

JOELMA ABADIA MARCIANO DE PAULA
VANESSA CRISTIANE SANTANA AMARAL

Organizadoras



Métodos e técnicas aplicados na pesquisa interdisciplinar em saúde



Dedicamos



Dedicamos este livro a professora Dra. Cláudia Cristina Garcia Martin Didonet (*in memorian*) por toda a sua contribuição ao ensino e à pesquisa desenvolvidos na graduação e na pós-graduação da Universidade Estadual de Goiás – Câmpus Central – Anápolis. Em especial suas contribuições ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS), onde ela atuou ativamente nos últimos anos.

A professora Cláudia, ou Claudinha, não só transmitia conhecimento como também alegria por onde passava. Ela orientou vários alunos ao longo de sua carreira, e como dizia: “*Não tenho filhos biológicos, mas tenho filhos científicos*”. Eu tive a sorte de ser uma das suas filhas científicas, e sou imensamente grata a sua amizade e dedicação profissional. Ela amava incondicionalmente a Ciência, como uma verdadeira mãe acadêmica para seus alunos, lutou incansavelmente pelo aprimoramento da pesquisa na UEG, junto com os colegas e amigos docentes. Sentiremos a sua falta, mas o seu legado de conhecimento está imortalizado através de artigos e capítulos de livros publicados.

Nossos sinceros agradecimentos,

KARINA D’EÇA (PÓS-DOCTORANDA)
E DOCENTES DO PPGCAPS

Presidente

Antonio Cruvinel Borges Neto (Reitor)

Vice-Presidente

Claudio Roberto Stacheira (Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação)

Coordenadora Geral

Elisabete Tomomi Kowata

Revisão Técnica

Thalita Gabriele Lacerda Ribeiro

Revisão Linguística e textual

Marília Silva Vieira

Revisão Geral

Joelma Abadia Marciano de Paula

Vanessa Cristiane Santana Amaral

Projeto Gráfico e Capa

Adriana da Costa Almeida

Conselho Editorial

Alessandro José Marques Santos (UEG)

José Leonardo Oliveira Lima (UEG)

Julierme Sebastião Moraes Souza (UEG)

Luciana Rebelo Guilherme (UEG)

Leonardo Lopes do Nascimento (UEG)

Osvaldo José da Silveira Neto (UEG)

Sabrina do Couto de Miranda (UEG)

Thiago Henrique Costa Silva (UEG)

Vinicius Gomes de Vasconcellos (UEG)

Wellington Hannibal (UEG)

JOELMA ABADIA MARCIANO DE PAULA
VANESSA CRISTIANE SANTANA AMARAL

Organizadoras

Métodos e técnicas aplicados na pesquisa interdisciplinar em saúde



ANÁPOLIS | 2022

© Editora UEG – 2022
© Autoras e autores – 2022

A reprodução não autorizada desta publicação, por qualquer meio,
seja total ou parcial, constitui violação da Lei no 9.610/98.

Depósito legal na Biblioteca Nacional, conforme decreto no 1.825,
de 20 de dezembro de 1907.

Catálogo na Fonte
Comissão Técnica do Sistema Integrado de Bibliotecas Regionais (SIBRE),
Universidade Estadual de Goiás

M593 Métodos e técnicas aplicados na pesquisa interdisciplinar em saúde /
vários autores; organizado por Joelma Abadia Marciano de Paula e
Vanessa Cristiane Santana Amaral – Anápolis, GO: Editora UEG,
2022.

568 p.; il.; 16 x 23 cm; e-Book.

ISBN: 978-65-88502-14-3 (e-book)

1. Pesquisa em saúde. 1.1. Interdisciplinaridade. 1.2. Métodos. 1.3.
Técnicas. I. Título.

CDU: 614:001.891

Esta obra foi produzida com recursos dos próprios autores. A exatidão das
referências, a revisão gramatical e as ideias expressas e/ou defendidas nos textos
são de inteira responsabilidade dos autores.

SUMÁRIO

Prefácio	13
Apresentação	17

PARTE I

Monitoramento e caracterização de produtos para saúde

1	MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO: FERRAMENTAS ESSENCIAIS PARA O DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE PRODUTOS PARA SAÚDE	23
	Michelle Ribeiro Silva	
	Vanessa Cristiane Santana Amaral	
2	TESTES COMPORTAMENTAIS UTILIZADOS EM PESQUISA PRÉ-CLÍNICA: A IMPORTÂNCIA DOS MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE	45
	Kamila Souto Leichtweis	
	Patrícia Paula da Silva Xavier	
	Vanessa Cristiane Santana Amaral	
3	SEGURANÇA DO USO DE FÁRMACOS NA GESTAÇÃO: UMA ABORDAGEM DOS PROTOCOLOS DE TOXICIDADE REPRODUTIVA	63
	Carlos Eduardo Lacerda Ramalho	
	Marielly Carvalho	
	Vanessa Cristiane Santana Amaral	

4	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>Streptococcus mutans</i> E <i>Candida albicans</i> DA CAVIDADE BUCAL	81
	Reuber Mendes Rocha Juliane Guimarães de Carvalho Plínio Lázaro Faleiro Naves	
5	CULTURA CELULAR NO DESENVOLVIMENTO DE NOVAS TERAPIAS ANTIVIRAIS	99
	Ana Caroline de Souza Barnabé Eliete Souza Santana Ana Paula de Moraes	
6	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA USO EM SAÚDE ..	111
	Luciana Rebelo Guilherme Aline Fernandes Barcelos	
7	RADIOFREQUÊNCIA: USO DA TECNOLOGIA NA SAÚDE ESTÉTICA	135
	Adamiane Silva Moraes Schwaickardt Lucas Henrique Ferreira Sampaio	

PARTE II

Desenvolvimento de bioprodutos para saúde

8	UMA INTRODUÇÃO AOS ESTUDOS DA METABOLÔMICA	149
	Valdirene Neves Monteiro	
9	ESTRATÉGIAS PARA O ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA	171
	Amanda dos Reis Correia Roberta Signini Plínio Lázaro Faleiro Naves	

10	NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS) E BIOINFORMÁTICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDAS PRESENTES NO PROBIÓTICO DE KOMBUCHA	193
	Karina Freire d'Eça Nogueira Santos Alliny das Graças Amaral Claudia Cristina Garcia Martin-Didonet	
11	SISTEMATIZAÇÃO E NOÇÕES SOBRE COLETA, PREPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS ÚTEIS À SAÚDE	217
	Josiel Araujo Lemes Aristônio Magalhães Teles Josana de Castro Peixoto	
12	TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DE ORIGEM VEGETAL.....	239
	Antônio Carlos Severo Menezes Danielle Coelho da Cruz Gracielle Oliveira Sabbag Cunha	
13	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE BIOPRODUTOS PARA SAÚDE... ..	261
	Joelma Abadia Marciano de Paula Pabline Silva Gasparoti Maria Teresa Freitas Bara	
14	PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS E TÉCNICAS DE OTIMIZAÇÃO APLICADOS NA OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS PARA SAÚDE – PARTE 1	297
	Leonardo Luiz Borges Debborah Gonçalves Bezerra Joelma Abadia Marciano de Paula	

- 15 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS E TÉCNICAS
DE OTIMIZAÇÃO APLICADOS NA OBTENÇÃO
DE BIOPRODUTOS PARA SAÚDE – PARTE 2 327
Leonardo Luiz Borges
Deborah Gonçalves Bezerra
Joelma Abadia Marciano de Paula

PARTE III

Comunicação científica na pesquisa interdisciplinar em saúde

- 16 MÉTODOS DE COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA:
GÊNERO RESUMO 347
Martina Estevam Brom Vieira
Tânia Cristina Dias da Silva Hamu
Flávio Monteiro Ayres
- 17 MÉTODOS DE COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA:
GÊNERO RESENHA 369
Andreia Juliana Rodrigues Caldeira
Olira Saraiva Rodrigues
Flávio Monteiro Ayres
- 18 MÉTODOS DE COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA:
GÊNERO REVISÃO INTEGRATIVA 395
Roberta Carneiro Toledo
Cristiane Alves da Fonseca do Espírito Santo
Flávio Monteiro Ayres
- 19 REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISES
CONVENCIONAIS: COMO INTERPRETÁ-LAS. 419
Aline de Fátima Bonetti
Lorena Lisita Inácio Teodoro
Luciana Rebelo Guilherme

20	PRINCÍPIOS BÁSICOS PARA A CONDUÇÃO DE REVISÕES SISTEMÁTICAS E METANÁLISES CONVENCIONAIS.....	445
	Aline de Fátima Bonetti Amanda Schmaltz Luciana Rebelo Guilherme	
21	CIENCIOMETRIA: O QUE É E COMO FAZER.	469
	Elizabeth de Fátima Lopes da Rocha Iara Barbosa Cabral Flávio Monteiro Ayres	
22	LEITURA E ANÁLISE CRÍTICA DE ARTIGOS CIENTÍFICOS	483
	Cibelle Kayenne Martins Roberto Formiga Flávio Monteiro Ayres	
23	A ARTE CIENTÍFICA NA PRODUÇÃO ACADÊMICA	507
	Andreia Juliana Rodrigues Caldeira Francisco Júnior Simões Calaça Flávio Monteiro Ayres	
24	A ARTE CIENTÍFICA COMO FERRAMENTA NA DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA.....	535
	Andreia Juliana Rodrigues Caldeira Francisco Junior Simões Calaça Flávio Monteiro Ayres	
	Sobre os autores.....	553



PREFÁCIO

O processo de evolução científica tem mostrado a importância da aplicação da abordagem interdisciplinar e o concomitante fortalecimento do nível das discussões científicas nessa abordagem. A formação do conhecimento na atualidade não dispensa a inclusão de fenômenos diferentes, complexos, difíceis de serem estudados por pesquisadores solitários, com formação centrada de maneira exclusiva no arsenal de disciplinas específicas.

