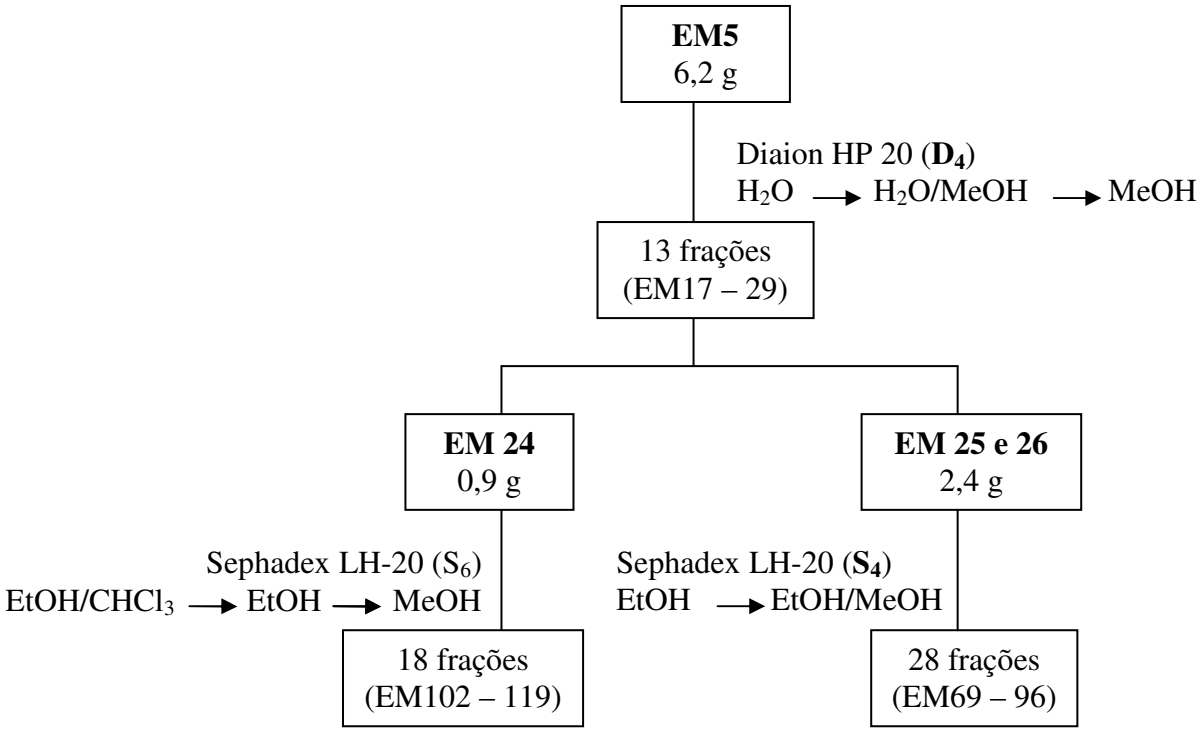
Esquema 3. Fracionamento da fração EM3

3.3.3. Fracionamento da fração EM5

A fração EM5 (6,2 g) foi submetida à cromatografia em coluna com Diaion HP-20 (27 x 4 cm). Gradiente: água, água/metanol (5, 10, 15 ....50% metanol) e metanol (Esquema 4). Foram coletadas 56 frações, que foram reunidas em 13 frações principais (EM17 a EM29) após análise por ccd.

As frações EM25 e EM26 (2,4 g) foram reunidas e refracionadas em coluna com Sephadex LH-20 (26 x 4 cm). Gradiente: etanol, etanol/metanol (10, 20, 30....90% metanol) e metanol. Foram coletadas 89 frações, que foram reunidas em 28 frações principais (EM 69 a EM96) após análise por ccd.

A fração EM24 (0,9 g) foi refracionada em coluna com Sephadex LH-20 (26 x 1,8 cm). Gradiente: etanol/clorofórmio (1:1 e 7:3), etanol, etanol/metanol (10, 20, 30....90% metanol) e metanol. Foram coletadas 50 frações, que foram reunidas em 18 frações principais (EM 102 a EM119) após análise por ccd.



Esquema 4. Fracionamento da fração EM5

3.4. Análise espectroscópica das frações obtidas a partir da cromatografia

As frações mais puras foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear de H^1 e C^{13}, uni e bidimensional, em equipamento Brucker 500, solubilizadas em acetona-D_6, para algumas amostras foi necessária adição de gotas de D_2O.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração e fracionamentos

Dando continuidade ao estudo de sazonalidade que foi realizado previamente com esta espécie de *Eucalyptus* (SOUZA *et al.*, 2007), escolhemos amostras de folhas de meses que continham altos teores de taninos hidrolisáveis, julho e outubro, para preparação do extrato bruto, que apresentou um rendimento de extração de 8,4%. O primeiro fracionamento deste extrato foi realizado através de partição com acetato de etila (Esquema 1), com isso retiram-se da fase aquosas as substâncias

de média polaridade, tais como: flavonóides, ácidos fenólicos e alguns monômeros de taninos hidrolisáveis. A fase aquosa, após liofilização, foi dissolvida em metanol para separar os açúcares e polissacarídeos, insolúveis em metanol, dos taninos hidrolisáveis (monômeros e dímeros), solúveis em metanol.

Iniciou-se o fracionamento pela fração solúvel em metanol (Esquema 2), por ser esta a mais rica em taninos hidrolisáveis e a que apresentou maior massa (26,7 g). O gel vinílico polimérico Diaion HP-20 foi escolhido por ser o mais adequado para uma separação mais grosseira de substâncias polares (OKUDA *et al*., 1989b), com isso obtivemos seis frações distintas, usando um gradiente de água para metanol.

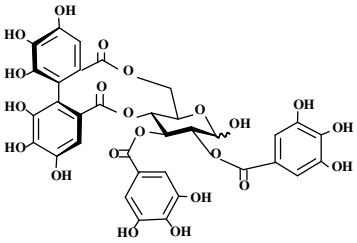
As duas frações que se mostraram mais promissoras, EM3 e EM5, foram refracionadas (Esquemas 3 e 4), inicialmente com o uso de Diaion HP-20, devido a elevada massa de cada fração (~6 g). Os refracionamentos seguintes foram realizados com o gel dextrano hidroxipropilado, Sephadex LH-20, que mostrou separações mais eficientes quando um gradiente com aumento de polaridade foi usado, clorofórmio/etanol, etanol e metanol, desta forma o mecanismo de separação é mais por adsorção de substâncias do que por filtração em gel (OKUDA *et al*., 1989b). Após os fracionamentos foram obtidas quatro substâncias puras que foram identificadas por espectroscopia.

4.2. Caracterização espectroscópica dos taninos isolados

4.2.1. Tellimagrandin I

O elagitanino Tellimagrandina I (**1**) (2,3-di-*O*-galoil-4,6-*O*-(s)-hexahidroxidi-fenoil-glicose) foi obtido nas frações EM 49 (5,0 mg) e EM 110 (57 mg), sua estrutura foi determinada através de seus espectros de RMN H^1, COSY e HMQC e comparação com dados da literatura (HATANO *et al.*, 1988). Este elagitanino foi isolado pela primeira vez da espécie *Tellima grandiflora* e está presente em várias outras espécies que contem taninos hidrolisáveis (OKUDA *et al.*, 1993).

A Tellimagrandina I (**1**) existe como uma mistura de anômeros α e β, pois ela é um hemiacetal, sua hidroxila no C-1 não está esterificada, com isso seu espectro de RMN H^1 é relativamente complexo (Figura 2). Os sinais de prótons e carbonos foram identificados através dos espectros de COSY e HMQC (Tabela 1).



Tellimagrandina I (1)

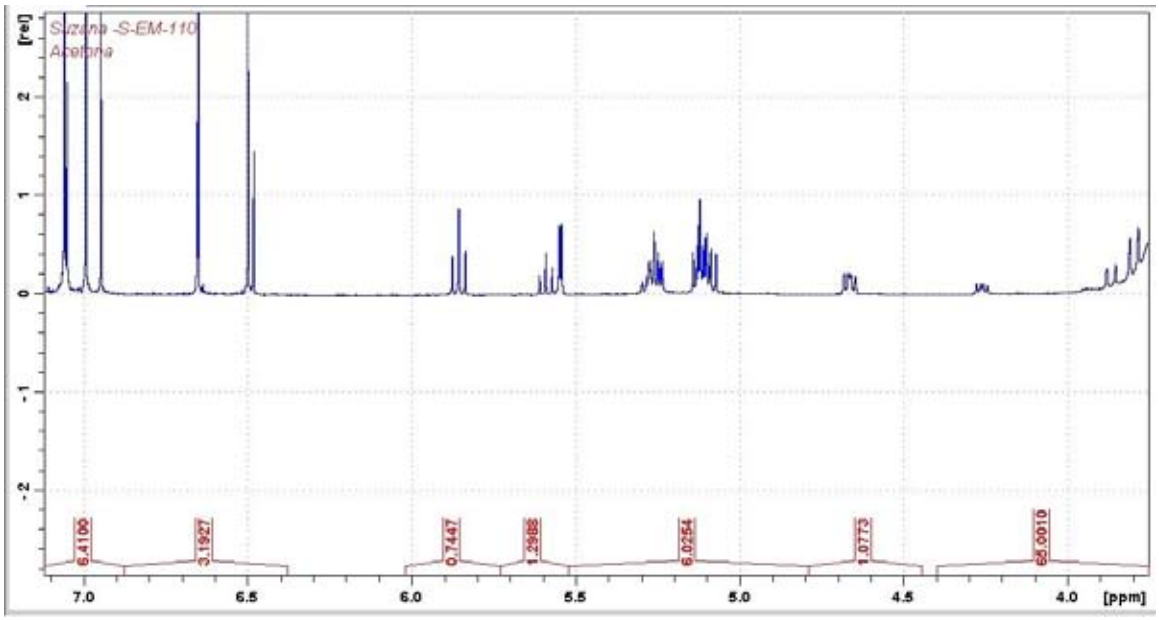


Figura 2. Espectro de RMN H^1 do elagitanino Tellimagrandina I **(1)**

Tabela 1. Tellimagrandina I - dados de RMN H^1 e C^{13}

	δH^1		δC^{13}	
C/H	α anômero	β anômero	α anômero	β anômero
1	5,55 d (4)	5,08 d (8)	91,44	96,97
2	5,11 dd (4; 10)	5,25 dd (8;10)	73,13	74,36
3	5,86 t (10)	5,59 t (10)	71,33	73,68
4	5,12 t (10)	5,12 t (10)	71,25	71,28
5	4,66 ddd (1;6;10)	4,26 ddd (1;6;10)	67,44	72,23
6	5,26 dd (6; 13)	5,26 dd (6; 13)	63,65	63,65
6	3,79 dd (1; 13)	3,87 dd (1; 13)	-	-
Galoil 2' e 6'	7,00s, 7,06s	6,95s, 7,05s	110	
HHDF 2' e 6'	6,48s, 6,65s	6,50s, 6,66s	107,9, 108,3	

Espectro realizado em acetona-d_6. (Constantes de acoplamento em Hz)

4.2.2. Oenotheina B

O elagitanino dimérico Oenotheina B (**2**) foi obtido nas frações EM 51, 52 e 53 (massa total 203 mg), sua estrutura foi deteminada através de seus espectros de RMN de H^1 e C^{13} e por comparação com dados da literatura (SANTOS; WATERMAN, 2001). Este elagitanino foi isolado pela primeira vez da espécie *Oenothera erythrosepala* e está presente em outras espécies da família Onagraceae e também em outras espécies do gênero *Eucalyptus* (OKUDA *et al.*, 1993; SANTOS; WATERMAN, 2001).

A Oenotheina B (**2**) é um dímero macrocíclico formado por duas unidades de Tellimagrandina I (**1**). Apesar das duas glicoses estarem na forma de hemiacetais, este dímero não existe como uma mistura de α e β anômeros, devido à rigidez de sua estrutura que favorece apenas um dos anômeros em cada unidade. Esta rigidez também é a causa do espectro de RMN H^1 apresentar alguns sinais alargados, pois a estrutura macrocíclica dificulta a rotação livre das ligações (Figura 3).

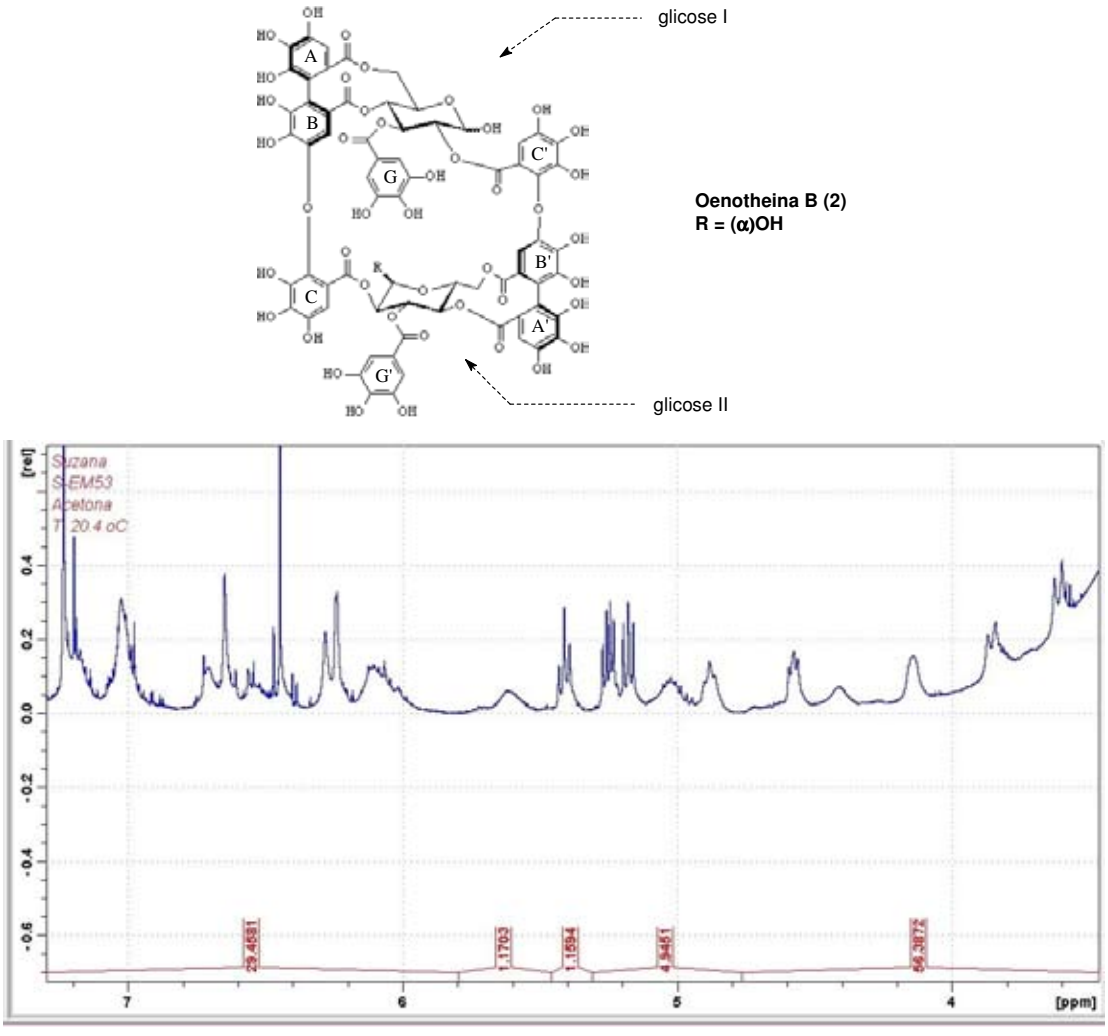


Figura 3. Espectro de RMN H^1 do elagitanino Oenotheina B **(2)**

Os dados de prótons e carbonos se encontram na Tabela 2 e foram obtidos por comparação com espectros originais.