Uma vez que no Brasil o exercício da ciência se iniciou de forma tardia em relação aos países desenvolvidos, o processo de evolução da abordagem científica também acompanhou esse atraso. Só recentemente o enfoque interdisciplinar começa a ser aplicado de maneira mais sistemática pelos cientistas. Júlio César Wasserman resalta que foi em 1999 que cientistas e assessores da CAPES se sentiram motivados a discutir a criação de uma comissão específica dos cursos de pós-graduação da área Multidisciplinar. Em 2003 foi estabelecido o estado da arte da ciência interdisciplinar no Brasil e suas contribuições para o desenvolvimento sustentável para esta nova abordagem. Dessa forma, ficou estabelecido nas referidas discussões que os cursos da área Multidisciplinar deveriam promover a interação entre docen-

tes, obrigatoriamente, de áreas diferentes, mas com foco em objetivos comuns. De lá para cá, as pesquisas interdisciplinares vêm refletindo resultados positivos e aderência por parte de pesquisadores.

Nas palavras de Hilton Japuassu, a interdisciplinaridade é conceituada pelo grau de integração entre as disciplinas e a intensidade de trocas entre os especialistas. No processo interativo, todas as disciplinas devem sair enriquecidas. Não basta somente tomar de empréstimo elementos de outras disciplinas, mas comparar, julgar e incorporar esses elementos na produção de uma disciplina modificada.

O campo da saúde demanda interdisciplinaridade. O homem é um ser complexo atravessado por multiplicidade de elementos e circunstâncias que exigem uma abordagem de caráter amplo e multidisciplinar. Por isso, o campo da saúde exige o conhecimento de diferentes áreas a serem articuladas entre si com vistas a obtenção de sinergia. Diversos ramos do conhecimento são instrumentos desejáveis na formação de um todo que supera em qualidade a simples soma de suas partes. Esse processo culminaria com a resultante derivada da construção reflexiva coletiva que analisa e problematiza, com coragem, as relações de saber não apenas relacionadas a biologia, química ou física, mas a outros campos do conhecimento que permitam a elaboração de soluções que levem a compreensão do ser humano em sua plenitude individual e social.

Nesse segundo livro, ousado projeto do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde, da Universidade Estadual de Goiás, são apresentadas ao leitor a construção e a discussão de métodos utilizados para facilitar os caminhos da pesquisa científica em produtos para saúde, trazendo exemplos importantes nas áreas de Monitoramento e Desenvolvimento de Produtos para a saúde. Os dois primeiros capítulos, “Modelos animais de depressão: ferramentas essenciais para o desenvolvimento e avaliação de produtos para saúde” e “Testes comportamentais utilizados em pesquisa pré-clínica: a importância dos modelos animais de ansiedade”, se articulam com o tema abordado nos capí-

tulos 11 “Sistematização e noções sobre coleta preparação e identificação de plantas úteis à saúde” e 12 “Técnicas de extração, isolamento e caracterização de constituintes químicos de origem vegetal”, ao mostrar diferentes possibilidades de testes que podem ser utilizados tanto no monitoramento de substâncias farmacêuticas já liberadas para uso medicinal quanto na pesquisa de novas substâncias de origem vegetal que poderão ser desenvolvidas como futuros fitoterápicos. Esse tipo de interação ocorre em todos os capítulos e possibilita ao pesquisador se sentir familiarizado com as possibilidades de novos estudos em áreas que ele não se sente confortável.

A importância do livro que está nas mãos do leitor não diz respeito apenas ao seu conteúdo explícito, mas sobretudo ao desafio que traz aos pesquisadores, desviando-os da estrada de trânsito fácil pavimentada pela formação de zonas de saber independentes que criam núcleos autárquicos. Assim, as ações do pesquisador, antes restritas a forma autônoma e isolada de seu laboratório, se veem interpenetradas por outros conhecimentos que podem amplificar seu alcance científico e social uma vez que seus resultados são de interesse da sociedade, em última instância.

Portanto, a iniciativa do grupo liderado pelas professoras Joelma e Vanessa ao organizarem o presente livro constitui um passo importante na direção da construção da interdisciplinaridade em programas de pós-graduação identificados com o desenvolvimento e aplicação de produtos para saúde. Essa iniciativa revela a consciência, muito a propósito, de que o enfrentamento entre problemas cada vez mais globais, interdependentes e complexos deve ser realizado com criatividade e espírito de aventura, além de contribuir para que as complexidades possam ser percebidas e abordadas habilmente.

Profa. Dra. Lenise Arneiro Teixeira

Doutora em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro
Professora aposentada da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPG-CAPS) da Universidade Federal Fluminense no quadriênio 2016-2020



APRESENTAÇÃO

Após a publicação da nossa primeira obra intitulada “Ciências da Saúde: saberes e práticas interdisciplinares”, fomos instigadas a organizar este segundo livro: **Métodos e Técnicas Aplicados na Pesquisa Interdisciplinar em Saúde**. A motivação para a criação desta obra surgiu da necessidade de reunir conhecimentos teórico-práticos relacionados às linhas de pesquisa do nosso programa de pós-graduação, visando facilitar o acesso daqueles que se iniciam no campo de estudo e investigação das ciências aplicadas a produtos para saúde.

Dentro desta perspectiva, buscamos abordar de forma orgânica, integrada e interdisciplinar, temáticas relevantes que contribuam para o aprendizado e aperfeiçoamento da comunidade científica. Sempre otimistas quanto à possibilidade da prática da interdisciplinaridade, estruturamos os capítulos deste livro em três partes: “Monitoramento e Caracterização de Produtos para Saúde”, “Desenvolvimento de Bioprodutos para Saúde” e “Comunicação Científica na Pesquisa Interdisciplinar em Saúde”.

Na primeira parte, “Monitoramento e Caracterização de Produtos para Saúde”, os autores apresentam conceitos e técnicas

para auxiliar no planejamento e execução de estudos acerca da eficácia, segurança e caracterização de produtos com aplicabilidades na área da saúde. São abordados os temas: modelos animais de depressão como ferramentas essenciais para o desenvolvimento e avaliação de produtos para saúde; testes comportamentais utilizados em pesquisa pré-clínica e a importância dos modelos animais de ansiedade; segurança do uso de fármacos na gestação com uma abordagem voltada aos protocolos de toxicidade reprodutiva; isolamento e caracterização da formação de biofilme por *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* da cavidade bucal; cultura celular no desenvolvimento de novas terapias antivirais; técnicas de caracterização de sistemas nanoestruturados para uso em saúde e o uso da radiofrequência como tecnologia na saúde estética.

A segunda parte, “Desenvolvimento de Bioprodutos para Saúde”, destaca a importância da pesquisa, desenvolvimento e inovação de produtos para saúde. Os capítulos abordam aspectos teórico-práticos importantes que permitem aos pesquisadores operacionalizarem os estudos de obtenção e desenvolvimento de bioprodutos, incluindo temas como: introdução aos estudos da metabolômica; estratégias para o estudo da atividade antimicrobiana da quitosana; *Next Generation Sequencing* (NGS) e bioinformática para identificação de bactérias ácidas presentes no probiótico de Kombucha; sistematização e noções sobre coleta preparação e identificação de plantas úteis à saúde; técnicas de extração, isolamento e caracterização de constituintes químicos de origem vegetal; desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade de bioprodutos para saúde e planejamentos experimentais e técnicas de otimização aplicados na obtenção de bioprodutos para saúde.

Na última parte, “Comunicação Científica na Pesquisa Interdisciplinar em Saúde” reunimos uma série de capítulos que enfocam, de maneira didática, os pressupostos teóricos utilizados pela comunidade científica para a disseminação/divulgação de

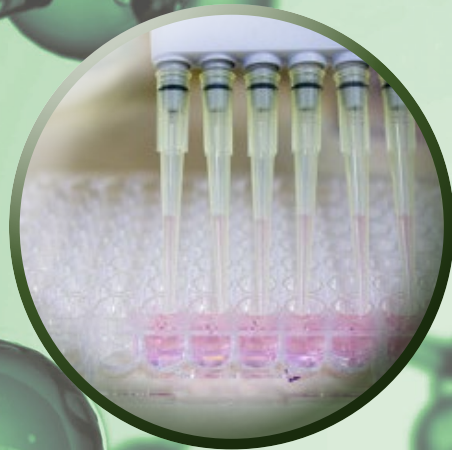
informações especializadas entre os pares, com um olhar especial para as áreas da saúde. As temáticas exploradas nessa seção do livro abarcam métodos de comunicação científica como resumo, resenha, revisão integrativa; princípios básicos para a condução e a interpretação de revisões sistemáticas e metanálises convencionais; cienciometria; leitura e análise crítica de artigos científicos e a arte científica na produção e divulgação acadêmica.

É nosso desejo sincero que esta obra, tecida a várias mãos, seja útil a estudantes e pesquisadores das diversas áreas da saúde e afins, e cumpra com a missão de ampliar horizontes no âmbito do ensino e pesquisa interdisciplinar.