Tabela 2. Oenotheina B - dados de RMN H^1 e C^{13}

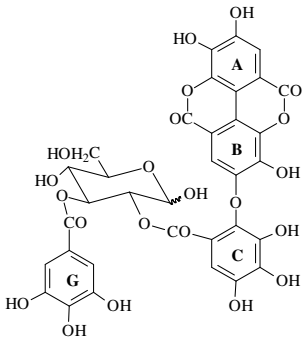
	Glicose I		Glicose II	
C/H	δ H^1	δ C^{13}	δ H^1	δ C^{13}
1	4,41 largo	95,76	6,24 d (3)	91,51
2	5,18 dd (8; 10)	74,81	6,03 largo	74,45
3	5,42 t (10)	73,28	6,11 largo	71,40
4	4,89 t (10)	73,80	5,61 largo	70,53
5	4,15 dd (5; 10)	72,00	4,58 dd (7; 10)	69,07
6	5,02 largo	63,25	5,25 dd (7; 13)	63,25
6	3,86 d (13)	-	3,61 d (13)	-
Anel A e A'	6,65 s	107,75	6,45 s	107,75
Anel B e B'	6,29 s	105,90	6,45 s	106,30
Anel C e C'	7,03 largo	110,29	6,65 s	109,00
Anel G e G'	7,24 s	110,50	7,03 largo	110,29

Espectro realizado em acetona-d_6. (Constantes de acoplamento em Hz)

4.2.3. Oenotheina C

O elagitanino Oenotheina C (**3**) foi obtido na fração EM 106 (12,0 mg), sua estrutura foi determinada através de seus espectros de RMN H^1, C^{13} dept 135, COSY, HMQC e HMBC e comparação com dados da literatura (HATANO *et al.*, 1989). Este elagitanino foi isolado pela primeira vez de folhas da espécie *Oenothera erythrosepala* e está presente também em frutos de *Cornus officinalis* (HATANO *et al.*, 1989).

A Oenotheina C (**3**) existe como uma mistura de anômeros α e β, pois ela é um hemiacetal, sua hidroxila no C-1 não está esterificada, com isso seu espectro de RMN H^1 é relativamente complexo (Figura 4). Esse elagitanino apresenta sinais característicos de grupo valoneoil lactonizado: dois singletes em δ 7,64 ppm (1 H cada), dois singletes em δ 7,03 e 7,08 ppm (1 H cada) e dois singletes em δ 7,14 e 7,16 ppm (1 H cada). O grupo galoil é caracterizado pelos singletes em δ 6,91 e 7,02 ppm (2 H cada). Os sinais de prótons e carbonos foram identificados através dos espectros de COSY, HMQC e HMBC (Tabela 3).



Oenotheina C (3)

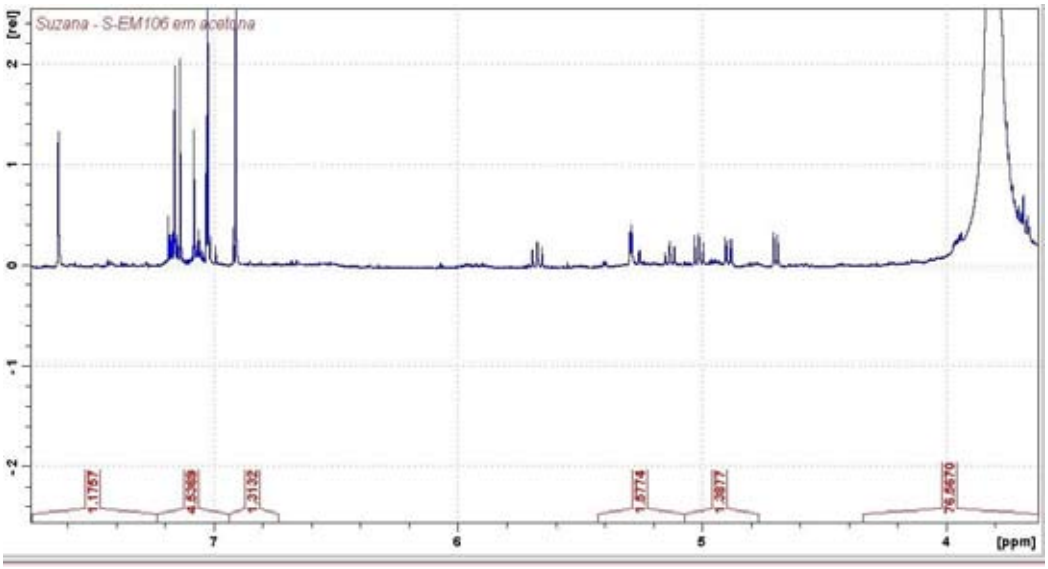


Figura 4. Espectro de RMN H^1 do elagitanino Oenotheina C **(3)**

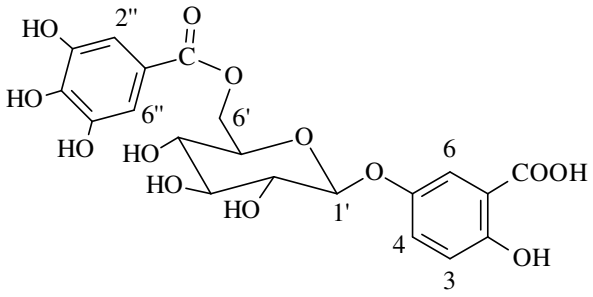
Tabela 3. Oenotheina C - dados de RMN H^1 e C^{13}

	δH^1		δC^{13}	
C/H	α anômero	β anômero	α anômero	β anômero
1	5,29 d (4)	4,69 d (8)	89,5	94,4
2	4,89 dd (4; 10)	5,01 dd (8; 9)	72,1	73,0
3	5,67 dd (9; 10)	5,13 t (9)	73,2	76,0
4	3,79 t (10)	3,68 t (10)	68,5	68,5
5	3,95 ddd (2; 5; 10)	3,43 ddd (2; 5; 10)	71,7	76,6
6	3,73 dd (5; 12)	3,68 dd (5, 10)	60,9	60,9
6	3,67 dd (2; 12)	3,67 dd (2; 12)	-	-
Anel A	7,64 s	7,64 s	110,5	
Anel B	7,08 s	7,03 s	108,6	
Anel C	7,16 s	7,14 s	109,4	
Anel G	7,02 s	6,91 s	109,0	

Espectro realizado em acetona-d_6 + D_2O. (Constantes de acoplamento em Hz)

4.2.4. Ácido gentisico 5-*O*-(6'-*O*-galloyl)-*β*-D-glicopiranosídeo

O galoil éster, ácido gentisico 5-*O*-(6'-*O*-galloyl)-*β*-D-glicopiranosídeo (**4**), foi obtido na fração EM 100 (14,0 mg), sua estrutura foi determinada através de seus espectros de RMN H^1, C^{13} dept 135, COSY, HMQC e HMBC e comparação com dados da literatura (ISHIMARU *et al*., 1987). Este galoil éster foi isolado pela primeira vez em espécies do gênero *Quercus* (ISHIMARU *et al*., 1987). O seu espectro de RMN H^1 é relativamente simples (Figura 5).



(4)

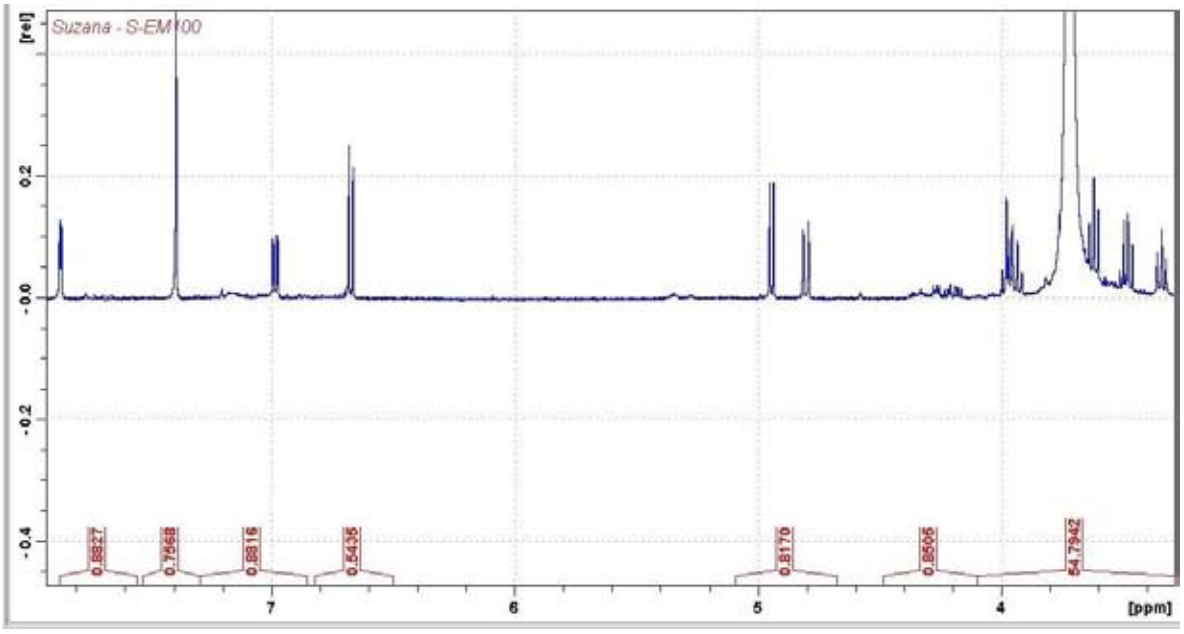


Figura 5. Espectro de RMN H^1 do galoil éster **(4)**

Os sinais de prótons e carbonos foram identificados através dos espectros de COSY, HMQC e HMBC (Tabela 4).

Tabela 4. composto (**4**) - dados de RMN H^1 e C^{13}

Glicose			Anéis		
C/H	δ H^1	δ C^{13}	C/H	δ H^1	δ C^{13}
1'	4,94 d (8)	101,6	1''	-	119,7
2'	3,48 dd (8; 9)	73,4	2'' e 6''	7,38 s	108,8
3'	3,62 t (9)	76,2	3'' e 4''	-	145,6
4'	3,34 t (10)	70,4	5''	-	138,2
5'	3,93 t (9)	74,4	CO	-	166,8
6'	4,82 d (10)	64,9	1	-	118,7
6'	3,98 t (9)	-	2	-	156,7
			3	6,67 d (9)	116,4
			4	6,98 dd (3; 9)	122,6
			5	-	149,7
			6	7,85 d (3)	116,0
			CO_2H	-	173,5

Espectro realizado em acetona-d_6 + D_2O. (Constantes de acoplamento em Hz)

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível o isolamento e identificação de quatro compostos fenólicos, sendo três elagitaninos e um galoil éster. Esses compostos, além de outros que serão purificados de outras frações, serão utilizados para um estudo mais detalhado da sazonalidade desta planta. Com isso visamos estudar a biossíntese destes compostos fenólicos e sua correlação com fatores ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Estanislau, A.A.; barros, F.A.S.; Pena, A.P.; Santos, S.C.; Ferri, P.H.; Paula, J.R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. *Rev. Bras. Farmacognosia* 11, 95-100, 2001.

Foudil-Cherif, Y.; Meklati, B.Y.; Verzera, A.; Mondello, L.; Dugo, G. Chemical examination of essential oils from the leaves of nine Eucalyptus species growing in Algeria. *J. Essential Oil Res.* 12,186-191, 2000.

Hagerman, A.E. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. *J. Chem. Ecol.* 14, 453-461, 1988.

Hatano, T.; Yoshida, T.; Shingu, T.; Okuda, T. ^{13}C Nuclear Magnetic Ressonance Spectra of Hydrolysable Tannins. II. Tannins forming anomer mixtures. *Chem. Pharm. Bull*. 36, 2925-2933, 1988.

Hatano, T.; Ogawa, N.; Kira, R.; Yasuhara, T.; Okuda, T. Tannins of Cornaceous plants. I. Cornusiins A, B and C, dimeric, monomeric and trimeric hydrolysable tannins from *Cornus officinalis*, and orientation of valoneoyl group in related tannins. *Chem. Pharm. Bull*. 37, 2083-2090, 1989.

Ishimaru, K.; Nonaka, G.; Nishioka, I. Tannins and related compounds. Part 54. Phenolic glucoside gallates from Quercus mongolica and Q. acutissima. *Phytochemistry* 26(4), 1147-52, 1987.

Lee, M. H.; Nishimoto, S.; Yang, L. L.; Yen, K.Y.; Hatano, T.; Yoshida, T.; Okuda, T. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. *Phytochemistry* 44, 1343-1349, 1997.

Moore, B.D.; Wallis, I.R.; Wood, J.T.; Foley, W.J. Foliar nutrition, site quality, and temperature influence foliar chemistry of Tallowwood (Eucalyptus microcorys). *Ecol. Monogr.* 74, 553-568, 2004.

Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T. Ellagitannins as active constituints of medicinal plants. *Planta Medica* 55, 117-122,1989a.

Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T. New methods of analyzing tannins. *Journal of natural Products*. 52, 1-31, 1989b.

Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry* 32(3), 507-521, 1993.

Santos, S.C; Waterman, P.G. Polyphenols from *Eucalyptus consideriana* and *Eucalyptus viminalis*. *Fitoterapia* 72, 95-97, 2001.

Souza, L.S.; Ferri, P.H.; Santos, S.C. Variação sazonal de fenóis e nutrientes em folhas de *Eucalyptus microcorys*, Anais do XLVII Congresso Brasileiro de Química, IC-277, 2007.

Waterman, P.G.; Mole, S. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994, 238 p.

Yoshida, T.; Maruyama, T.; Nitta, A.; Okuda, T. Eucalbanin-A, Eucalbanin-B and Eucalbanin-C, monomeric and dimeric hydrolysable tannins from *Eucalyptus alba* Reinw. *Chem. Pharm. Bull*. 40,1750-1754, 1992.

Aspectos histológicos e morfométricos da espessura da epiderme e da membrana basal da pele de felinos de 20 e 60 dias de vida, clinicamente saudáveis

ANDRADE, Patrícia Bueno[1]**; CIRILO,** Tânia Rafaela Cardoso[2]; **PARENTE,** Leila Maria Leal[3]; **DUARTE**, Francine Oliveira Souza[4]**; CONCEIÇÃO,** Maria da[5]

Palavras-chave: pele, felino neonatal e pediátrico, epiderme, membrana basal.

1. INTRODUÇÃO

A pele funciona como uma barreira anatômica e fisiológica entre o corpo do animal e o meio ambiente, oferecendo proteção contra a perda corpórea de fluidos e seus componentes sensoriais permitem ao animal a percepção de calor, frio, dor, tato e pressão. A pele regula a temperatura corpórea, armazena água, vitaminas, gorduras, carboidratos, proteínas e outras substâncias. A pele, os pêlos e tecidos subcutâneos de um gatinho recém-nascido equivalem a 24% de seu peso vivo. Por ocasião da maturidade, essas estruturas representam apenas 12% do seu peso corpóreo (SCOTT *et al.,* 1996).

A pele é bastante heterogênea, com uma variedade de componentes celulares e tissulares como a epiderme, a derme, os apêndices, os músculos eretores dos pêlos, e está intimamente relacionada com a hipoderme (FRASER, 1988). A epiderme é constituída pela camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida e córnea. A camada basal da pele é monocelular e está localizada na zona da membrana basal que separa a derme da epiderme. As mitoses das células da camada basal ocorrem principalmente à noite e, como a maioria das amostras histológicas é obtida durante o dia, as figuras de mitose raramente são vistas nos cortes histológicos da pele (GARTNER & HIATT, 1999).

A camada espinhosa é composta de células-filhas da camada basal e a pele hirsuta possui a espessura de uma a três lâminas celulares. A camada granulosa está inconstantemente presente na pele hirsuta, possuindo a espessura de uma a duas lâminas celulares e no seu citoplasma há grânulos de querato-hialina. A camada córnea contém várias lâminas celulares cornificadas, é a camada mais

externa da epiderme e está em constante descamação na porção periférica (MULLER *et al.,* 1985; BANKS, 1992; SCOTT *et al.,* 1996; GARTNER & HIATT, 1999; CONCEIÇÃO, 2003).

Scott *et al.* (1996) salientaram que é importante se atentar ao fato que durante a preparação histológica dos fragmentos de pele, envolvendo a fixação, a desidratação e inclusão em parafina, perde-se mais ou menos a metade da camada córnea.

Ham (1967) afirmou que, as membranas basais representam um complexo material, amorfo e permeável, derivado das células epiteliais e de uma malha de sustentação de fibras reticulares, sendo provável que o componente amorfo das membranas basais contenha um tipo de carboidrato PAS positivo.

As zonas da membrana basal são a interface físico-químicas entre a epiderme, derme e outras estruturas da pele, tais como: apêndices epidérmicos, vasos e músculos eretores do pêlo. Esta zona é importante para fixar a epiderme à derme, garantindo uma epiderme funcional e proliferativa, manter a arquitetura tecidual, cicatrizar feridas e funcionar como barreira (MULLER *et al*., 1985; SCOTT *et al*., 1996).

A epiderme da pele dos felinos adultos pode possuir cerca de 25 µm de espessura, já a epiderme dos coxins e do plano nasal pode possuir até 900 µm de espessura (YAGER & SCOTT, 1993) e diversos valores já foram estabelecidos para a espessura da epiderme da pele hirsuta de cães e gatos, mas, em aspectos gerais, ela não ultrapassa 100 µm de espessura (KRISTENSEN, 1975).

Está descrito na literatura científica, quantidade considerável de dados em neonatologia de algumas espécies animais como bovinos, eqüinos, suínos e ovinos. A neonatologia humana apresenta uma quantidade numerosa de publicações. No entanto, quanto aos felinos e caninos as informações são escassas. Pouco foi encontrado na literatura consultada, em relação ao desenvolvimento e amadurecimento das estruturas da pele de felinos, no período neonatal.

Se, por um lado, as comparações dos resultados de trabalhos realizados nesta área ficam prejudicadas pela ausência de referências bibliográficas, por outro, as neonatologias felina e canina fornecem um vasto campo para que novas pesquisas sejam desenvolvidas.

Considerando este aspecto, por meio do estudo histológico e morfométrico da epiderme e membrana basal da pele de felinos neonatos (neonato – do nascimento até seis semanas de vida) e pediátrico (pediátrico – de seis semanas até 12 semanas de vida), pode-se trazer, de alguma forma, contribuição à Medicina Veterinária e a diversas áreas que utilizam estes animais como modelo experimental.

2. OBJETIVOS

A pele é uma eficiente barreira de mão dupla entre o ambiente interno e externo. A pele impede a perda de água, a movimentação de eletrólitos e de macromoléculas no ambiente externo, e ainda reduz ao mínimo a penetração de agentes físicos, químicos e microbiológicos causadores de injúrias (SCOTT *et al.,* 1996). Por exercer essas funções, é de grande importância o conhecimento da histologia e morfometria da epiderme e membrana basal do felino, pois, pode-se evitar várias conseqüências deletérias ocasionadas pela perda da integridade da pele ou, da sua imaturidade na vida neonatal.

Nessa perspectiva, o presente trabalho teve por objetivo avaliar e determinar a espessura da epiderme e da membrana basal da pele de felinos de 20 e 60 dias de vida, clinicamente saudáveis, por meio da histomorfometria utilizando o software Axio Vision 3.0.

3. METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido no Hospital Veterinário e no Setor de Patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás - Goiânia, GO.

Foram selecionadas três fêmeas da espécie felina, SRD, gestantes (terço final da gestação), com idade superior a dois anos, sendo provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Goiânia – Goiás.

As gestantes foram examinadas segundo recomendações de McMcguinre & Seim (1991). Avaliou-se os parâmetros como a temperatura corpórea, as freqüências cardíaca e respiratória, estado de hidratação, linfonodos, tempo de preenchimento capilar (TPC), palpação abdominal, auscultação cárdio-pulmonar,

mucosas aparentes, pele e anexos, respiratório, cárdio-vascular, gastro-intestinal, genito-urinário, neurológico e locomotor. Foram incluídas no experimento as fêmeas que apresentaram os parâmetros citados dentro da normalidade para a espécie e foram mantidas em gaiolas individuais específicas para gatos.

Após o parto, selecionaram-se seis felinos, SRD, recém-nascidos, três machos e três fêmeas. Todos os filhotes foram submetidos ao exame físico neonatal indicado por Greco & Tartington (1997), durante os nove primeiros dias e depois, uma vez por semana, até completarem 60 dias de idade, para descartar possíveis patologias que pudessem sugerir comprometimento da pesquisa.

A acomodação dos animais foi providenciada com bastante antecedência para minimizar o estresse dos mesmos e durante os 60 dias de vida, os filhotes foram mantidos em companhia de suas respectivas mães em gaiolas do gatil experimental medindo 1m X 2m, sendo o gatil parcialmente coberto, e os animais submetidos às condições climáticas regionais. As gaiolas possuíam em seu interior caixas de papelão forradas com jornais e vasilhas de areia higiênica, e permitiam os animais a movimentarem-se e eliminarem as excretas.

As mães felinas foram alimentadas com ração seca* e água à vontade e a partir dos 20 dias de idade, os filhotes receberam além da alimentação materna, ração seca* para filhotes e água à vontade. Aos 30 dias de idade todos os filhotes e as mães receberam um anti-helmíntico (febendazole mais praziquantel dose de 100 mg/kg e 5 mg/kg, dose única). Após 12 dias desta desverminação, os animais receberam novamente outra dose do mesmo medicamento. E o desmame dos filhotes, iniciou-se aproximadamente aos 50 dias de idade.

Foram colhidas amostras de pele da região dorso-caudal à escápula do lado direito, dos felinos com 20 e aos 60 dias de vida. Realizou-se a contenção dos animais adequadamente. Em seguida, realizou-se a medicação pré-anestésica (Acepromazina 0,1mg/Kg) e, logo, a anestesia endovenosa (Propofol 3,0 mg/kg), até os filhotes entrarem em plano superficial de anestesia. Posteriormente, na região dorso-caudal à escápula foi feita a tricotomia, sem realizar a assepsia do local para

* Finotrato Cat Rações VB – Indústria e Comércio Ltda. Rodov. BR-364, Km 270, Jaciara - MT

evitar irritação da pele, o que poderia comprometer a integridade do material em estudo. Utilizou-se um *punch* (saca-bocado) de 8mm de diâmetro com movimentos rotativos para a obtenção das biópsias de pele segundo à técnica descrita por Peleteiro & Correia (1996), mas utilizando o anestésico endovenoso, em substituição ao anestésico local recomendado pelos autores. No local das biópsias foram feitas pequenas suturas em U deitado para aproximar as extremidades da pele, utilizando fio de nylon 3-0, e os pontos retirados sete dias após a biópsia.

Os filhotes foram identificados com esparadrapos contendo numerações (F1, F2, e F3, para as fêmeas) e (M1, M2 e M3, para os machos), fixando-os no membro posterior dos animais. Posteriormente, as amostras de pele foram identificadas (F1-20, F2-20, F3-20, M1-20, M2-20, M3-20, F1-60, F2-60, F3-60, M1-60, M2-60, M3-60), fixadas e armazenadas em frascos contendo formol tamponado a 10%, que após o fechamento, foram deixadas à temperatura ambiente durante 24 horas. As amostras, então, foram recortadas e deixadas no formol por mais 24 horas (BANKS, 1992), posteriormente transferidas para pequenas caixas plásticas individuais (unicassetes), lavadas com água de torneira durante uma hora, colocadas em álcool a 70% e permaneceram neste conservante até o final do período de colheita.

Processaram-se os fragmentos de pele, obtidos por biópsia, de acordo com o método convencional de histopatologia descrito por Luna (1968). Estes materiais foram desidratados, diafanizados e emblocados com parafina histológica, e laminados para a posterior coloração.

Para evidenciação da epiderme e da membrana basal foram utilizadas as técnicas de coloração pelo Tricômico de Masson e Acido Periódico Schiff (PAS).

Utilizou-se o software Axio Vision 3.0, procedendo a histometria em micra, da espessura da epiderme e da membrana basal da epiderme. As imagens das lâminas foram digitalizadas do microscópio óptico para o computador por meio de câmera digital.

Nas amostras coradas pelo Tricômico de Masson foram feitas três medidas em micra (µm) da epiderme de cada amostra, sempre iniciando do lado esquerdo para o lado direito do campo visualizado, em campo único de 400x, fator de correção 0,8. As amostras coradas pelo Ácido Periódico Schiff (PAS) foram realizadas três

medidas em micra (µm), da membrana basal da epiderme, iniciando do lado esquerdo para o lado direito, em campo único de 400x.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As colorações especiais das amostras foram de acordo com cada estrutura. Para trabalhar com a coloração Tricômico de Masson foi necessário um acerto prévio do potencial hidrostático da água (pH) entre 6,5 e 7,0 e evitou-se a utilização do fixador Bouin e de estufa, pois, facilitam o desprendimento do fragmento de pele durante a coloração da lâmina.

Fez-se a opção da histometria para enriquecer o trabalho e precisão dos resultados. Não foram encontrados, na literatura consultada, trabalhos com o software “Axio Vision 3.0”, e também sobre histologia da pele de neonatos felinos machos e fêmeas.

Na avaliação histológica, observou-se que as camadas da pele dos felinos avaliados apresentaram-se estruturalmente semelhantes (epiderme, derme superficial e profunda, camada muscular e estruturas anexas da pele), e com uma diferenciação evidente dos extratos cutâneos da epiderme (camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e córnea), tais achados encontram-se compatíveis com àqueles encontrados na literatura para outras áreas do corpo como da pele da região anogenital em neonatos (DIAS *et al.*, 2008).

A camada córnea da epiderme mostrou-se delgada e queratinizada, e observou-se que partes dessa camada foram perdidas durante o processamento, o que conforme Scott *et al.* (1996) torna-se um acontecimento normal. A camada granulosa mostrou-se monocelular e grânulos de querato-hialina estavam presentes no citoplasma dessas células. A camada germinativa monocelular estava apoiada na membrana basal exibindo algumas células em atividade mitótica. Estes resultados são análogos às observações de Muller *et al.* (1985), Banks (1992), Scott *et al.* (1996) e Gartner & Hiatt (1999). Conceição (2003) observou as mesmas estruturas na epiderme de cães neonatos e pediátricos, pela microscopia óptica.