Gostaríamos, no ensejo, de cumprimentar aos autores dos diversos capítulos deste livro pelo entusiasmo e compromisso na sua publicação.

Joelma Abadia Marciano de Paula

Vanessa Cristiane Santana Amaral



A stylized molecular structure graphic in shades of green, featuring spheres connected by rods, set against a background of concentric circles.

PARTE I

Monitoramento e caracterização de produtos para saúde



Capítulo 1

MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO

Ferramentas essenciais para o desenvolvimento
e avaliação de produtos para saúde¹

MICHELLE RIBEIRO SILVA
VANESSA CRISTIANE SANTANA AMARAL

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos 50 anos, foram desenvolvidos e validados muitos modelos animais para o estudo experimental da depressão (MAIER; SELIGMAN, 1976; PLOTSKY; MEANEY, 1993; PORSOLT; LE PICHION; JALFRE, 1977; WILLNER *et al.*, 1987). Esses modelos são utilizados em estudos pré-clínicos para a triagem e o desenvolvimento de novos fármacos antidepressivos, para a investigação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos na depressão, e no teste empírico de hipóteses comportamentais e fisiopatológicas relacionadas a essa psicopatologia em humanos (DUMAN, 2010; HARRO, 2019; YIN; GUVEN; DIETIS, 2016).

A depressão é um transtorno de humor crônico, heterogêneo, complexo e multifatorial que impõe severo comprometimento social e econômico global (HARRO, 2019; KATO *et al.*, 2016). Um indivíduo é diagnosticado com essa psicopatologia quando apre-

1 Capítulo vinculado ao projeto de pesquisa “Alterações endócrinas, comportamentais e neurais em ratos expostos ao estresse neonatal: influência do gênero e da idade”, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG). Programa Primeiros Projetos (PPP) – Chamada 03/2015. Processo n. 201610267001023.

senta, durante um período mínimo de duas semanas, pelo menos um conjunto de cinco sintomas depressivos, incluindo aqueles considerados típicos ou fundamentais (humor depressivo ou anedonia) (Quadro 1) (DSM-V, 2014).

Os sintomas depressivos são, muitas vezes, recorrentes, propensos à cronicidade e interferem na capacidade do indivíduo em lidar com a vida cotidiana. Aproximadamente 80% dos pacientes que receberam tratamento para depressão apresentarão reincidência, e a média costuma ser quatro episódios ao longo da vida (PATEL *et al.*, 2019; YIN; GUVEN; DIETIS, 2016).

Quadro 1 – Sintomas utilizados no diagnóstico do episódio depressivo segundo a quinta edição do Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V)

Sintomas típicos
1. Humor depressivo
2. Aneдонia
Sintomas acessórios
3. Aumento ou diminuição do sono
4. Aumento ou diminuição do apetite
5. Alterações na concentração e memória
6. Pensamentos de culpa
7. Fadiga ou desânimo
8. Lentidão ou agitação
9. Pensamentos de morte

Fonte: DSM-V (2014).

A prevalência global de indivíduos com depressão aumentou quase 13% durante os anos de 2007 a 2017, o que corresponde a mais de 300 milhões de pessoas em 2018 (CHEN *et al.*, 2018; WHO,

2020). Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2030, a depressão será a principal doença no mundo e a responsável por inúmeros casos de incapacidade trabalhista (WHO, 2017). De acordo com o relatório do Fórum Econômico Mundial, os custos diretos e indiretos associados à depressão maior devem ultrapassar os 6 trilhões de dólares em 2030 (BLOOM *et al.*, 2011). Além do viés econômico, o suicídio contribui para a crescente mortalidade associada a essa psicopatologia (GBD, 2018; SLATTERY; CRYAN, 2017).

Apesar de extensas investigações e hipóteses suscitadas, os processos neurobiológicos que conduzem ao quadro clínico de depressão não são totalmente compreendidos. A hipótese amplamente aceita é a do desequilíbrio das monoaminas (KESSLER; BROMET, 2013), segundo a qual a depressão é causada pela diminuição das funções exercidas por essas substâncias no encéfalo (CZÉH *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017). Contudo, essa teoria não explica o amplo espectro de alterações estruturais macroscópicas e microscópicas documentadas em pacientes deprimidos ao longo dos anos de estudo, a desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), as mudanças na microbiota intestinal e potenciais mecanismos inflamatórios (AISA *et al.*, 2008; MAYER *et al.*, 2014; ROSENBLAT *et al.*, 2014). Além disso, a hipótese não esclarece o possível envolvimento de outros neurotransmissores, como glutamato (McCARLTHY *et al.*, 2012), ácido gama-aminobutírico (GABA) (LUSCHER; SHEN; SAHIR, 2011) e alguns neuropeptídeos (LLOYD; NEMEROFF, 2011).

A depressão típica é caracterizada por uma hiperatividade do eixo HPA e pela desregulação do sistema nervoso autônomo (SNA) (AISA *et al.*, 2008; GURURAJAN *et al.*, 2019; SLATTERY; CRYAN, 2017). Várias regiões encefálicas regulam as emoções e a circuitaria de recompensa e, portanto, alterações funcionais em áreas altamente interligadas têm sido implicadas nessa psicopatologia. Nesse tipo de depressão, as atividades centrais do glutamato, das monoaminas e citocinas estão diminuídas de forma significativa e persis-

tente, assim como a atividade do núcleo accumbens, o que está relacionado ao sintoma de anedonia (HARRO, 2019; MINAMI *et al.*, 2017). A diminuição volumétrica observada no hipocampo e em outras regiões encefálicas em pacientes deprimidos tem apoiado a hipótese de depressão envolvendo a diminuição do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que também tem papel na plasticidade cerebral. Essa hipótese provém de estudos pré-clínicos que mostram que várias formas de estresse reduzem a sinalização mediada pelo BDNF no hipocampo, enquanto o tratamento com antidepressivos aumenta a sinalização mediada por essa molécula (KRISHNAN; NESTLER, 2008).

A depressão também tem sido associada a mecanismos imunológicos e moléculas biológicas relacionadas a esse sistema, como as citocinas (DALLA *et al.*, 2009; FELGER; LOTRICH, 2013). Além disso, o aumento da concentração plasmática de glicocorticoides determinado pela desregulação do eixo HPA tem sido descrito em pacientes com depressão típica (AISA *et al.*, 2008; PATEL *et al.*, 2019). Embora a etiologia específica da depressão não tenha sido completamente elucidada, tem crescido o consenso de que fatores genéticos, bem como experiências adversas no início da vida aumentam a vulnerabilidade a essa psicopatologia (GURURAJAN *et al.*, 2019).

Sendo a depressão um transtorno psiquiátrico complexo, estudá-la é um enorme desafio à ciência. Nesse contexto, os modelos animais têm sido ferramentas indispensáveis na pesquisa translacional e na neurociência, permitindo que alterações fisiológicas, endocrinológicas, neuroanatômicas e comportamentais relacionadas a esta psicopatologia sejam investigadas. O objetivo deste capítulo é apresentar um panorama geral dos modelos animais de depressão utilizados em estudos pré-clínicos destacando as vantagens e limitações de cada teste comportamental.

2 MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO

Os modelos animais de depressão são geralmente classificados em quatro classes principais, de acordo com a natureza da fase de indução da psicopatologia (McARTHUR; BORSINI, 2006; SCHMIDT, 2011; YIN; GUVEN; DIETIS, 2016). A primeira classe é baseada na aplicação de estressores agudos ou subcrônicos para a indução de comportamentos depressivos. Inclui modelos comportamentais, como o teste do nado forçado e o teste de suspensão pela cauda, também chamados de modelos baseados no “desespero comportamental”. São frequentemente usados em estudos rápidos de rastreamento de potenciais novos fármacos antidepressivos, devido ao baixo custo e simplicidade, bem como por atender aos critérios de validade de face e preditiva. O modelo de desamparo aprendido é provavelmente o que mais se destaca nessa classe, pois atende aos critérios de validação e oferece uma variedade de possíveis alterações comportamentais e cognitivas duradouras a médio prazo (BOGDANOVA *et al.*, 2013; HAO *et al.*, 2019; LANDGRAF *et al.*, 2015).

A segunda classe baseia-se na exposição a agentes estressores capazes de desencadear comportamentos depressivos, como anedonia, aversão a atividades motoras e mudanças no apetite. Esses modelos animais incluem o estresse crônico leve, a derrota social, o isolamento social crônico e o estresse no início da vida (separação materna) (AISA *et al.*, 2008; CZÉH *et al.*, 2015; GURURAJAN *et al.*, 2019).

A terceira classe de modelos de depressão aplica vários conceitos bioquímicos e farmacológicos para mimetizar comportamentos depressivos. São nomeados de acordo com as vias fisiopatológicas e moleculares da depressão em que atuam, e são uma importante ferramenta de estudo da fisiopatologia da depressão. Inclui modelos animais de administração de substâncias e observação das alterações correspondentes, como, por exemplo, inibição do hipocampo pela administração de retinóides e alteração da função imunológica pela administração de citocinas específicas (PARIANTE; LIGHTMAN,

2008; YIN; GUVEN; DIETIS, 2016). Essa classe não foi projetada apenas para gerar sintomas depressivos, mas, principalmente, como uma ferramenta de estudo da fisiopatologia da depressão, bem como para o envolvimento de determinadas vias moleculares.

A quarta e última classe de modelos animais de depressão envolve a aplicação de técnicas genéticas e/ou cirúrgicas que podem alterar permanentemente os fenótipos e comportamentos dos animais. Incluem, por exemplo, a bulbectomia olfativa e modelos geneticamente modificados (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013; DEMIN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2017).

Os modelos animais são desenvolvidos tendo como base três critérios de validação: validade de face ou analogia (grau de semelhança entre comportamento animal e sintomas da psicopatologia em humanos), validade preditiva (semelhanças nas respostas ao tratamento) e validade de homologia ou constructo teórico (grau de homologia entre a patologia e o comportamento avaliado) (CZÉH *et al.*, 2015; PATEL *et al.*, 2019).

Alguns sintomas clínicos de depressão, como autonegação, distímia e predisposição ao suicídio, são difíceis de serem modulados com precisão (DEMIN *et al.*, 2019). Somam-se, ainda, as inter-relações gene-ambiente. Com o objetivo de superar tais limitações, um quarto critério chamado de validade da densidade foi proposto para avaliar a confiabilidade da variação genética. Tal critério enfatiza as interações entre o tipo genético e as circunstâncias do desenvolvimento, e exige que os diferentes sintomas depressivos modulados nos modelos animais correspondam às condições ambientais (HAO *et al.*, 2019). Esses quatro critérios de validade oferecem uma estratégia de gerenciamento completa aos pesquisadores da área e desempenham papel essencial na avaliação de modelos animais de depressão. Ademais, a escolha pela utilização de um determinado modelo também é influenciada por fatores como custo, viabilidade e objetivo do estudo.

Dentre os vários modelos animais de depressão existentes, este capítulo abordará os protocolos utilizados nos testes de desamparo aprendido, nado forçado, estresse crônico leve, estresse social (separação materna) e estresse social (isolamento).

2.1 Desamparo aprendido

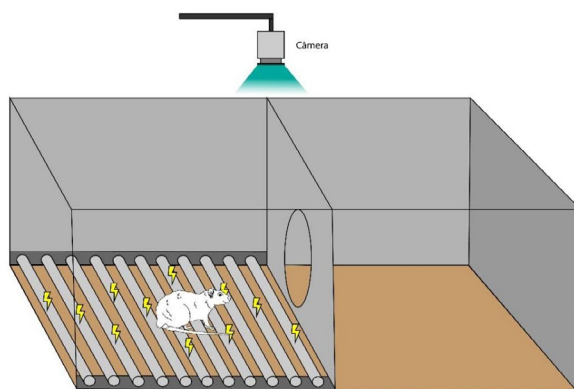
Inicialmente descrito por Maier e Seligman (1976), foi um dos primeiros paradigmas usados para modelar a depressão. Derivado da psicologia experimental, baseia-se na ideia de que um evento não é negativo por si só, mas que as emoções causadas por ele dependem da avaliação cognitiva do indivíduo (KATO *et al.*, 2016).

O desamparo aprendido é o estado de percepção do total descontrole e impossibilidade de escapar do evento estressor. Tal fato fortalece mais a visão de ambiente hostil e reafirma a alta validade preditiva deste modelo animal de depressão (GURURAJAN *et al.*, 2019). A indução do desamparo aprendido em roedores gera um modelo com fenótipos comportamentais análogos a oito dos nove sintomas descritos no DSM-V necessários ao diagnóstico da depressão em humanos, à exceção da ideia suicida. Comportamentos como atividade motora diminuída, perda de peso, sono alterado, motivação sexual reduzida e aumento da concentração dos hormônios do estresse podem ser observados nos animais submetidos a este modelo (HAO *et al.*, 2019; LANDGRAF *et al.*, 2015).

Duas características importantes dos comportamentos induzidos por esse modelo são que eles resultam da natureza incontrolável ou inescapável da experiência aversiva, mas não da própria experiência em si e são independentes do contexto, característica denominada trans-situacionalidade. Geralmente, são comportamentos transitórios, mas podem ser prolongados pela reexposição ao contexto do estressor original, mesmo na ausência dele (GURURAJAN *et al.*, 2019; VOLLMEYER; GASS, 2013).

No paradigma do desamparo aprendido, os animais são submetidos ao procedimento de condicionamento, empregando-se algum tipo de estresse imprevisível e incontrolável, como, por exemplo, choque elétrico aplicado nas patas (Figura 1). Os animais previamente expostos ao estressor inevitável mostram habilidades reduzidas para escapar, nesse modelo. Tal comportamento é revertido pelos antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e inibidores da enzima monoaminoxidase (MAO). Trata-se de um modelo que apresenta boa validade preditiva, o que o torna adequado para investigar a etiologia da depressão e pesquisar novos compostos com efeito antidepressivo (CHOURBAJI *et al.*, 2005; HAO *et al.*, 2019).

Figura 1 – Representação esquemática do aparato utilizado no teste de desamparo aprendido



Fonte: Próprios autores (2020).

Dentre as vantagens desse paradigma, destacam-se a manifestação de sintomas que se assemelham à depressão em humanos, facilidade de estudo de variações genéticas e a correlação óbvia em roedores entre comprometimento cognitivo e comportamento causada pela disfunção do sistema nervoso autônomo, o que fornece um modelo de investigação de circuitos nervosos no decurso do início da depressão. As desvantagens incluem questões relacionadas aos critérios subjetivos

que têm impacto nos resultados comportamentais, além da necessidade de equipamento especializado e protocolos complexos (GURURAJAN *et al.*, 2019; LANDGRAF *et al.*, 2015).

2.2 Nado forçado

O teste do nado forçado, originalmente descrito por Porsolt, Le Pichion e Jalfre (1977), é, atualmente, o modelo animal de depressão mais utilizado em laboratórios na triagem de possíveis fármacos com atividade antidepressiva. A ampla utilização desse paradigma está relacionada, entre outros fatores, ao seu baixo custo, à simplicidade da metodologia e sua curta duração. Em relação às desvantagens, a validade e a interpretação dos comportamentos locomotores são, muitas vezes, questionadas, visto que estudos indicam sensibilidade à variação genética dos animais, diferenças em relação ao sexo e fatores ambientais (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013; CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005; KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019).

O teste original consistia na exposição de ratos a duas sessões de nado realizadas em um cilindro de 15 a 18 cm de altura, contendo água. Na etapa denominada de pré-teste, o animal era mantido no cilindro por um período de 15 minutos. Na segunda etapa, o teste propriamente dito, o animal era reexposto à mesma situação 24 horas após o primeiro contato, por um período de 5 minutos. Apenas o comportamento de imobilidade era avaliado durante o teste (PORSOLT; LE PICHION; JALFRE, 1977). Com o passar dos anos, modificações foram realizadas nesse teste, visando à sua melhor compreensão. Entre as alterações realizadas, está o aumento na profundidade da água, utilizando-se um cilindro de 25-30 cm de altura, cujo objetivo foi tornar o animal mais ativo e não promover o desenvolvimento de adaptações comportamentais. Além disso, comportamentos ativos, como a natação e a escalada, foram incluídos na análise do teste (BOGDANOVA *et al.*, 2013; HARRO, 2019).

Assim, os comportamentos analisados no teste do nado forçado são: a imobilidade, quando não há nenhuma atividade adicional além da necessária para manter a cabeça fora da água; a natação, que corresponde a movimentos usualmente horizontais através do tanque, incluindo o de cruzar os quadrantes do cilindro e, a escalada, que consiste em movimentos das patas dianteiras para cima, direcionados predominantemente para as paredes do cilindro (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002). O comportamento de imobilidade é considerado um parâmetro de depressão nesse modelo e é interpretado como desespero comportamental ou humor depressivo, situação na qual os animais desistem de tentar escapar quando são confrontados com uma situação de estresse inevitável. No protocolo original, o tempo total de imobilidade é analisado durante os 5 minutos do teste (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013; PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005).

Ademais, na avaliação da atividade antidepressiva de uma determinada substância, é de praxe administrá-la aos animais entre o pré-teste e o teste e a análise do comportamento animal é realizada na sessão teste (BOGDANOVA *et al.*, 2013; PORSOLT; LE PICHION; JALFRE, 1977).

2.3 Estresse crônico leve

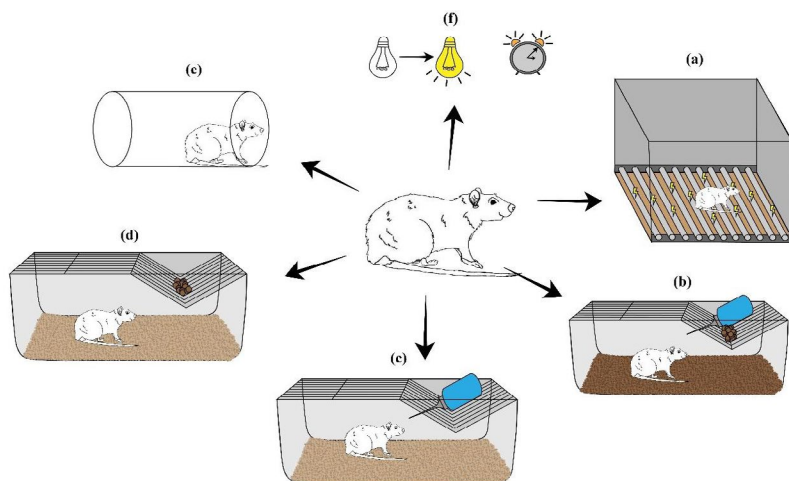
Consiste em um dos modelos de depressão mais extensivamente validados e realistas. Esse paradigma simula respostas comportamentais semelhantes às observadas em pacientes com transtorno depressivo, como a anedonia em humanos ou comportamento anedônico em animais. Em modelos experimentais, a anedonia ou a insensibilidade ao reforço, é uma característica comportamental similar à perda de interesse ou prazer e aos sintomas de melancolia apresentados por pacientes com depressão (KATZ; HERSH, 1981; WILLNER *et al.*, 1987; YIN; GUVEN; DIETIS, 2016).