A espessura da epiderme (camada germinativa, espinhosa e granulosa) da região dorso-caudal dos felinos de 20 e 60 dias de idade, variou de 10,58 a 15,96

µm nos filhotes fêmeas, e de 8,58 a 14,22 µm nos filhotes machos. Segundo Scott (1980) a epiderme do felino é mais delgada do que a do cão.

A membrana basal que separa a epiderme da derme corou-se adequadamente pelo PAS, sugerindo a presença de polissacarídeos neutros, conforme afirmaram Ham (1967) e Muller *et al.* (1985). Esta membrana basal fixa a epiderme à derme, corroborando as afirmativas de Banks (1992), Junqueira & Carneiro (1999) e Gartner & Hiatt (1999). A espessura da membrana basal da região dorso-caudal à escápula, dos felinos de 20 e 60 dias de idade, variou de 0,68 a 0,79 µm nas fêmeas e de 0,56 a 0,90 µm nos machos. Na literatura consultada não foi encontrada nenhuma referência da espessura da membrana basal da epiderme de felinos.

Os valores da espessura da epiderme (camada granulosa, espinhosa e germinativa), e da membrana basal da epiderme, do dorso-caudal à escápula do lado direito dos machos (M) e fêmeas (F) de 20 e 60 dias de idade, observados na histometria, estão descritos na tabela 1 e 2.

Tabela 1. Morfometria dos valores em micra da espessura da epiderme e membrana basal dos felinos machos e fêmeas de 20 dias de idade, clinicamente saudáveis, campo único de 400x, fator de correção 8,0x (epiderme).

	EPIDERME		**MEMBRANA BASAL**	
	Média	**Desvio Padrão (SM)**	**Média**	**Desvio Padrão (SM)**
F1-20	10,576	1,149776	0,68	0,12741
F2-20	11,06667	0,749158	0,786667	0,095394
F3-20	10,59733	1,265956	0,776667	0,05
M1-20	8,581333	0,642462	0,793333	0,12741
M2-20	8,954667	0,451297	0,793333	0,040415
M3-20	9,141333	1,620989	0,56	0,057735

Tabela 2. Morfometria dos valores em micra da espessura da epiderme e membrana basal dos felinos machos e fêmeas de 60 dias de idade, clinicamente saudáveis, campo único de 400x, fator de correção 8,0x (epiderme).

	EPIDERME		MEMBRANA BASAL	
	Média	**Desvio Padrão (SM)**	**Média**	**Desvio Padrão (SM)**
F1-60	15,96533	1,570393	0,766667	0,12741
F2-60	11,22667	3,576227	0,94	0,095394
F3-60	12,6	1,345594	0,88	0,05
M1-60	14,224	3,090983	0,766667	0,12741
M2-60	9,314667	0,740911	0,886667	0,040415
M3-60	10,152	1,221488	0,896667	0,057735

As médias mostradas na tabela 1 e 2 foram utilizadas para elaboração dos gráficos de número 1 e 2.

Gráfico 1. Morfometria dos valores em micra da espessura da epiderme dos felinos machos e fêmeas de 20 e aos 60 dias de idade.

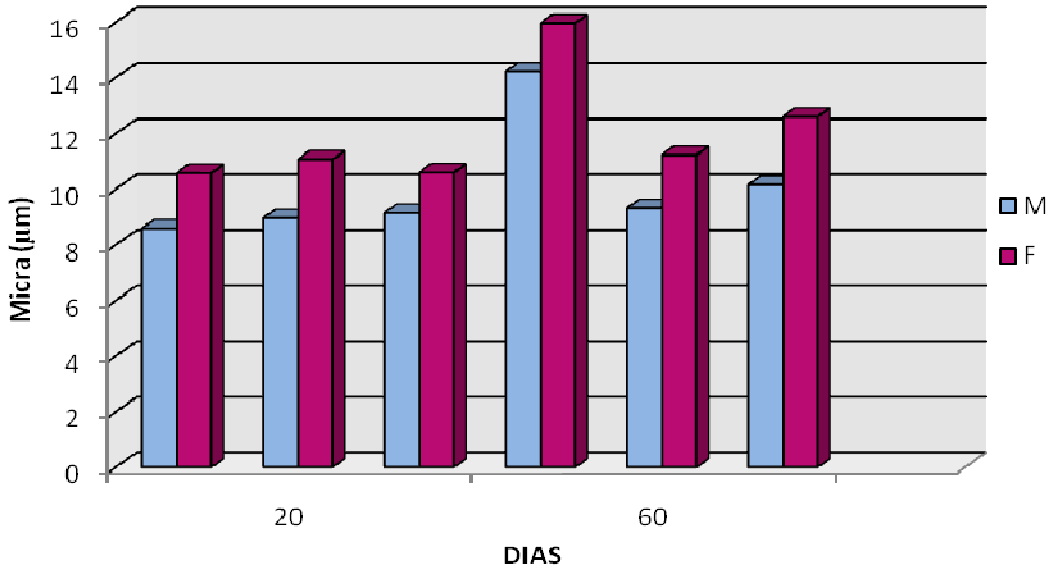
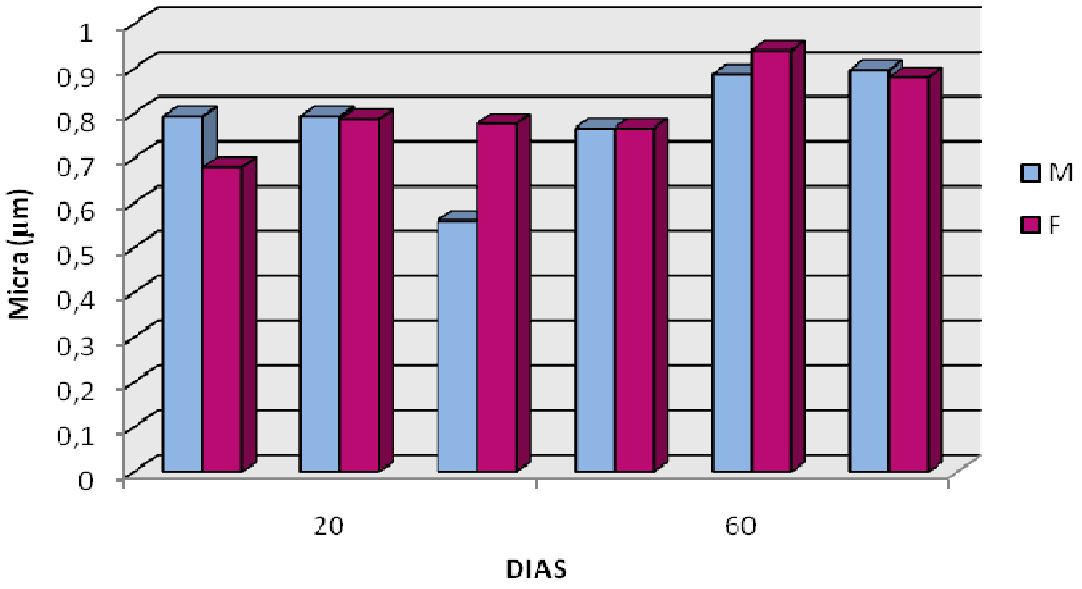


Gráfico 2. Morfometria dos valores em micra da espessura da membrana basal dos felinos machos e fêmeas de 20 e aos 60 dias de idade.



4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, associados às informações sobre a pele, conclui-se que a epiderme viva e a membrana basal dos felinos filhotes de 20 e 60 dias machos e fêmeas, espessam-se com o amadurecimento dos animais e apresentam variações semelhantes durante o período analisado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada.** 3.ed. São Paulo: Manole, 1992. 629p.

CONCEIÇÃO, M. **Aspectos histológicos e morfométricos da pele de cães do nascimento aos 70 dias, clinicamente saudáveis**. 2003. 78p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu.

DIAS, C. G. A.; SILVA, L. D. M.; VIANA, D. A.; SILVA, T. F. P.; MATTOS, M. R. F. **Aspectos histológicos da pele da região ano-genital de gatos domésticos à luz do comportamento de lambedura ano-genital do neonato exibido pela mãe.** Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado (RS). 2008.

FRASER, C. M. **El manual Merck de veterinária**. 3.ed. Madrid: Gráficas Guada, 1988. 1918p.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 426p.

GRECO, D. S.; TARTINGTON, B. P. **Exame físico e técnicas de obtenção de imagens diagnósticas.** In: HOSKINS, J. D. Pediatria veterinária: cães e gatos do nascimento aos seis meses. 2.ed. Rio de Janeiro: Interlivros Edições LTDA, p.01-21,1997.

HAM, A. W. **Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1967. 965 p.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.

KRISTENSEN, S. **A study of skin diseases in dogs and cats.** Nord. Vet. Med., v.27, p.593-603, 1975.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.

McMCGUINRE, B. H.; SEIM, B. H. **Small animal bhysy physical diagnosis and clinical procedure**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1991. 222p.

MULLER, G. H.; KIRK, R. W.; SCOTT, D. W. **Dermatologia dos pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1985. 935p.

PELETEIRO, M. C.; CORREIA, J. J. **Técnicas de biópsia de pele por excisão com bisturí ou com "Punch"**. Vet. Téc., Lisboa, v.6, n. 1, p.24-7, 1996.

SCOTT, D. W.; MILLER, J. R.; GRIFFIN, C. E. **Muller & Kirk Dermatologia de Pequenos Animais.** 5.ed. Rio de Janeiro: Interlivros Edições LTDA. 1996. 1130p.

SCOTT, D. W. **Feline dermatology 1900-1978: A monograph.** J. Am. Anim. Hosp. Assoc., v.16, p.331, 1980.

YAGER, J. A.; SCOTT, D. W. **The skin and appendages.** In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N., Pathology of Domestic Animals. 4ed. Academic Press, San Diego. 1993. 780p.

FONTE DE FINANCIAMENTO – Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e CNPq.

---

1. Bolsista de Iniciação Científica do CNPq. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. paty.bueno@hotmail.com
2. Bolsista de Iniciação Científica do CNPq. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.
3. Professora Doutora. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.
4. Aluna de Graduação. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.
5. Doutora, Orientadora. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

INTERAÇÕES INTER-MOLECULARES DA ENOLASE DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Hérika Isabella da Costa[a], Célia Maria de Alemida Soares[a],*
[a]*Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970, Brasil*
E-mail: herika_isabella@yahoo.com.br

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, interação patógeno-hospedeiro, enolase

1 INTRODUÇÃO

1.1 Paracoccidioidomicose

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (ALMEIDA, 1930), endêmica na América Latina, com alta incidência no Brasil (COUTINHO *et al.*, 2002). Apesar de estender-se do México à Argentina, não há homogeneidade na distribuição dos casos. No Brasil são encontrados 80% dos casos relatados; os outros dois países com maiores índices de casos são Colômbia e Venezuela. (BRUMMER, 1993; HAHN, 2002; UNTERKIRCHER, 2004).

Estima-se que mais de 10 milhões de indivíduos estejam infectados, com cerca de 2% desenvolvendo a doença (RESTREPO, MCEWEN & CASTAÑEDA, 2001). Nas áreas onde a PCM é altamente endêmica, a incidência da doença é estimada em aproximadamente 1 a 3 casos clínicos para cada 100.000 habitantes por ano (RESTREPO, 1985).

A PCM é uma doença granulomatosa, caracterizada histologicamente pela formação de tubérculos epiteliais com áreas centrais de necrose, agregados de leucócitos polimorfonucleares, um halo linfomononuclear e fibrose (BRITO & FRANCO, 1994). O progresso da patologia e a diversidade das formas clínicas dependem dos fatores imunológicos do hospedeiro (FRANCO, 1987) e dos diferentes níveis de virulência dos diversos tipos de isolados do fungo (SAN-BLAS & NIÑO-VEGA, 2001).

A PCM causa a morte, principalmente, em homens adultos, trabalhadores de área rural, em idade produtiva, de camada social de baixa renda, e em pacientes com deficiência imunológica. Antes da puberdade, a

infecção ocorre com a mesma freqüência nos sexos masculino e feminino. Após este período, a freqüência da PCM passa a ser maior nos indivíduos do sexo masculino (MARTINEZ, 1997). Este fato tem sido explicado pela ação protetora dos hormônios estrógenos na mulher adulta (CLEMONS *et al*., 1990) e pelo menor contato das mesmas com as fontes de infecção. O trabalho com o solo é fator ocupacional importante para predisposição à PCM (MARQUES *et al*., 1983).

A via inalatória é a principal porta de entrada deste fungo no hospedeiro humano (PEDROSA, 1976). Ao serem inalados, os propágulos inicialmente atingem os pulmões e posteriormente se disseminam, tanto pela circulação sangüínea, quanto pelo sistema linfático para outros órgãos e sistemas (FRANCO, 1987, SAN BLASS *et al*. 2002). A pele e mucosa são também vias de inoculação do microrganismo através de implantação traumática (CASTRO *et al*., 1975); e a transmissão inter-humana parece não ocorrer (BARBOSA & DAHER, 1991).

O micélio inalado é convertido para a forma de levedura, a qual é fagocitada por macrófagos, onde se multiplica por brotamentos múltiplos, formando o foco inflamatório (BRUMMER *et al*., 1989). A resposta imune celular é o principal mecanismo de proteção contra a infecção (CALICH *et al*., 1998).

Antes do advento da terapia antimicrobiana, a PCM era uma doença fatal. Atualmente existem fármacos utilizados no seu tratamento e de outras micoses sistêmicas (DIETZE *et al*., 1999). O tratamento é prolongado com duração de um a dois anos. Os antifúngicos atualmente disponíveis pertencem às classes das sulfonamidas, azóis (cetoconazol, itraconazol, fluconazol), polienos (anfotericina B), flucitosina e equinocandinas. Entretanto, apesar da disponibilidade desses agentes antifúngicos relatados acima, algumas dificuldades ainda são encontradas na terapêutica das micoses sistêmicas, inclusive na PCM. Os principais problemas consistem no surgimento de isolados resistentes e a intolerância dos pacientes às doses terapêuticas ministradas (GEORGOPAPADAKOU & WALSH, 1996; KONTOYIANNIS & LEWIS, 2002). Diante desse quadro, torna-se necessário o desenvolvimento de antifúngicos mais efetivos e específicos (WILLS *et al*., 2000).

1.2 Matriz extracelular e adesinas

A aderência de patógenos às células do hospedeiro é considerada um passo essencial no estabelecimento da infecção (MARCHAIS *et al*, 2005). Vários fungos de importância clínica como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum, Cryptococcus neoformans, Pneumocystis carinii, Sporothrix schenckii* e *Penicillium marneffei* são conhecidos por se ligarem às proteínas da matriz extracelular (MEC) (GONZALEZ *et al*, 2004). Uma colonização bem-sucedida geralmente é um evento complexo e deve envolver proteínas na superfície do fungo, componentes de matriz extracelular e receptores celulares do hospedeiro (SOHN *et al,* 2006). As adesinas presentes no fungo, que interagem com receptores do hospedeiro, são de grande importância na modulação da migração, invasão, diferenciação e proliferação microbiana. Proteínas do hospedeiro como laminina, colágeno, fibronectina e fibrinogênio, têm sido propostas como ligantes celulares para os patógenos (PATTI *et al,* 1994). Desse modo, foi sugerido que a adesão às células do hospedeiro e superfícies mucosas é um passo crucial no estabelecimento da infecção (HANNA *et al*, 2000).

A MEC serve como substrato não somente para a adesão das células ao organismo, mas também para a adesão de microrganismos colonizadores. Muitos organismos expressam proteínas na superfície celular que podem mediar a sua adesão à MEC dos tecidos do hospedeiro (PATTI *et al*, 1994). As interações com o hospedeiro são mediadas por moléculas complementares em ambas, as superfícies do fungo e das células hospedeiras e tecidos. As moléculas fúngicas que atuam nessas interações foram designadas adesinas e o grande repertório de adesinas exibidas pelos fungos são um reflexo da variedade de sítios que eles podem invadir no hospedeiro (HOSTETTER, 1994; LÓPEZ-RIBOT *et al*, 1996). A expressão diferencial dos vários genes que codificam para adesinas capacita os fungos a rapidamente adaptarem suas propriedades adesivas a um ambiente em particular (VERSTREPEN and KLIS, 2006).

González *et al* (2005), demonstraram que *P.brasiliensis* possui na sua superfície duas proteínas, uma de 19 kDa e outra de 32 kDa, que interagem com a laminina, fibronectina e fibrinogênio. Outra proteína, a gp43, que é um componente antigênico do fungo usado em vários testes sorológicos, já havia

sido identificada como um receptor de laminina (VICENTINI *et al*, 1994). Este grupo mostrou por análises de Western blot com extrato livre de células de *P.brasiliensis* que a laminina se liga especificamente a gp43.

Em *P.brasiliensis* outras adesinas já foram identificadas. Andreotti *et al* (2005), isolaram e caracterizaram uma proteína de 30 kDa que se ligou à laminina mas não à outros componentes da MEC. Proteínas que se ligam à laminina podem contribuir para a infecção por mediarem a adesão e manutenção do fungo nos tecidos. A proteína gliceraldeído 3-fosfato dehidrogenase (GAPDH), que está associada à parede celular, parece mediar o processo de adesão e internalização de *P.brasiliensis* em células cultivadas *in vitro*, sendo, desse modo, importante no estabelecimento da doença (BARBOSA *et al*, 2006).

1.3 Enolase

A enzima enolase (2-fosfo-D-glicerato hidroliase, EC 4.2.1.11) é uma metaloenzima que catalisa a desidratação de 2-fosfo-D-glicerato (PGA) a fosfoenolpiruvato (PEP) na segunda metade da via glicolítica. Na reação reversa, via anabólica, que ocorre durante a gliconeogênese, a mesma enzima catalisa a hidratação de PEP a PGA. A enolase é uma das enzimas citoplasmáticas mais abundantemente expressas em muitos organismos (PANCHOLI, 2001).

Em células de mamíferos, já foram identificadas três isoformas de enolase, α-(ENO1), β-(ENO3) e γ-(ENO2). ENO1 é vastamente distribuída em uma variedade de tecidos, enquanto ENO2 e ENO3 são encontradas exclusivamente nos tecido neuroendócrino e músculo, respectivamente (CHANG *et al*, 2006). Além de sua função glicolítica, ENO1 já foi encontrada na superfície de monócitos e neutrófilos atuando como um receptor de plasminogênio, implicando num possível papel na invasão tecidual (REDLITZ *et al*, 1995). A enolase já foi observada em várias doenças uma vez que anticorpos anti-enolase têm sido encontrados em condições autoimunes, incluindo a doença inflamatória de Bowel e o lúpus eritematoso discóide (YOUSEFI *et al*, 2000).

Análises subtrativas de cDNAs de *P.brasiliensis* foram realizadas, através da técnica de RDA (Análise Diferencial Representacional), durante a

incubação de células leveduriformes com componentes da matriz extracelular, tais como laminina, fibronectina e colágeno. A partir dessas análises foi possível identificar-se uma proteína, altamente expressa, em todas as condições analisadas, a qual foi identificada como um homólogo de enolase em *P. brasiliensis*. Tais resultados indicam o papel desta proteína na adesão e conseqüentemente na virulência do patógeno *P. brasiliensis* (NOGUEIRA *et al*, 2008 - em andamento). Assim sendo, serão feitas análises das interações da enolase com outras proteínas através de uma biblioteca de duplo híbrido.

O sistema de duplo híbrido em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) é uma metodologia que foi desenvolvida para identificar genes que codificam proteínas (presas) que interagem com uma proteína alvo (isca) *in vivo* (FIELDS E SONG, 1989; CHIEN *et al.*, 1991; FIELDS E STERNGLANZ, 1994). A base para o sistema está na estrutura de um fator de transcrição que tem dois domínios fisicamente separados: o domínio de ligação ao DNA (BD) e o domínio de ativação da transcrição (AD).

Os genes codificantes para estes domínios estão presentes em plasmídeos diferentes onde são clonados genes de uma biblioteca de cDNA (presa) e o gene para o qual se deseja rastrear a interação (isca). Caso as proteínas façam interação *in vivo* o fator de transcrição atua sobre o promotor que se situa no início de um gene repórter, o qual determina o crescimento das leveduras em meio seletivo, onde crescem apenas as leveduras que apresentam proteínas que interagem.

2 OBJETIVOS

Em função do exposto e do potencial papel da proteína na interação patógeno-hospedeiro, serão realizadas análises de interação da enolase com outras moléculas de *P. brasiliensis* através do sistema de duplo-híbrido em *Saccharomyces cerevisiae.*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Construção de Oligonucleotídeos

Com base na sequência do cDNA codificante para enolase é realizada a construção de oligonucleotídeos com sítios de enzimas de restrição compatíveis para clonagem no vetor pGBKT7.

3.2 Clonagem de cDNA codificante para enolase em vetor pGBKT7

A amplificação do cDNA codificante para enolase é feita por meio da técnica de PCR. A amplificação é realizada utilizando os oligonucletídeos enolase-sense (5'-CCC GGG AAT GGC TAT CAC CAA AAT CCA CG -3') e enolase-antisense (5'- CTG CAG TTA CAT ATT AAT AGC TGC CCG G -3'), nas condições: 2 min de desnaturação a 94°C; 40 ciclos de 15 s a 94°C , 20 s a 55°C e 1 min e 30 s a 72°C; extensão final de 5 min a 72°C. Os oligonucletídeos enolase-sense e enolase-antisense utilizam como molde o cDNA obtido da fase leveduriforme de *P. brasiliensis*. O marcador para análise em gel de agarose a 0,8% é o Plus DNA Lader (Invitrogen^{TM}) de 1KB.

O produto de PCR obtido é subclonado, de acordo com as instruções do fabricante, em vetor TOPO-TA para posterior digestão com as enzimas *Pst* I e *Sma* I. A subclonagem é confirmada via PCR com os oligosnucletídeos enolase-sense e enolase-antisense. O plasmídeo contendo o cDNA codificante para enolase e o vetor pGBKT7 são digeridos com as enzimas *Pst* I e *Sma* I para obtenção de produtos com extremidades coesivas e posterior clonagem direcionada.

4 RESULTADOS

4.1 Construção de oligonucleotídios

A partir da seqüência de cDNA codificante para enolase foi realizada a construção de oligonucleotídeos com sítios de enzimas de restrição compatíveis para clonagem no vetor pGBKT7 (Tabela 1).

Tabela 1: Construção de oligonucleotídios

Oligonucleotídeo	Sequência	Tm
Enolase-sense	5'-CCC GGG AAT GGC TAT CAC CAA AAT CCA CG-3'	64° C

Enolase-antisense	5'-CTG CAG TTA CAT ATT AAT AGC TGC CCG G-3'	59° C

4.2 Subclonagem em vetor TOPO-TA (Invitrogen)

Os oligonucleotídeos foram utilizados para amplificação por PCR do cDNA codificante para enolase com sítios de enzimas de restrição compatíveis para clonagem no vetor pGBKT7 (Figura 1).

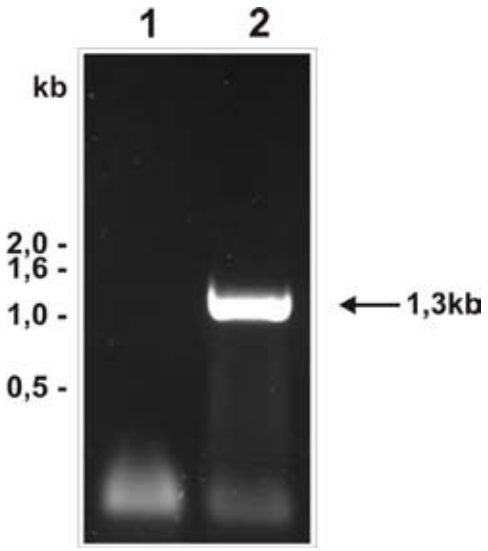


Figura 1 – Amplificação do cDNA codificante para enolase por meio da técnica de PCR. A amplificação foi realizada utilizando os oligonucletídeos enolase-sense e enolase-antisense, nas condições: 2 min de desnaturação a 94°C; 40 ciclos de 15 s a 94°C , 20s a 55°C e 1min e 30 s a 72°C; extensão final de 5min a 72°C. Linha 1: controle negativo. Linha 2: PCR com oligonucletídeos enolase-sense e enolase-antisense utilizando como molde o cDNA obtido da fase leveduriforme de *P. brasiliensis*. Os números a esquerda são referentes ao marcador 1KB Plus DNA Lader (Invitorgen^{TM}).

O produto de PCR obtido foi subclonado em vetor TOPO-TA para digestão com as enzimas *Pst I* e *Sma I*. A subclonagem foi confirmada via PCR com os oligosnucletídeos enolase-sense e enolase-antisense (Figura 2).

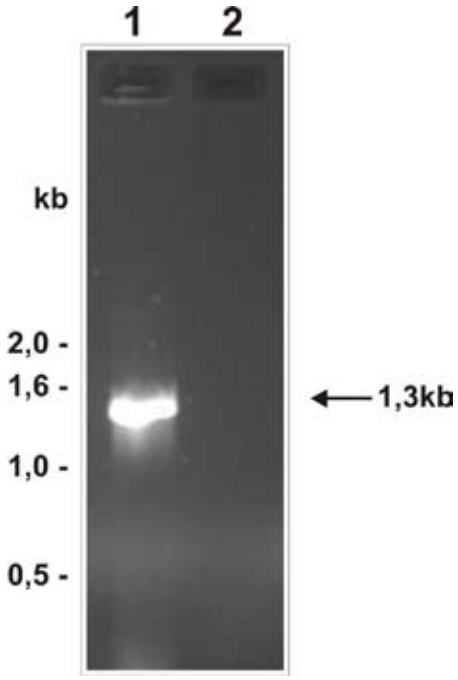


Figura 2 – Subclonagem confirmada via PCR com oligonucleotídieos enolase-sense e enolase anti-sense. Linha 1: PCR com oligonucletídeos enolase-sense e enolase-asense. Linha 2: controle negativo. Os números a esquerda são referentes ao marcador 1KB Plus DNA Lader (Invitorgen^{TM}).

4.3 Digestão com enzimas *Sma* I e *Pst* I

O plasmídeo contendo o cDNA codificante para enolase (figura 3)e o vetor pGBKT7 foram digeridos com as enzimas *Pst* I e *Sma* I para obtenção de produtos com extremidades coesivas e posterior clonagem direcionada. A digestão ocorreu a 37°C durante 3 horas.

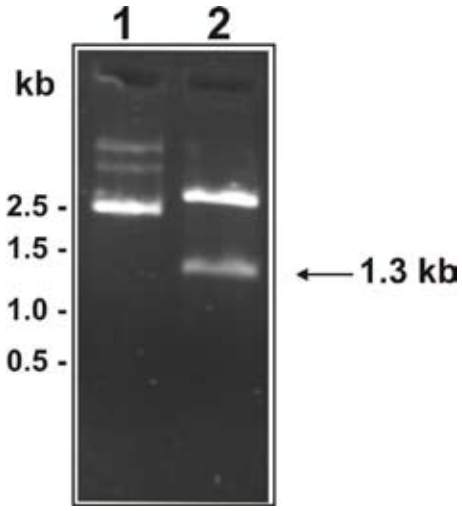


Figura 3 – Digestão do plasmídio recombinante contentdo o cDNA codificante para enolase. Foram utilizadas as enzimas *Pst* I e *Sma* I para obtenção de extremidades coesivas. Linha 1: vetor recombinante não digerido. Linha 2: plasmídio recombinante digerido com enzimas de restrição. A banda de 1,3 Kb representa o cDNA de interesse, codificante para enolase. Os números à esquerda correspondem ao marcador de massa molecular Bench Top 1Kb DNA Ladder (Promega).

5 DISCUSSÃO

A complexidade de interações entre *P. brasiliensis* e o hospedeiro humano sugere que o fungo apresenta mecanismos que o possibilitam adaptar-se à diversidade de sítios no hospedeiro. Muitos genes têm sido descritos como necessários para o microrganismo sobreviver no hospedeiro. Entre eles incluem-se genes codificantes para proteínas essenciais para a vida celular, além daqueles codificantes para proteínas necessárias à interação com o hospedeiro, conferindo um fenótipo patogênico, por permitir ao organismo aderir a tecidos, invadir novos compartimentos, sintetizar moléculas de defesa, transportar nutrientes essenciais, evadir da resposta imune, bem como outras interações hospedeiro-especificas.