Nesse modelo animal, os déficits comportamentais são induzidos por um período de três a nove semanas, com a aplicação de uma variedade de estressores imprevisíveis, de maneira semialeatória e intercalada por vários intervalos, o que dificulta o desenvolvimento de mecanismos de adaptação geralmente observados com a aplicação contínua de um único estressor. Além disso, há o desenvolvimento de mudanças comportamentais como a diminuição da resposta a recompensas, um correlato comportamental do principal sintoma clínico da depressão, a anedonia (WILLNER, 2017).

O estresse crônico leve pode ser induzido por uma série de estressores, como choque elétrico, caminhada no gelo, corte na cauda, maravalha suja, ou sua ausência, e privação de água ou comida (Figura 2). Esses estressores são aplicados diariamente, conforme um protocolo experimental definido e, ao final, são realizados testes comportamentais, como o campo aberto e o de consumo e preferência por sacarose (CZÉH *et al.*, 2015; HAO *et al.*, 2019).

A sensibilidade à recompensa, ou anedonia, é avaliada por testes periódicos em que o animal tem acesso a uma solução adocicada, geralmente de sacarose e água pura. A redução do consumo dessa solução é interpretada como um comportamento semelhante à anedonia, um sintoma clássico da depressão (SÖDERLUND; LINDSKOG, 2018; WANG *et al.*, 2017). A preferência pela solução de sacarose diminui ao longo das semanas em que ela é ofertada, mas pode ser revertida pelo tratamento crônico com fármacos antidepressivos.

Figura 2 – Representação esquemática dos tipos de estressores que podem ser utilizados em protocolos de indução de estresse crônico leve em roedores: (a) choque nas patas; (b) utilização de maravalha suja ou úmida; (c) privação de alimento (ração); (d) privação de água, (e) estresse de contenção e (f) inversão do ciclo claro/escuro



Fonte: Próprios autores (2020).

A principal vantagem do modelo de estresse crônico leve é a exibição de respostas comportamentais duradouras, o que permite a investigação da administração a longo prazo de substâncias antidepressivas. Soma-se, ainda, a validade de face, pois esse modelo não apenas simula os sintomas clínicos da depressão em humanos, mas também enfatiza a anedonia como uma característica crucial e mensurável. No que se refere às suas limitações, a exposição prolongada ao estresse representa uma dificuldade à aprovação dos protocolos experimentais por comissões de ética para o uso de animais. Ademais, os experimentos são de duração longa e os múltiplos protocolos de alta frequência empregados nesse modelo requerem a participação de um número maior de pesquisadores ou técnicos, além de amplo espaço para a execução dos ensaios (HAO *et al.*, 2019; WILLNER, 2017; YIN; GUVEN; DIETIS, 2016).

2.4 Estresse social (separação materna)

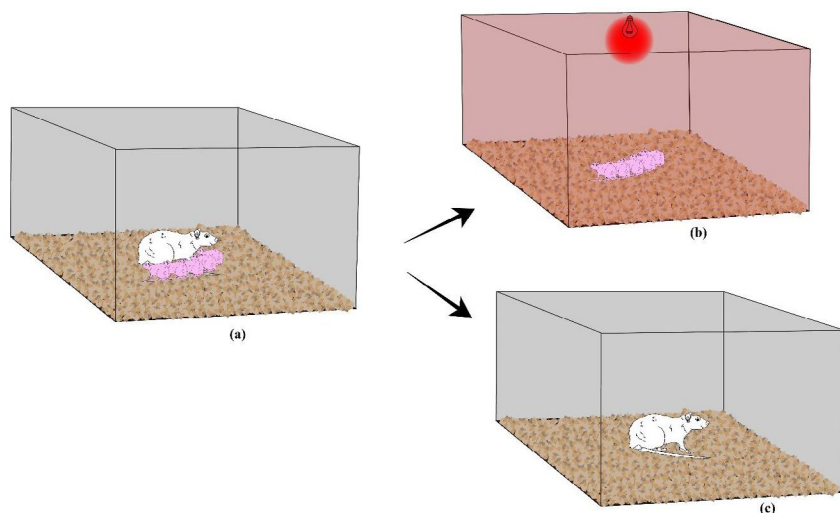
Todos os mamíferos recém-nascidos são cuidados por suas mães e mantêm um estreito contato com elas por um significativo período de tempo. Durante esse período, ocorrem interações complexas que desempenham um importante papel no desenvolvimento emocional e cognitivo da prole (BENETTI *et al.*, 2009; ORSO *et al.*, 2018).

Em roedores, o ambiente é modulado pelos cuidados maternos e as variações dessas condições podem interferir no desenvolvimento normal dos filhotes. As duas primeiras semanas de vida constituem um período crítico para o desenvolvimento neural e maturação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Esse período é conhecido como hiporresponsivo ao estresse e se estende do dia pós-natal (DPN) 4 ao 14 em ratos e DPN 2 ao 12 em camundongos (GOODWILL *et al.*, 2018; NISHI *et al.*, 2013; SAPOLSKY; MEANEY, 1986). Consequentemente, qualquer alteração na condição normal de criação atua sobre o desenvolvimento do sistema nervoso e induz a uma variedade de mudanças neuroquímicas e comportamentais na adolescência e na vida adulta (RANA *et al.*, 2015).

A separação materna em roedores, quando realizada durante algumas horas por dia, representa um dos mais potentes estressores naturais para a prole (ORSO *et al.*, 2018; SHU *et al.*, 2015). Compara-se aos maus-tratos ou negligência dos pais durante a infância nos seres humanos, aos conflitos familiares e até mesmo à perda dos progenitores (TEICHER *et al.*, 2016). O procedimento de separação materna, como um modelo de intervenção precoce, consiste na remoção da mãe ou dos filhotes do ninho por período de tempo maior que o utilizado no comportamento de forrageio da progenitora (Figura 3). Esse protocolo pode utilizar uma privação única (geralmente 24 horas) (LLORENTE *et al.*, 2007; MARKOVIC *et al.*, 2014) ou privações periódicas, variando-se a frequência e o momento do período pós-natal em que é realizada (BAI *et al.*, 2014;

BENETTI *et al.*, 2009). Estudos pré-clínicos têm mostrado que a extensão das consequências adversas à prole depende do período de vida em que ocorre a separação materna e da duração dessa intervenção (AISA *et al.*, 2008; TRACTENBERG *et al.*, 2016).

Figura 3 – Representação esquemática do protocolo de separação materna em roedores: (a) progenitora e seus filhotes na caixa moradia; (b) filhotes separados da mãe, mantidos na caixa moradia sob luz incandescente vermelha para manutenção da temperatura corporal entre 30 a 32 °C e (c) progenitora separada da ninhada durante o período do teste



Fonte: Próprios autores (2020).

2.5 Estresse social (isolamento)

A manutenção da saúde mental e física humana depende da interação social e de vínculos interpessoais que são construídos durante a vida. Nesse sentido, a falta de convivência com outros indivíduos pode resultar em maior risco de deterioração cognitiva, desordens neuronais e síndromes metabólicas (MUMTAZ *et al.*, 2018).

O isolamento social atua como um estressor que promove alterações fisiológicas, anatômicas, comportamentais e nos sistemas de

neurotransmissão em animais e humanos (FISHER *et al.*, 2012; GÓMEZ-GALÁN *et al.*, 2016). No que se refere às várias alterações desencadeadas pela exposição ao estresse de isolamento social, elas incluem: a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e a liberação de glicocorticoides; a ativação do sistema simpatoadrenomedular e a liberação de catecolaminas (GRIPPO *et al.*, 2007; MORA-GALLEGOS; FORNAGUERA, 2019).

O estresse de isolamento social foi descrito por Hatch e colaboradores (1965) como um modelo capaz de causar importantes alterações neuroendócrinas e comportamentais. Esse modelo não farmacológico tem sido amplamente utilizado em estudos com roedores como uma ferramenta para induzir a condições experimentais semelhantes à depressão (FISHER *et al.*, 2012; OKUDAN; BELVIRANLI, 2017).

O protocolo experimental de isolamento social baseia-se na interrupção do convívio familiar de animais. De maneira simplificada, consiste na remoção do animal da caixa ou gaiola familiar para uma individual, que é geralmente mantida em uma sala separada do biotério como forma de distanciamento dos cheiros e sons habituais. A duração do isolamento social pode variar de duas a cinco semanas, até dois meses, e o período de exposição a esse tipo de estresse pode ser o pós-natal, adolescência ou vida adulta (FISHER *et al.*, 2012; GRIPPO *et al.*, 2008; MUMTAZ *et al.*, 2018; SHOJI; MIZOGUCHI, 2011).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Idealmente, modelar a depressão visa recriar o processo etiológico em animais, replicando não apenas fenótipos individuais específicos de interesse, mas um espectro mais amplo de características neurais e comportamentais da desordem em questão. Um modelo por si só não é uma replicação perfeita da condição estudada, porque nem todos os critérios podem ser atendidos. Assim, uma combina-

ção de diferentes modelos animais de depressão escolhidos e avaliados em relação à condição de interesse que se deseja estudar, seja ela farmacológica, genética ou comportamental, torna-se uma maneira mais completa e precisa de abordagem experimental.

REFERÊNCIAS

ABELAIRA, H. M.; RÉUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, suppl 2, p. 112-120, 2013.

AISA, B.; TORDERA, R.; LASHERAS, B.; DEL RÍO, J.; RAMÍREZ, M. J. Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. **Neuroscience**, v. 154, n. 4, p. 1218-1226, 2008.

BAI, M.; ZHANG, L.; ZHU, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, S.; XUE, L. Comparison of depressive behaviors induced by three stress paradigms in rats. **Physiology & Behavior**, v. 131, p. 81-86, 2014.

BENETTI, F.; MELLO, P. B.; BONINI, J. S.; MONTEIRO, S.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. Early postnatal maternal deprivation in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 59-64, 2009.

BLOOM, D. E.; CAFIERO, E. T.; JANÉ-LLOPIS, E.; ABRAHAMS-GESSEL, S.; BLOOM, L. R.; FATHIMA, S.; FEIGL, A. B.; GAZIANO, T.; MOWAFI, M.; PANDYA, A.; PRETTNER, K.; ROSENBERG, L.; SELIGMAN, B.; STEIN, A. Z.; WEINSTEIN, C. The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases. **World Economic Forum**. Geneva, 2011.

BOGDANOVA, O. V.; KANEKAR, S.; D'ANCI, K. E.; RENSHAW, P. F. Factors influencing behavior in the forced swim test. **Physiology & Behavior**, v. 118, p. 227-239, 2013.

CHEN, S.; KUHN, M.; PRETTNER, K.; BLOOM, D. E. The macroeconomic burden of noncommunicable diseases in the United States: Estimates and projections. **PLoS One**, v. 13, n. 11, p. 1-14, 2018.

CHOURBAJI, C. Z.; ZACHER, C.; SANCHIS-SEGURA, C.; DORMANN, C.; VOLLMAYR, B.; GASS, P. Learned helplessness: validity and reliability of depressive-like states in mice. **Brain Research**, v. 16, p. 70-78, 2005.

CZÉH, B.; FUCHS, E.; WIBORG, O.; SIMON, M. Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 64, p. 293-310, 2015.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238-45, 2002.

CRYAN, J.F.; VALENTINO, R.J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 547-569, 2005.

DALLA, C.; PITYCHOUTIS, P. M.; KOBAS, N.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, p. 226-233, 2009.

DEMIN, K. A.; SYSOEX, M.; CHERNYSH, M. V.; SAVVA, A. K.; KOSHIBA, M.; WAPPLER-GUZZETTA, E. A.; SONG, C.; ABREU, M. S.; LEONARD, B.; PARKER, M. O.; HARVEY, B. H.; TIAN, T.; VASAR, E.; STREKALOVA, T.; AMSTISLAVSKAYA, T. G.; VOLGIN, A. D.; ALPYSHOV, E. T.; WANG, D.; KALUEFF, A. V. Animal models of major depressive disorder and the implications for drug discovery and development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 4, p. 1-14, 2019.

DUMAN, C. Models of depression. *In*: LITWACK, G. **Vitamins and Hormones**. California: Academic Press, 2010. cap. 1, p. 1-21.

DSM-V. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. American Psychiatric Association. Porto Alegre: Artmed, 2014.

FELGER, J. C.; LOTRICH, F. E. Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications. **Neuroscience**, v. 246, p. 199-229, 2013.

FISHER, C. W.; LIEBENBERG, N.; ELFVING, B.; LUND, S.; WEGENER, G. Isolation-induced behavioural changes in a genetic animal model of depression. **Behavioural Brain Research**, v. 230, p. 85-91, 2012.

GBD – Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet**, v. 392, p. 1789-1858, 2018.

GÓMEZ-GALÁN, M.; FEMENÍA, T.; ABERG, E.; GRAAE, L.; EECKHAUT, A. V.; SMOLDERS, I.; BRENÉ, S.; LINDSKOG, M. Running Opposes the Effects of Social Isolation on Synaptic Plasticity and Transmission in a Rat Model of Depression. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1-11, 2016.

GOODWILL, H. L.; MANZANO-NIEVES, G.; GALLO, M.; LEE, H.; OYERINDE, E.; SERRE, T.; BATH, K. G. Early life stress leads to sex differences in development of depressive-like outcomes in a mouse model. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 4, p. 711-720, 2018.

GRIPPO, A. J.; GERENA, D.; HUANG, J.; KUMAR, N.; SHAH, M.; UGHREJA, R.; CARTER, C. S. Social isolation induces behavioral and neuroendocrine disturbances relevant to depression in female and male prairie voles. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, p. 966-980, 2007.

GRIPPO, A. J.; WU, K. D.; HASSAN, I.; CARTER, C. S. Social isolation in prairie voles induces behaviors relevant to negative affect: toward the development of a rodent model focused on co-occurring depression and anxiety. **Depression and Anxiety**, v. 25, p. 17-26, 2008.

GURURAJAN, A.; REIF, A.; CRYAN, J. F.; SLATTERY, D. A. The future of rodent models in depression research. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, p. 686-701, 2019.

HAO, Y.; GE, H.; SUN, M.; GAO, Y. Selecting an appropriate animal model of depression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, 4827, 2019.

HARRO, J. Animal models of depression: pros and cons. **Cell and Tissue Research**, v. 377, p. 5-20, 2019.

HATCH, A. M.; WIBERG, G. S.; ZAWIDZKA, Z.; CANN, M.; AIRTH, J. M.; GRICE, H. C. Isolation syndrome in the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 7, p. 737-745, 1965.

KATO, T.; KASAHARA, T.; KUBOTA-SAKASHITA, M.; KATO, T. M.; NAKAJIMA, K. Animal models of recurrent or bipolar depression. **Neuroscience**, v. 321, p. 189-196, 2016.

KATZ, R. J.; HERSH, S. Amitriptyline and scopolamine in an animal model of depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 5, n. 2, p. 265-271, 1981.

KESSLER, R. C.; BROMET, E. J. The epidemiology of depression across cultures. **Annual Review of Public Health**, v. 34, p. 119-38, 2013.

KRAEUTER, A.K.; GUEST, P.C.; SARNYAI, Z. The Forced Swim Test for Depression-Like Behavior in Rodents. In: GUEST, P. (Ed.). **Pre-Clinical Models. Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press, 2019. p.75-80.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008.

LANDGRAF, D.; LONG, J.; DER-AVAKIAN, A.; STREETS, M.; WELSH, D. K. Dissociation of learned helplessness and fear conditioning in mice: a mouse model of depression. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. 1-17, 2015.

LLORENTE, R.; ARRANZ, L.; MARCO, EM.; MORENO, E.; PUERTO, M.; GUAZA, C.; DE LA FUENTE, M.; VIVEROS, MP. Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmuneendocrine effects in adolescent rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 6, p. 636-650, 2007.

LLOYD, R. B.; NEMEROFF, C. B. The role of corticotropin-releasing hormone in the pathophysiology of depression: therapeutic implications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 609-617, 2011.

LUSCHER, B.; SHEN, Q.; SAHIR, N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. **Journal of Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 4, p. 383-406, 2011.

MA, L.; XU, Y.; WANG, G.; LI, R. What do we know about sex differences in depression: A review of animal models and potential mechanisms. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 89, p. 48-56, 2019.

MAIER, S. F.; SELIGMAN, M. E. P. Learned helplessness – theory and evidence. **Journal of Experimental Psychology: General**, v. 105, p. 3-46, 1976.

MARCO, E. M.; LLORENTE, R.; LÓPEZ-GALLARDO, M.; MELA, V.; LLORENTE-BERZAL, A.; PRADA, C.; VIVEROS, MP. The maternal deprivation animal model revisited. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 51, p. 151-163, 2015.

MARKOVIC, B.; RADONJIC, N. V.; AKSIC, M.; FILIPOVIC, B.; PETRONIJEVIC, N. Long-term effects of maternal deprivation on cholinergic system in rats brain. **Biomed Research International**, 636574, 2014. Disponível em: <https://downloads.hindawi.com/journals/bmri/2014/636574.pdf>. Acesso em: 10 set. 2020.

MAYER, E. A.; KNIGHT, R.; MAZMANIAN, S. K.; CRYAN, J. F.; TILLISCH, K. Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 46, p. 15490-15496, 2014.

MINAMI, S.; SATOYOSHI, H.; IDE, S.; INOUE, T.; YOSHIOKA, M.; MINAMI, M. Suppression of reward-induced dopamine release in the nucleus accumbens in animal models of depression: differential responses to drug treatment. **Neuroscience Letters**, v. 650, p. 72-76, 2017.

MORA-GALLEGOS, A.; FORNAGUERA, J. The effects of environmental enrichment and social isolation and their reversion on anxiety and fear conditioning. **Behavioural Processes**, v. 158, p. 59-69, 2019.

MUMTAZ, F.; KHAN, M. I.; ZUBAIR, M.; DEHPUR, A. R. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model – A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 1205-1222, 2018.

McARTHUR, R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 84, p. 436-452, 2006.