Em fungos, bem como em outros organismos procariotos e eucariotos, proteínas secretadas possuem peptídeos sinais típicos na extremidade N-terminal que as dirigem para fora da célula. Entretanto, estudos já mostraram que um número significativo de proteínas, como enzimas glicolíticas e proteínas sem um peptídeo sinal N-terminal, alcançam a superfície da célula

fúngica (LÓPES-VILLAR *et al*, 2006; MARTÍNEZ *et al*, 1998). Apesar da ausência de uma seqüência sinal requerida para secreção e motivos de ancoramento à membrana, experimentos de microscopia imunoeletrônica indicaram a presença da enolase na superfície de pneumococos encapsulados e não encapsulados (BERGMANN *et al*, 2003) e na superfície de outros microrganismos como *Neisseria meningitidis* (KNAUST *et al*, 2007), *Staphylococcus aureus* (CARNEIRO *et al*, 2004), *Streptococcus pyogenes* (SEVERIN *et al*, 2006) e *Echinostoma caproni* (MARCILLA et al, 2007), localização em que a enolase poderia interagir com o hospedeiro através de sua habilidade de se ligar a componentes da MEC, como fibrinogênio e plasminogênio.

Moléculas de superfície de *P. brasiliensis* que se ligam a receptores celulares do hospedeiro durante a adesão e invasão podem ser interessantes alvos para o desenvolvimentos de vacinas e terapias anti-fúngicas. A enolase foi identificada como uma adesina de *P. brasiliensis* e a análise das interações desta enzima com outras proteínas constitui como uma importante estratégia no estudo do papel biológico desta proteína na patogênese do P. brasiliensis.

6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidioico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. **Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 5, p. 125-141, 1930.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol**., v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANDREOTTI P.F., DA SILVA J.L.M., BAILÃO A.M., SOARES C.M.A., BERNARD G., SOARES C.P., MENDES-GIANNINI. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis.* **Microbes Infect.** v. 7, p. 875-81, 2005.

BARBOSA M.S., BÁO S.N., ANDREOTTI P.F., DE FARIA F.P., FELIPE M.S.S., FEITOSA L.S., MENDES-GIANNINI M.J.S., SOARES C.M.A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infec Immun**. v. 74, p. 382-9, 2006.

BARBOSA, W.; DAHER, R.R. Blastomicose Sul-Americana (Paracoccidioidomicose). In: Veronesi, R.; Focaccia, R.; Dietze, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1991.

BERGMANN S., ROHDE M., CHHATWAL G.S., HAMMERSCHMIDT S. Characterization of plasmin(ogen) binding to *Streptococcus pneumonia.* **Indian J Med Res**. v. 119, p. 29-32, 2003.

BORGES C.L., **Genes diferencialmente expressos em *Paracoccidioides brasiliensis.*** 2008. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

BRITO, T.; FRANCO, M.F. Viewpoint. Granulomatous inflammation. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 36**,** p. 185-192, 1994.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.

BRUMMER, E.; HANSON, L.H.; RESTTREPO, A.; STEVENS, D.A. Intracelular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication of by activated macrophages. **Infect. Immun**, v. 57, p. 2289-2294, 1989.

CALICH, V.L.; VAZ, C.A.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection*.* **Res. Immunol.**, v. 149, p. 407-417, 1998.

CARNEIRO C.R.W, POSTOL E., NOMIZO R., REIS L.F.L., BRENTANI R.R. Identification of enolase as a laminin-binding protein surface of *Staphylococcus aureus*. **Microbes Infect.** v. 6, p. 604-8, 2004.

CASTRO, R.M.; CUCÉ, L.E.; FAVA-NETO, C. Paracoccidioidomicose. Inoculação experimental in "anima nobile". Relato de um caso. **Med. Cutan. Ibero Lat. Amer,** v. 3, p. 289-292,1975.

CHANG G.C., LIU K.J., HSIEH C.L., HU T.S., CHAROENFUPRASERT S., LIU H.K., LUH K.T., WENWU C., TING C.C., CHEN C.Y., CHEN K.C., YANG T.Y., CHOU T.Y., HUAWANG W., WHANG-PENG J., SHIH N.Y. Identification of α-enolase as an autoantigen in lung cancer: its overexpression is associated with clinical outcomes. **Clin Cancer Res.** v. 12, p. 5746-54, 2006.

CHIEN C.T., BARTEL P.L., STERNGLANZ R., FIELDS S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 88, n. 21, p. 9578–9582, 1991.

CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. Interactions of mammalian steroid hormones with *Paracoccidioides brasiliensis*: estradiol receptor binding and mediation of cellular functions. **Interciencia**, v. 15, p. 206-208, 1990.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441-1454, 2002.

DIETZE, R.; FOWLER, V.G.Jr.; STEINER, T.S.; PECANHA, P.M. and COREY, G.R. Failure of amphotericin B colloidal dispersion in the treatment of paracoccidioidomycosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, p. 837-839, 1999.

FIELDS S., SONG O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature.** v. 340, n. 6230, p. 245–246, 1989.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 5-18, 1987.

GEORGOPAPADAKOU, N.H. and WALSH, T.J.. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.40, p. 279-291, 1996.

GONZÁLEZ A., GÓMEZ B.L., DIEZ S., HERNÁNDEZ O., RESTREPO A., HAMILTON A.J., CANO L.E. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. **Infect Immun.** v. 73, p. 2486-95, 2005.

GONZALEZ, A.; GÓMEZ, B. L.; DIEZ, S.; HERNÁNDEZ, O.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A. J.; CANO, L. E.. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. **Infect. Immun**. v.73, p.2486-2495, 2004.

HANH, R. C.; MACEDO, A. M.; SANTOS, N. L.; RESENDE, J.C.P.; HAMDAN, J. S. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* atypical isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **Ver. Iberoam. Micol.**, v. 19, p. 49-51, 2002.

HANNA S.A., DA SILVA J.L.M., MENDES-GIANNINI M.J.S. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microbes Infect.** v. 2, p.877-884, 2000.

HOSTETTER M.K. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida albicans* spp. with epithelial and endothelial surfaces. **Clin Microbiol Rev.** v. 7, p. 29-42. 1994.

KNAUST A., WEBER M.V.R, HAMMERSCHMIDT S., BERGMANN S., FROSCH M., KURZAI O. Cytosolic proteins contribute to surface plasminogen recruitment of *Neisseria meningitides.* **J Bacteriol.** v.189, p. 3246-3255, 2007.

KONTOYIANNIS, D.P. and LEWIS, R.E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **Lancet.,** v.359, p. 1135-1144, 2002.

LÓPES-VILLAR E., MONTEOLIVA L., LARSEN M.R., SACHON E., SHABAZ M., PARDO M., PLA J., GIL C., ROEPSTORFF P., NOMBELA C. Genetic and proteomic evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface. **Proteomics**. v. 6, p. 107-18, 2006.

LÓPEZ-RIBOT J.L., MONTEAGUDO C., SEPÚLVDA P., CASANOVA M., MARTÍNEZ J.P., CHAFFIN W.L. Expression of fibrinogen binding mannoprotein and the laminin receptor of *Candida albicans in vitro* and in infected tissues. **FEMS Microbiol Lett**. v. 142, p. 117-22, 1996.

MARCHAIS, V.; KEMPF, M.; LICZNAR, P.; LEFRANÇOIS, C.; BOUCHARA, J. P., ROBERT, R.; COTTIN, J.; DNA array analysis of *Candida albicans* gene expression in response to adherence to polystyrene. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.245, p. 25-32, 2005.

MARCILLA A., PÉREZ-GARCÍA A.P., ESPERT A., BERNAL D., MUNÕZ-ANTOLÍ C., ESTEBAN J.G., TOLEDO R. *Echinostoma caproni*: Identification of enolase in excretory/secretoty products, molecular cloning, and functional expression. **Exp Parasitol**. v. 117, p. 57-64, 2007.

MARCILLA A., PÉREZ-GARCÍA A.P., ESPERT A., BERNAL D., MUNÕZ-ANTOLÍ C., ESTEBAN J.G., TOLEDO R. *Echinostoma caproni*: Identification of enolase in excretory/secretoty products, molecular cloning, and functional expression. **Exp Parasitol**. v. 117, p. 57-64, 2007.

MARQUES, S.A.; FRANCO, M.F.; MENDES, R.P.; SILVA, N.C.A.; BACCILI, C.; CURCELLE, E.D.; FERACI, A.C.M.; OLIVEIRA, C.S.; TAGLIARINI, J.V.; DILLON, N.L. Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). **Ver. Inst. Med. Trop.**, v. 25, p. 87-92, 1983.

MARTÍNEZ J.P., GIL M.L., LÓPES-RIBOT, J., CHAFFIN W.L. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. **Clin Microbiol Rev**. v. 11, p. 121-41, 1998.

MARTINEZ, R. Blastomicose-Sul-Americana (Paracoccidioidomicose)-Etioepidemiologia e Ecologia. In: Veronesi, R.; Focaccia, R. **Tratado de Infectologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ateneu, p. 1082, 1997..

PANCHOLI V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. **Cell Mol Life Sci.** v. 58, p. 902-20, 2001.
PATTI J.M., ALLEN B.L., MCGAVIN M.J., HÖÖK M. MSCRAMM-Mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Ann Rev Microbiol**. v.48, p. 585-617, 1994.

PATTI, J. M.; ALLEN, B. L.; McGAVIN, M. J.; HOOK, M.. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annu. Rev. Microbiol**. v. 48, p.585-617, 1994.

PEDROSA, P.N. **Paracoccidioidomicose, inquérito intradérmico com paracoccidioidina em zona rural do estado do Rio de Janeiro.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1976.

REDLITZ A., FOWLER B.J., PLOW E.F., MILES L.A. The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. **Eur J Biochem**. v. 227, p. 407-15, 1995.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 323-334, 1985.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol. Rev.**, v. 39, p. 233-241, 2001.

SAN-BLAS, G., G. NIÑO-VEGA & T. ITURRIAGA. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidiodomycosis: moleculares approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol**., v.40, n. 3, p. 225-242, 2002.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: Cihlar, R. L.; Calderone, R. A. **Fungal Pathogenesis**: Principles and clinical applications. New York: Marcel Dekker, p. 205-226, 2001.

SEVERIN A., NICKBARG E., WOOTERS J., QUAZI S.A., MATSUDA Y.V., MRPHY E., MOUTSATSOS I.K., ZAGURSKY R.J., OLMSTED. Proteomic analysis and identification of *Streptococcus pyogenes* surface proteins. **J Bacteriol.** v. 189, p. 1514-22, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p. 297-310, 2006.

SOHN K., SENYÜREK I., FERTEY J., KÖNIGSDORFER A., JOFFROY C., HAUSER N., ZELT G., BRUNNER H., RUPP F. An *in vitro* assay to study the transcriptional response during adherence of *Candida albicans* to different human epithelia. **FEMS Yeast Res.** v. 6, p. 1085-93, 2006.

VERSTREPEN K.J., KLIS F.M. Flocculation, Adhesion and Biofilm Formation in Yeasts. **Mol Microbiol**. v. 60, p. 5-15, 2006.

VICENTINI A.P., GESZTESI J.L., FRANCO M.F., SOUZA W., MORAES J.Z., TRAVASSOS L.R., LOPES J.D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenisis. **Infect Immun.** v. 62, p. 1465-9, 1994.

WILLS, E.A.; REDINBO, M.R.; PERFECT, J.R. and DEL POETA, M. New potential targets for antifungal development. **Emerging Therapeutic Targets.** v. 4, p. 1-42, 2000.

YOUSEFI S., COOPER P.R., MUECK B., POTTER S.L., JARAI G.. cDNA representational difference analysis of human neutrophils stimulated by GM-CSF. **Biochem Biophys Res Commun**. v.277, p. 401-9, 2000.

Efeito do tempo de maceração sobre as características físico-químicas e sensoriais de biscoitos elaborados a partir de farinhas de mesocarpo externo de pequi

Beatriz dos Santos Siqueira[a], Manoel Soares Soares Júnior[a,*]

[a] *Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO (74001-970), Brasil*

E-mail: manoel@agro.ufg.br

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense* Camb., resíduo, processamento

1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com possíveis impactos ambientais e o elevado índice de perdas e desperdícios gerados pelas indústrias de alimentos tem levado pesquisadores a buscar alternativas viáveis de aproveitamento e geração de novos produtos para o consumo humano (PEREIRA et al., 2005).

Os resíduos provenientes da indústria de alimentos envolvem quantidades apreciáveis de cascas, caroços e outros. Esses materiais servem como fonte de proteínas, enzimas, óleos essenciais e polissacarídeos, passíveis de recuperação (COELHO et al., 2001).

O cerrado apresenta uma rica biodiversidade em alimentos de origem vegetal, principalmente frutos com elevado potencial para a alimentação humana, mas poucos estudos relacionados à ciência dos alimentos têm sido realizados. Dentre as frutíferas nativas do cerrado destaca-se o pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.), sendo o seu fruto, o pequi, conhecido como o ouro do cerrado, por seu alto valor econômico e nutricional (BARBOSA; AMANTE, 2002).

O fruto é globoso, do tipo drupa, contendo de um a quatro caroços que são as unidades de dispersão da espécie. Segundo Vera et al. (2005), o fruto é composto por 76% de casca, 21,6% de caroço, sendo que a porção comestível (polpa) representa 8,5% e a amêndoa, 2,1%. Uma fina casca de cor verde acinzentada constitui o epicarpo. Com o desenvolvimento do fruto o mesocarpo torna-se heterogêneo, apresentando duas regiões distintas denominadas de mesocarpo externo e mesocarpo interno (DOMBROSKI, 1997; GRIBEL, 1986). O mesocarpo externo é coriáceo-carnoso e o mesocarpo interno corresponde à camada carnosa de cor amarelo-clara a laranja, que envolve uma camada de

espinhos finos e rígidos originados do endocarpo. Este é rígido, lenhoso e aloja uma semente oleaginosa e de cor branca denominada de amêndoa (MARQUES, 2001).

O pequi é bastante consumido pelas populações que habitam as regiões onde são produzidos. Não obstante, ainda é explorado de forma pouco industrializada, o que dificulta sua comercialização e seu consumo por populações urbanas e em períodos de entressafra (ARAÚJO, 1995; RIBEIRO, 2000; MELO JÚNIOR et al., 2004). Desta forma o processamento agroindustrial do pequi pode ser uma opção para o desenvolvimento sustentável da região.

Nutricionalmente o pequi é um fruto altamente calórico, com teor de proteínas elevado em relação aos demais frutos encontrados no mercado, além de ser rico em vitamina A, na forma de β-caroteno, e ser altamente oleaginoso (VILAS-BOAS, 2004). Porém, mesmo diante da importância do pequi, somente o caroço do fruto é aproveitado, não sendo utilizada a casca (epicarpo e mesocarpo externo) na alimentação humana (VERA et al., 2005). A casca do fruto possui teor elevado de carboidratos totais e ainda é pouco aproveitada pelas agroindústrias que poderiam dar um fim mais nobre a este resíduo (FERREIRA; CURCIO; CALIARI, 2005).

Em muitas regiões onde o trigo cultivado não é suficiente para atender o consumo da população, a incorporação de outras farinhas ao trigo é empreendida por razões econômicas, sem que se deixe de ressaltar, porém, a importância da utilização de uma farinha que possa oferecer ao consumidor um produto de boa qualidade sensorial e nutricional. Os produtos suplementados mais freqüentemente são pães, biscoitos e bolos (CHAVAN; KADAN, 1993).

A substituição de parte da farinha de trigo por farelo de arroz, fibra de milho, resíduos da indústria de cerveja dentre outros, tem sido relatado por vários autores na elaboração de *cookies*. Estes são produtos populares, como componentes de uma refeição rápida, sendo, em geral, caracterizados pelo alto teor de açúcar e gordura e pela baixa umidade. Apresentam grande consumo, longa vida de prateleira e boa aceitação, sobretudo entre as crianças (TSEN, 1976), e têm sido formulados com a intenção de torná-los fortificados ou de torná-los fontes de fibras ou proteínas, devido ao grande apelo existente nos dias atuais para a melhoria da qualidade da dieta (JAMES; COURTNEY; LORENZ, 1989).

Soares et al. (2009) avaliaram a qualidade de biscoitos tipo *cookie*, formulados com diferentes níveis de farinha de casca de pequi (12,5%, 25%, 37,5% e 50%) em substituição à farinha de trigo. Com a elevação da substituição da

farinha de trigo por farinha de casca de pequi, os biscoitos ficaram mais escuros, com maiores teores de fibra alimentar, umidade, cinzas, magnésio, manganês e cobre e menores teores de carboidratos, proteínas, lipídios e valor energético. Em relação à aceitabilidade o biscoito com até 25% de substituição de farinha de trigo por farinha de casca de pequi teve boa aceitação, alcançando uma intenção de compra, por parte dos entrevistados, de 52% e uma economia no custo dos ingredientes de 5,2% em relação ao biscoito controle. Portanto, os autores concluíram que a substituição de até 25% da farinha de trigo por farinha de casca de pequi, em biscoito tipo cookie, é uma alternativa viável, com benefícios funcionais, econômicos e ecológicos.

De acordo com Sano e Almeida (1998), a presença de taninos na polpa de pequi corresponde a 0,17%, o que confere a esse fruto um sabor adstringente. Além da adstringência os taninos causam certo amargor nos produtos feitos com frutos que contém essa substância.

Segundo Oliveira et al. (2002), logo após a remoção da casca amarela do maracujá, a casca branca deve passar por um processo de extração de substâncias que conferem sabor amargo a casca. Assim, a casca foi submetida à maceração por 24 horas, sob refrigeração, sendo sua água trocada de 4 em 4 horas. O mesmo poderia ser feito para a retirada do amargor da casca do pequi, para elaboração da farinha de casca de pequi. Pesquisas que envolvam a viabilização da utilização da farinha de mesocarpo externo de pequi (FMEP) na alimentação humana podem garantir ao consumidor produtos seguros do ponto de vista nutricional e sensorial, além de auxiliar no planejamento de estratégias de promoção da saúde pública.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade do uso da farinha macerada de mesocarpo externo do pequi (FMEP), avaliando a qualidade sensorial e físico-química de *cookies* elaborados com 25% de substituição da farinha de trigo e fécula de mandioca por FMEP com diferentes dias de maceração.

3. METODOLOGIA

O experimento foi realizado nos laboratórios de Tecnologia de Alimentos do Setor de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás. Para o preparo dos biscoitos foram utilizadas farinhas de mesocarpo externo de pequi

(FMEP), elaboradas com mesocarpos não macerados e macerados por 1, 2 e 3 dias (tratamentos), sob refrigeração, trocando-se a água a cada 24 h. Assim, utilizou-se delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 4 tratamentos. Na formulação dos biscoitos houve 25% de substituição da mistura de farinha de trigo (FT) e fécula de mandioca (FM) por FMEP (SOARES JÚNIOR et al., 2009). Em todos os biscoitos utilizaram-se 63,8 g de FMEP (com diferentes dias de maceração), 127,5 g de FT, 63,7 g de FM, 110 g de açúcar cristal, 50 g de açúcar mascavo, 120 g de margarina, 56 g de ovo, 6 g de fermento químico em pó, 2 g de sal e 2 g de essência de baunilha. Para o preparo da massa, todos os ingredientes foram pesados e, em seguida, processados em batedeira doméstica Wallita, modelo RI 1554, moldados com auxílio de colher e assados em bandejas de alumínio untadas e enfarinhadas, utilizando forno elétrico marca Superfecta modelo SC23, durante 15 min, conforme Soares Júnior et al. (2007). Após atingirem a temperatura ambiente, os biscoitos foram embalados em sacos de polietileno de baixa densidade com 15 µm de espessura até a realização da avaliação sensorial. Foram realizadas análises da de umidade e cinzas segundo os métodos n° 925.10 e n° 923.03, respectivamente, da AOAC International (1995). Os lipídios foram avaliados por meio da extração direta em soxhlet, n° 920.39 da AOAC (1995).

Para a análise sensorial utilizou-se delineamento em blocos completos casualizados. Cada tratamento foi avaliado por setenta provadores não treinados, de forma monádica sequencial aleatorizada (degustação de um tratamento a cada sessão, ou seja, um por dia). Os provadores foram selecionados em função de consumirem biscoitos tipo *cookie*, disponibilidade e interesse em participar do teste.

O método utilizado foi o teste de aceitabilidade, no qual avaliaram-se a aparência, a textura e o sabor, por meio de escala hedônica estruturada, contendo nove frases previamente estabelecidas e arranjadas, sendo o número 1 referente ao “desgostei extremamente”, 5 referente a “nem gostei nem desgostei” e o número 9, ao “gostei extremamente" (MEILGAAR; CIVILLE; CARR, 1999). Também foram obtidas informações sobre o sexo, idade, apreciação de biscoito e intenção de compra pelos provadores.

A partir dos dados obtidos foram calculas as médias e os desvios padrão. Os dados quantitativos foram avaliados por meio de análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o aplicativo SAS (2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização físico-química dos biscoitos elaborados com FMEP com diferentes tempos de maceração

Os teores de umidade (b.u.), cinzas (b.s.) e lipídios dos cookies elaborados com 25% de substituição de farinha de trigo por FMEP com diferentes tempos de maceração (0, 24, 48, 72 horas) e seus respectivos desvios-padrão estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Teores médios de umidade (b.u.), cinzas (b.s.) e lipídios dos *cookies* elaborados com FMEP com diferentes tempos de maceração em substituição de farinha de trigo e fécula de mandioca

Nutriente	Dias de maceração			
	0	1	2	3
Umidade	2,00 ± 0,05 c	2,43 ± 0,03 b	2,55 ± 0,02 b	2,71 ± 0,09 a
Cinzas	2,43 ± 0,03 a	2,32 ± 0,01 b	2,32 ± 0,00 b	2,30 ± 0,01 b
Lipídios	12,04 ± 0,09 c	15,69 ± 0,28 b	16,19 ± 0,04 a	16,50 ± 0,01 a

[1] - Médias seguidas de letras iguais, em cada linha, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade no teste de Tukey;

b.u.: base úmida;

b.s.: base seca

Os teores médios de umidade determinados nos biscoitos elaborados com FMEP com diferentes dias de maceração variaram entre 2,00 - 2,71 g $(100\ g)^{-1}$. O biscoito que apresentou o maior teor de umidade foi o formulado com FMEP com 3 dias de maceração e o que apresentou menor teor de umidade foi o biscoito elaborado com FMEP sem maceração. Os tratamentos com FMEP com 1 e 2 dias de maceração não diferiram entre si ($p>0,05$), mas diferiram dos demais tratamentos. Com o aumento dos dias de maceração da FMEP ocorreu elevação da umidade destes, podendo-se supor que a FMEP retém água durante o processo de maceração. Soares et al. (2009) verificaram teores de umidade bem maiores (6,04%) que os encontrados neste trabalho para biscoitos formulados com 25% de substituição de farinha de trigo por farinha de casca de pequi.

Em relação às cinzas, as médias dos tratamentos oscilaram entre 2,43 – 2,30 g $(100\ g)^{-1}$. O biscoito formulado com FMEP sem maceração foi o que apresentou maior conteúdo de cinzas, diferindo dos demais tratamentos. Observou-se uma diminuição do teor de cinzas com o aumento do tempo de maceração das

FMEP, visto que a maceração causa lixiviação dos minerais (BARAMPAMA; SIMARD, 1995). Porém, entre os tratamentos que passaram pelo processo de maceração, o tempo não alterou ($P > 0,05$) o teor de cinza nos biscoitos.

Rodrigues et al. (2007) encontraram teores de cinzas para *cookies* elaborados com 13% de café expresso (formulação 1), 8% de café solúvel (formulação 2) e 9% de café torrado e moído (formulação 3), respectivamente de 1,53%, 1,72% e 1,64%. Valor maior de cinzas [2,47 g $(100\ g)^{-1}$] foram encontrados por Soares et al. (2009) em biscoitos elaborados com 25% de substituição de FT e FM por FMEP sem maceração.

Os teores médios de lipídios variaram entre 12,0 – 16,5 g $(100\ g)^{-1}$. Soares et al. (2009) encontraram teores de lipídios de 14,25 g $(100\ g)^{-1}$ em biscoitos formulados com 25% de substituição de farinha de trigo por FMEP, compatível ao encontrado neste trabalho. Os biscoitos formulados com FMEP sem maceração e com um dia de maceração diferiram dos demais, enquanto os tratamentos com 2 e 3 dias de maceração não diferiram entre si ($P \leq 0,05$), apresentando os valores mais elevados. Assim, com a elevação do tempo de maceração até 2 dias, houve elevação do teor de lipídios, o que pode ser explicado pela perda de outras substâncias solúveis na água de imersão, e simultânea concentração de lipídios nos biscoitos. Segundo Kataria e Chauhan (1988) com o aumento do tempo de maceração das farinhas, pode ocorrer perda de minerais, sólidos solúveis totais, carboidratos solúveis, açúcares redutores e não redutores e amido e outros compostos na água de maceração.

4.2. Aceitabilidade dos biscoitos elaborados com FMEP com diferentes tempos de maceração

O sexo e a faixa etária dos consumidores submetidos ao teste de aceitabilidade dos biscoitos elaborados com 25% de substituição de FT e FM por FMEP com diferentes dias de maceração (0, 1, 2 e 3) estão apresentados na Figura 1.

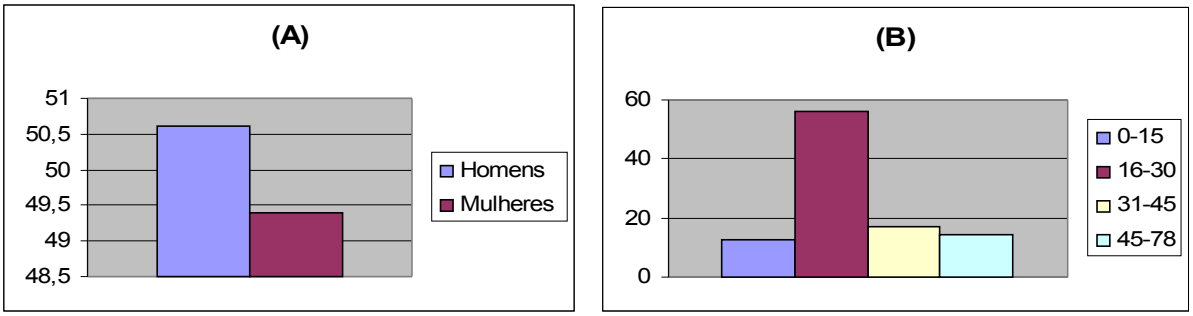


Figura 1. Sexo (A) e faixa etária (B) dos provadores dos biscoitos elaborados com 25% de substituição de FT e FM por FMEP com diferentes dias de maceração

O maior percentual de consumidores entrevistados situava-se na faixa entre 16 e 30 anos (55,9%), seguidos por aqueles entre 31 e 45 anos (17,2%), 45 e 78 anos (14,4%) e 0 e 15 anos (12,5%). Em relação ao sexo 50,6% eram homens e 49,4% mulheres. A maioria dos provadores aprecia biscoitos (64,4%) e a frequência com que eles consomem este tipo de produto está apresentada na Figura 2.