McCARLTHY, D. J.; ALEXANDER, R.; SMITH, M. A.; PATHAK, S.; KANES, S.; LEE, CM.; SANACORA, G. Glutamate-based depression GBD. **Medical Hypotheses**, v. 78, n. 5, p. 675-681, 2012.

NISHI, M.; HORII-HAYASHI, N.; SASAGAWA, T.; MATSUNAGA, W. Effects of early life stress on brain activity: implications from maternal separation model in rodents. **General and Comparative Endocrinology**, v. 181, p. 306-309, 2013.

OKUDAN, N.; BELVIRANLI, M. Long-term voluntary exercise prevents post-weaning social isolation-induced cognitive impairment in rats. **Neuroscience**, v. 30, n. 360, p. 1-8, 2017.

ORSO, R.; WEARICK-SILVA, L. E.; CREUTZBERG, K. C.; CENTENO-SILVA, A.; ROITHMANN, L. G.; PAZZIN, R.; TRACTENBERG, S. G.; BENETTI, F.; GRASSI-OLIVEIRA, R. Maternal behavior of the mouse dam toward pups: implications for maternal separation model of early life stress. **Stress**, v. 21, n. 1, p. 19-27, 2018.

PARIANTE, C. M.; LIGHTMAN, S. L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trend in Neurosciences**, v. 31, p. 464-468, 2008.

PATEL, D.; KAS, M. J.; CHATTARJI, S.; BUWALDA, B. Rodent models of social stress and neuronal plasticity: relevance to depressive-like disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 369, 111900, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111900>. Acesso em: 13 set. 2020.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v. 177, p. 245-255, 2005.

PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Molecular Brain Research**, v. 18, p. 195-200, 1993.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-732, 1977.

RANA, S.; PUGH, P. C.; JACKSON, N.; CLINTON, S. M.; KERMAN, I. A. Inborn stress reactivity shapes adult behavioral consequences of early-life maternal separation stress. **Neuroscience Letters**, v. 584, p. 146-150, 2015.

ROSENBLAT, J. D.; CHA, D. S.; MANSUR, R. B.; MCINTYRE, R. S. Inflamed moods: a review of the interactions between inflammation and mood disorders. **Biological Psychiatry**, v. 53, p.23-34, 2014.

SAPOLSKY, R. M.; MEANEY, M. J. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. **Brain Research**, v. 396, n. 1, p. 64-76, 1986.

SCHMIDT, M. V. Animal models for depression and the mismatch hypothesis of disease. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, p. 330-338, 2011.

SHOJI, H.; MIZOGUCHI, K. Aging-related changes in the effects of social isolation on social behavior in rats. **Physiology & Behavior**, v. 102, p. 58-62, 2011.

SHU, C.; XIAO, L.; TANG, J.; WANG, G.; ZHANG, X.; WANG, X. Blunted behavioral and molecular responses to chronic mild stress in adult rats with experience of infancy maternal separation. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 235, n. 2, p. 81-87, 2015.

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Modelling depression in animals: at the interface of reward and stress pathways. **Psychopharmacology**, v. 234, p. 1451-1465, 2017.

SÖDERLUND, J.; LINDSKOG, M. Relevance of rodent models of depression in clinical practice: can we overcome the obstacles in translational neuropsychiatry? **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 7, p. 668-676, 2018.

TEICHER, M.; SAMSON, J. A.; ANDERSON, C. M.; OHASHI, K. The effects of childhood maltreatment on brain structure, function and connectivity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 652-666, 2016.

TRACTENBERG, S. G.; LEVANDOWSKI, M. L.; AZEREDO, L. A.; ORSO, R.; ROITHMANN, L. G.; HOFFMANN, E. S.; BRENHOUSE, H.; GRASSI-OLIVEIRA, R. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 69, p. 489-503, 2016.

VOLLMAYR, B.; GASS, P. Learned helplessness: unique features and translational value of a cognitive depression model. **Cell Tissue Research**, v. 354, n. 1, p. 171-178, 2013.

WANG, Q.; TIMBERLAKE, M. A.; PRALL, K.; DWIVEDI, Y. The recent progress in animal models of depression. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 77, p. 99-109, 2017.

WHO – World Health Organization. **Depression and other common mental disorders: global health estimates**, 2017. Disponível em: https://www.who.int/mental_health/management/depression/prevalence_global_health_estimates/en/. Acesso em: 10 out. 2020.

WHO – World Health Organization. Depression. Post by Former NIMH Director Thomas Insel. **The Global Cost of Mental Illness**. Disponível em: <https://www.nimh.nih.gov/about/directors/thomas-insel/blog/2011/the-global-cost-of-mental-illness.shtml>. Acesso em: 19 set. 2020.

WILLNER, P.; TOWELL, A.; SAMPSON, D.; SOPHOKLEOUS, S.; MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, p. 358-364, 1987.

WILLNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: history, evaluation and usage. **Neurobiology of Stress**, v. 6, p. 78-93, 2017.

YIN, X.; GUVEN, N.; DIETIS, N. Stress-based animal models of depression: do we actually know what we are doing? **Brain Research**, v. 1652, p. 30-42, 2016.



Capítulo 2

TESTES COMPORTAMENTAIS UTILIZADOS EM PESQUISA PRÉ-CLÍNICA

A importância dos modelos animais de ansiedade¹

KAMILA SOUTO LEICHTWEIS
PATRÍCIA PAULA DA SILVA XAVIER
VANESSA CRISTIANE SANTANA AMARAL

1 INTRODUÇÃO

Na pesquisa pré-clínica, os modelos animais são uma ferramenta importante para o estudo dos aspectos comportamentais e fisiológicos associados a algumas psicopatologias, como, por exemplo, os transtornos de ansiedade. Nesse sentido, os modelos animais de ansiedade têm sido muito utilizados para avaliar os mecanismos neurobiológicos associados a essa psicopatologia e têm contribuído para o desenvolvimento de novos fármacos ansiolíticos (FERREIRA, 2010; TOVOTE; FADOK; LUTHI, 2015; PADURARIU *et al.*, 2017).

A ansiedade é uma das emoções mais primitivas observadas nos seres humanos. De acordo com registros históricos, séculos antes de Cristo já existiam descrições clínicas do quadro de ansiedade (CROCQ, 2015). Além disso, na Grécia Antiga (século IV a.C.), Hipócrates, considerado pai da medicina, relatou casos de

1 Capítulo vinculado ao projeto de pesquisa “Alterações endócrinas, comportamentais e neurais em ratos expostos ao estresse neonatal: influência do gênero e da idade”, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG). Programa Primeiros Projetos (PPP) – Chamada 03/2015. Processo n. 201610267001023.

fobias que deveriam ser tratados como casos médicos (SMITH, 1994). No entanto, foi apenas em meados do século XIX que os transtornos de ansiedade foram considerados uma patologia, visto que, quando se manifestam de forma exacerbada, causam prejuízos psicológicos e interferem no desempenho de atividades diárias e na qualidade de vida do indivíduo (CROCQ, 2015).

Os transtornos de ansiedade têm se tornado cada vez mais prevalentes. Em um intervalo de 23 anos (1990 a 2013), o número de pessoas diagnosticadas com depressão e/ou ansiedade aumentou cerca de 50%, isto é, de 416 milhões, foi para 615 milhões de pessoas, o que representa, aproximadamente, 10% da população mundial (WHO, 2018). No Brasil, estima-se que os transtornos de ansiedade acometem, em média, 9% da população (BRASIL, 2017).

Os transtornos de ansiedade têm, como características de base, a ansiedade e o medo excessivos. O Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais na sua 5ª edição (DSM-V) distingue essas emoções como sendo:

“*Medo* é a resposta emocional à ameaça iminente real ou percebida, enquanto *ansiedade* é a antecipação de ameaça futura. Obviamente, esses dois estados se sobrepõem, mas também se diferenciam, com o medo sendo com mais frequência associado a períodos de excitabilidade autonômica aumentada, necessária para luta ou fuga, pensamentos de perigo imediato e comportamentos de fuga, e a ansiedade sendo mais frequentemente associada a tensão muscular e vigilância em preparação para perigo futuro e comportamentos de cautela ou esquiva (DSM-V, 2014)”.

Os transtornos de ansiedade diferem quanto aos comportamentos, sintomas físicos e cognitivos apresentados pelos indivíduos, conforme mostra o Quadro 1.

Capítulo 2

TESTES COMPORTAMENTAIS EM PESQUISA PRÉ-CLÍNICA

Quadro 1 – Classificação dos principais transtornos de ansiedade segundo o DSM-5

Transtorno	Principais características
Transtorno de ansiedade de separação	Quando o indivíduo fica ansioso ou apreensivo em relação à separação de casa ou de figuras de apego, de forma que prejudica seu desenvolvimento.
Mutismo seletivo	Quando o indivíduo, em ocasiões sociais, onde tem perspectiva de fala, como na escola, adota uma oratória de fracasso consistente, acarretando consequências negativas nas conquistas profissionais, acadêmicas ou comunicação social.
Transtorno de ansiedade com fobia específica	Indivíduos ansiosos, apreensivos ou que evitam objetos ou situações, por exemplo, animais, coleta de sangue, ambiente natural.
Transtorno de ansiedade social (fobia social)	Quando o indivíduo fica ansioso, sente medo ou evita situações e interações sociais em que está sujeito a ser avaliado por outras pessoas.
Transtorno de pânico	O indivíduo vivencia, com frequência, ataques de pânico repentinos e está sempre temeroso ou preocupado em ter novos ataques.
Agorafobia	O indivíduo fica ansioso e apreensivo por achar que pode ser difícil esquivar-se de duas ou mais das seguintes situações: estar em espaços abertos; ficar em uma fila ou estar no meio de uma multidão; usar transporte público; estar fora de casa sozinho em outras situações; ou estar em lugares fechados.
Transtorno de ansiedade generalizada	O indivíduo apresenta ansiedade e preocupação excessivas e persistentes por, pelo menos, seis meses. Além disso, pode apresentar alguns sintomas físicos, como inquietação, irritabilidade, dificuldade de concentração, tensão muscular, distúrbio do sono e cansaço.