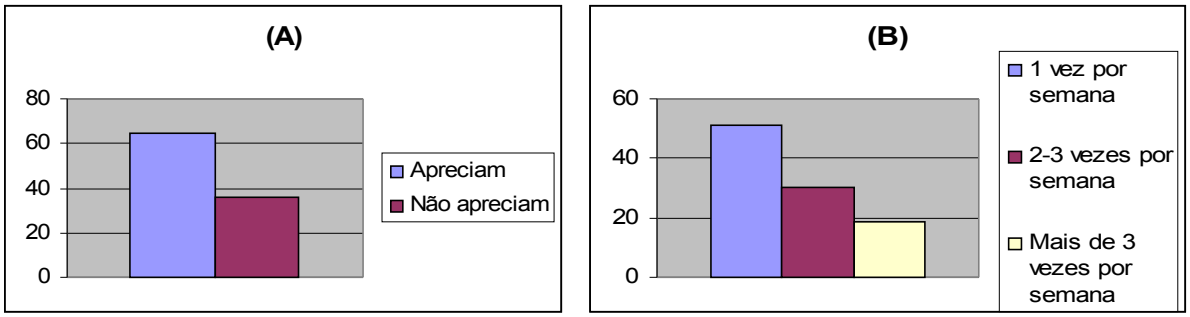


Figura 2. Percentual de provadores que apreciam ou não biscoitos tipo *cookie* (A) e freqüência com que eles consumem este tipo de produto (B)

Os escores médios de aparência, textura e sabor obtidos no teste de aceitação para os biscoitos elaborados com FMEP com diferentes dias de maceração estão apresentados na Tabela 2. Os escores médios para aparência para biscoitos formulados com FMEP com diferentes tempos de maceração variaram entre 6,36 – 7,50. Os tratamentos com 1 e 3 dias de maceração não diferiram entre si ($P>0,05$) em relação à aparência, obtendo os maiores escores, ou seja, entre gostei regulamente e gostei muito. Já o tratamento com 2 dias de maceração diferiu dos demais ($P\leq0,05$), entre gostei ligeiramente e gostei regularmente. Apenas o tratamento com 0 dia de maceração não diferiu ($P>0,05$) dos demais tratamentos. Isto indica que a maceração da farinha não foi suficiente para prejudicar significativamente a aparência do biscoito. Apesar dos escores relacionados à

aparência avaliada na análise sensorial permanecerem ente 6 e 8 (gostei ligeiramente / gostei muito), este parâmetro poderia ser melhorado pela padronização do tamanho e da forma dos biscoitos

Tabela 2. Escores médios dos atributos sensoriais de *cookies* formulados com FMEP submetidas a diferentes tempos de maceração

Atributos	Dias de maceração				
	0	1	2	3	CV[1]
Aparência[2]	6,90^{ab} ± 1,48	7,50^{a} ± 1,42	6,36^{b} ± 1,79	7,21^{a} ± 1,48	22,8562
Textura	6,61^{ab} ± 1,73	7,21^{a} ± 1,51	6,04^{b} ± 1,98	6,91^{a} ± 1,73	28,1865
Sabor	7,38^{b} ± 1,35	8,11^{a} ± 1,12	5,98^{c} ± 2,13	7,92^{ab} ± 1,35	21,1177

[1] C. V.: coeficiente de variação obtido na análise de variância.

[2] Letras iguais na mesma linha não diferem a 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey

Já os escores médios para textura dos biscoitos variaram entre 6,04 – 7,21. O tratamento com farinha submetida a 1 dia de maceração apresentou o maior escore para textura (7,21), referente a “gostei regularmente e gostei muito” e o tratamento com farinha com 2 dias de maceração apresentou o menor escore (6,04), referente a “gostei ligeiramente”. Os tratamentos com farinhas com 1 e 3 dias de maceração não diferiram entre si (P>0,05), mas diferiram do tratamento com farinha com 2 dias de maceração (P≤0,05). O tratamento com farinha sem maceração, porém, não diferiu de nenhum dos demais tratamentos (P>0,05).

Quanto ao sabor, os escores médios dos biscoitos variaram entre 5,98 – 8,11. Todos dos tratamentos diferiram entre si (P≤0,05), exceto o tratamento com farinha com 3 dias de maceração, não diferiu (P>0,05) dos tratamentos com farinhas sem maceração e com 1 dia de maceração. O biscoito de FMEP com 1 dia de maceração recebeu o maior escore para o sabor (entre gostei muito e gostei muitíssimo). Couto (2007) afirma que farinha de casca de pequi adicionada à farinha de trigo contribui para o enriquecimento nutricional de pães de forma, aumentando o teor de fibra bruta e reduzindo o valor calórico. Segundo este autor, notou-se

claramente uma diminuição nas notas do aroma a partir de 10% de adição de farinha de casca de pequi à formulação dos pães de forma, tendo esses pães um gosto forte, levemente amargo. A partir de 5% de adição, os pães de forma apresentaram aroma característico da farinha da casca de pequi, o que contribui para a menor valoração desse produto.

Vários avaliadores sensoriais anotaram, na ficha de avaliação que perceberam um sabor residual amargo, especialmente no biscoito de FMEP com 0 dias de maceração. Isso pode ser explicado pela presença de polifenóis no mesocarpo externo do pequi e que também foi relatado por Reis et al. (2007) em biscoitos nos quais a substituição de mais de 25% de farinha de trigo por farinha de casca de pequi, os avaliadores sensoriais percebiam um forte sabor residual amargo. Os taninos são compostos fenólicos não cristalizáveis e, na presença de água, formam soluções coloidais, que apresentam reação ácida e forte sabor adstringente (FERRÃO et al., 2003). Concentração elevadas destes compostos podem comprometer o sabor e a palatabilidade dos produtos (AGOSTINE-COSTA et al., 2000). Contudo, estudos mostram que a maceração por 12 horas reduz o teor de taninos de 42 e 51%, respectivamente, em duas variedades indianas de *Vicia faba* (SHARMA; SEHGAL, 1992), além de eliminar outros tipos de compostos antinutricionais, como inibidores de tripsina (SIQUEIRA; SOARES JÚNIOR; SILVA, 2008).

As intenções de compra dos biscoitos elaborados com FMEP submetidas a diferentes dias de maceração, por parte dos consumidores entrevistados, estão apresentadas na Figura 3. Apesar das diferenças entres os biscoitos, todos foram sensorialmente aceitos, pois suas médias globais ficaram acima de 6 (gostei ligeiramente). Os biscoitos dos tratamentos com FMEP com 1 e 3 dias de maceração tiveram boa aceitação por parte dos consumidores, perfazendo uma média de 92,5% e 81,3% de intenção de compra, respectivamente.

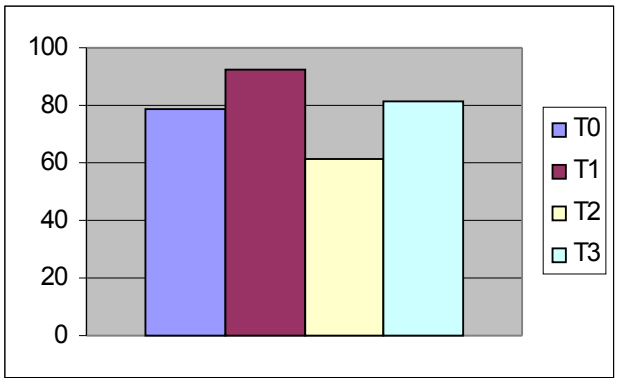


Figura 3 - Intenção de compra dos biscoitos elaborados com FMEP com diferentes tempos de maceração (0, 1, 2 e 3 dias).

Segundo Siqueira, Soares Júnior e Silva (2008) existe inibidor de tripsina na farinha de mesocarpo externo de pequi que não passou pelo processo de maceração, mas que com 1 dias de maceração esse inibidor desaparece. Já Oliveira et al. (2001) avaliaram o efeito da maceração e do processamento doméstico (maceração dos grãos crus em água por 12 a 16 horas) do feijão-comum nos teores de fitatos e observou redução de 85% nos teores deste componente pela utilização da maceração.

5. CONCLUSÃO

- Os biscoitos elaborados com FMEP com diferentes tempos de maceração são boas fontes de minerais.
- Como a percepção do sabor residual amargo é mais pronunciada no biscoito de FMEP sem maceração que no biscoito com FMEP com 1 dia de maceração, pode-se dizer que a maceração foi efetiva na remoção dos compostos responsáveis por este amargor, fato que poderia ser investigado em novos estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINE-COSTA, T. da S. et al. Caracterização, por cromatografia em camada delgada, dos compostos fenólicos presentes em pedúnculos de caju (*Anacardium ocidentale* L.). **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 129-137, 2000.

ARAÚJO, D. F. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): an economically valuable species of the Central Brazilian cerrados. **Economic Botany**, New York, v. 49, n.1, p. 40-48, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC**. 16. ed. Washington: AOAC, p. 213-267. 1995.

BARAMPAMA, Z.; SIMARD, R. E. Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) grown in Burundi. **Food Chemistry,** Oxford, v. 47, n. 2, p. 15-67, 1995.

BARBOSA, R. C. M. V.; AMANTE, E. R. Farinha da casca de pequi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...** Belém, 2002.

BARCELOS, M. F. B.; FERRUA, F. Q. **Frutas e Hortaliças Processados:** métodos de conservação e efeitos no valor nutritivo. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. 71p.

CABRAL, L. C.; MAIA, G. A.; WHITING, F. M.; HOLANDA, L. F. F.; STULL, J. W.; GUEDES, Z. B. L. Contribuição ao estudo de farinha de soja integral: aspectos químicos e tecnológicos. **Ciência agronomica**, Fortaleza, v. 9, n. 1-2, p. 11-19, 1979.

CHAVAN, J. K., KADAN, S. S. Nutritional enrichment of bakery products by supplementation with nonwheat flours. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 33, n. 3, p. 189-226, 1993.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. de F.; FURTADO, A. A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.

COUTO, E. M. **Utilização da farinha de casca de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) na elaboração de pão de forma.** 2007. 212f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2007.

DOMBROSKI, J. L. D. **Estudo sobre a propagação do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.).** 1997. 78f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 1997.

FERRÃO, M. F. et al. Técnica não destrutiva de análise de tanino em café empregando espectroscopia no infravermelho e algoritmo genético. **Tecno-Lóg**, Santa Cruz do Sul, v. 7, n. 1, p. 9-26, 2003.

FERREIRA, H. B. D.; CALIARI, M.; CURCIO, A. L. Estudo da presença de pectina no mesocarpo de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) e sua capacidade na fabricação de geléias. In: XIV ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 2005, Goiânia. **Anais...** 2005. p. 74-74.

GRIBEL, R. **Ecologia da polinização e da dispersão de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) na região do Distrito Federal.** 1986. 109f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 1986.

JAMES, C.; COURTNEY, D. L. D.; LORENZ, K. Rice bran-soy blends as protein supplements in cookies. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 24, n. 5, p. 495-502, 1989.

JOOD, S.; CHAUHAN, B. M.; KAPPOR, A. C. Protein digestibility (in vitro) of chickpea and blackgram seeds as affected by domestic processing and cooking. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 39, n. 2, p. 149-154, Jun. 1989.

KATARIA, A.; CHAUHAN, B. M. Contents and digestibility of carbohydrates of mung beans (*Vigna radiata* L.) as affected by domestic processing and cooking. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 38, n. 1, p. 51-59, Jan. 1988.

MARQUES, M. C. S. **Estudo fitoquímico e biológico dos extratos de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).** 2001. 91f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica/ Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

MEILGAAR, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques.** 3ª ed. Boca Raton: CRC Press; 1999.

MELO JÚNIOR, A. F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J. S. R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 66, p. 56-65, 2004.

OLIVEIRA, A. C. de; QUEIROZ, K. da S.; HELBIG, E.; REIS, S. M. P. M.; CARRARO, F. O processamento doméstico do feijão-comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiose e verbascose. **ALAN - Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 51, n. 3, p. 276-283, 2001.

OLIVEIRA, L. F., NASCIMENTO, M. R. F., BORGES, S. V., RIBEIRO, P. C. N., RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 259-262, 2002.

PEREIRA, C. A.; CARLI, L. de; BEUX, S.; SANTOS, M. S.; BUSATO, S. B.; KOBELNIK, M.; BARANA, A. C. Utilização de farinha obtida a partir de rejeito de batata na elaboração de biscoitos. **Ci. Agr. Eng.**, Ponta Grossa, v. 11, n. 1, p. 19-26, 2005.

REIS, R. C.; SOARES JÚNIOR, M. S.; LACERDA, D. B. L.; KOAKUZU, S. N.; BASSINELO, P. Z. Desenvolvimento e caracterização da farinha de casca de pequi (FCP) e sua aplicação em biscoitos. In: IV CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG, Goiânia. **Anais...** 01 CD-ROM, 2007.

RIBEIRO, R. F. **Pequi: o rei do cerrado.** Belo Horizonte: Rede Cerrado, 2000. 62p.

RODRIGUES, M. A. A.; LOPES, G. S.; FRANÇA, A. S.; MOTTA, S. Desenvolvimento de formulações de biscoitos tipo *cookie* contendo café. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p.162-169, 2007.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de. **Cerrado**: ambiente e flora. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, 1998. 556 p

SAS Institute. **Statistical Analysis System.** Sistem for Windows 8.0 – Release

9.1.3. Sas Institute, Inc. Cary, 2002.

SHARMA, A.; SEHGAL, S. Effect of domestic processing, cooking and germination on trypsin inhibitor activity and tanin content of faba bean (*Vicia faba*). **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 42, n. 2, p. 127-133, 1992.

SIQUEIRA, B. dos S.; SOARES JÚNIOR, M. S.; SILVA, K. F. F. Efeito do tempo de maceração no valor nutricional de farinhas obtidas a partir da casca de pequi. In: V CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG, Goiânia. **Anais...** 01 CD-ROM, 2008.

SOARES JÚNIOR, M. S.; CALIARI, M, TORRES, M. C. L., VERA, R., TEIXEIRA, J. S., ALVES, L.C. Qualidade de biscoitos formulados com diferentes teores de farinha de amêndoa de baru (Dipteryx alata Vog.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 1, p. 51- 56, 2007.

SOARES JÚNIOR, M. S.; REIS, R. C. dos; BASSINELLO, P. Z.; LACERDA, D. B. C.; KOAKUZU, S. N.; CALIARI, M. Qualidade de biscoitos formulados com diferentes teores de farinha de casca de pequi. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 2, p. 98-104, 2009.

TSEN, C. C. Regular and protein fortified cookies from composite flours. **Cereal Foods World**, v. 21, n. 12, p. 634-637, 1976.

VERA, R.; NAVES, R. V.; NASCIMENTO, J. L.; CHAVES, L. J.; LEANDRO, W. M.; SOUZA, E. R. B. Caracterização física de frutos do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) no Estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 2, p. 71-79, 2005.

VILAS-BOAS, E. V. de B. Frutas minimamente processadas: pequi. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 2004, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa: UFV, 2004. p. 122-127.