Fonte: Adaptado de DSM-5 (2014).

O objetivo deste capítulo é abordar aspectos metodológicos necessários à compreensão do uso de modelos animais de ansie-

dade nas pesquisas pré-clínicas, bem como destacar a importância desses paradigmas na avaliação do potencial terapêutico de novos compostos ansiolíticos.

2 MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE

A utilização de modelos animais apresenta algumas limitações relacionadas à forma simplificada de como modelam condições clínicas complexas. Entretanto, eles auxiliam na compreensão dos mecanismos neurobiológicos das psicopatologias e no desenvolvimento de novos fármacos e, portanto, possuem grande valor heurístico (GRILLON *et al.*, 2019).

Os modelos animais de ansiedade podem ser divididos em dois principais grupos: modelos baseados em aprendizagem associativa e modelos baseados em medo inato ou etologicamente fundamentados. Muitos modelos animais de ansiedade envolvem processos de aprendizagem associativa e são baseados no condicionamento clássico (Pavloviano) e/ou operante (Skinneriano) do medo. Entre os modelos baseados em aprendizagem associativa, estão a resposta emocional condicionada, o sobressalto potencializado pelo medo, o teste de conflito do beber punido e punição de pressão à barra (ZANGROSSI JR., 1997).

Com o objetivo de induzir, nos animais, a exibição de comportamentos naturais da espécie, foram desenvolvidos os modelos etológicos (BOURIN, 2015; CAMPOS *et al.*, 2013; PADURARIU *et al.*, 2017). Esses modelos usam estímulos que desencadeiam respostas inatas de medo em diferentes espécies animais. No caso de roedores, isso é possível expondo-os a ambientes novos, a seus predadores naturais ou confrontando-os com animais da mesma espécie (PADURARIU *et al.*, 2017). As respostas fisiológicas ativadas e os padrões de comportamentos exibidos frente a esses estímulos são utilizados como parâmetros de ansiedade e, geralmente,

apresentam similaridade com os sintomas observados em humanos (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Os modelos etológicos oferecem várias vantagens em relação aos de aprendizagem associativa, pois não empregam estímulos nocivos, como choques elétricos e privação de água ou de alimentos, não requisitam o treino do animal e, além disso, o custo operacional é baixo (ZANGROSSI JR., 1997).

Dentre os modelos etológicos consagrados para a avaliação das propriedades ansiolíticas, destacam-se: o labirinto em cruz elevado (LISTER, 1987; PELLOW *et al.*, 1985), labirinto em “T” elevado (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI JR., 1998), campo aberto (HALL, 1934), interação social (FILE; HYDE, 1978, 1979) e o teste de transição claro-escuro (CRAWLEY; GOODWIN, 1980).

2.1 Teste do labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos modelos animais mais utilizados na triagem de potenciais substâncias que apresentem efeito ansiolítico, assim como no estudo do substrato neural dos transtornos de ansiedade (CORTESE; PHAN, 2005; ENNACEU; CHAZOT, 2016).

O teste baseia-se no conflito gerado quando os roedores (ratos ou camundongos) são expostos a condições naturalmente aversivas, como espaços abertos e altura (HANDLEY; MITHANI, 1984; LISTER, 1987; MONTGOMERY, 1955; PELLOW *et al.*, 1985). O primeiro aparato para o estudo da ansiedade foi introduzido por Montgomery (1955), que utilizou um labirinto em forma de “Y” e observou que ratos exploravam muito mais os braços fechados que os abertos. Posteriormente, Handley e Mithani (1984) desenvolveram o labirinto em cruz elevado (LCE) e descreveram a avaliação do comportamento de ansiedade de roedores usando a proporção de tempo gasto nos braços abertos em relação ao tempo gasto nos braços fechados. O aparato foi elaborado em forma de “X”, com

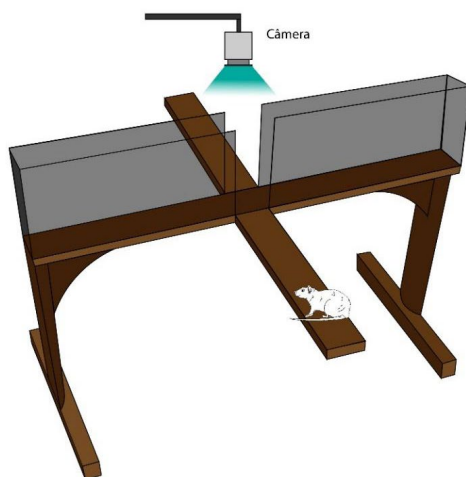
dois braços abertos unidos ortogonalmente a outros dois braços fechados com paredes laterais, todos do mesmo tamanho (45 cm de comprimento x 10 cm de largura) elevado a 70 cm do chão e duração do teste era de 10 minutos.

Em 1985, Pellow e colaboradores, após algumas modificações nas dimensões do aparato e tempo do teste, validaram o modelo farmacologicamente, fisiologicamente e comportamentalmente para o estudo da ansiedade. O LCE consiste em um aparato com dois braços abertos unidos ortogonalmente a outros dois braços fechados com paredes laterais, todos do mesmo tamanho (50 cm de comprimento x 10 cm de largura). Os braços encontram-se elevados a 40 cm do solo e, no local em que se cruzam, perpendicularmente formando uma cruz, delimitam uma área central de 10 x 10 cm (Figura 1) (PELLOW *et al.*, 1985).

Os parâmetros de ansiedade analisados no LCE compreendem a frequência de entrada nos braços abertos e fechados (a entrada em um braço é definida pelo cruzamento com as quatro patas para dentro do braço) e a duração do tempo gasto nesses compartimentos e na plataforma central (PELLOW *et al.*, 1985).

Durante o teste, os roedores são colocados na intersecção dos quatro braços do LCE, com a cabeça voltada para um dos braços abertos e os comportamentos são gravados por 5 minutos. O animal depara-se com um conflito entre a tendência natural em explorar novos espaços e evitar as situações adversas que possam existir numa área aberta, estreita, elevada e luminosa (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW *et al.*, 1985). Há, portanto, um conflito entre a preferência do roedor pelas áreas protegidas (centro e braços fechados) e a sua motivação inata para explorar novos ambientes (WALF; FRYE, 2007).

Figura 1 – Representação esquemática do labirinto em cruz elevado (LCE)



Fonte: Próprios autores (2020).

Os parâmetros comportamentais avaliados nesse teste compreendem as medidas espaço-temporais e complementares. As primeiras medidas referem-se à frequência de entradas nos braços fechados, porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos. As medidas etológicas complementares são constituídas pela frequência de exibição dos comportamentos de mergulho (do inglês *head dipping*: movimento exploratório da cabeça em direção ao chão) e avaliação de risco. Entre os comportamentos de avaliação de risco analisados, estão o *stretch attend postures* (SAP), que compreende uma postura exploratória em que o corpo se estica para a frente, em seguida, recolhe-se para a posição original, sem qualquer locomoção para frente, e o *flatback approach*, que corresponde ao movimento de andar com o ventre encostado na superfície do aparato (andar rastejando). Além disso, os braços fechados e a plataforma central foram, juntos, designados “área protegida”, isto é, que oferecem segurança relativa, enquanto os braços abertos foram designados “áreas desprotegidas” (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; LISTER, 1987; PELLOW *et al.*, 1985). Assim, tem sido demonstrado

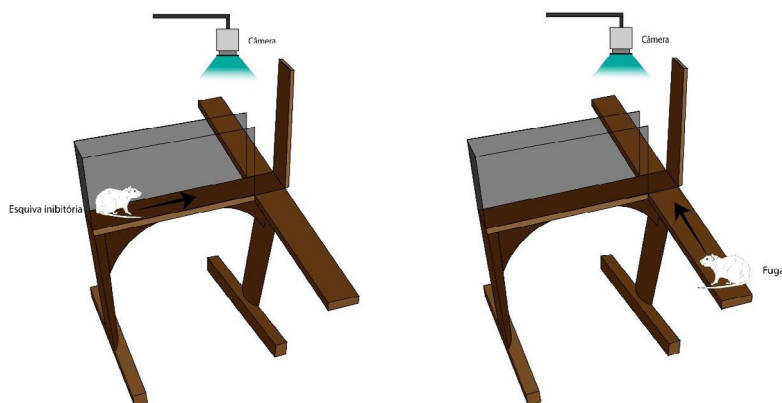
que as drogas ansiogênicas aumentam a aversão aos braços abertos do LCE e a frequência de SAP, enquanto compostos ansiolíticos produzem o efeito oposto (WALF; FRYE, 2007).

2.2 Labirinto em “T” elevado

O labirinto em “T” elevado (LTE) foi originalmente desenvolvido para avaliar comportamentos relacionados aos transtornos de ansiedade generalizada (TAG) e pânico (TP) em ratos (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI JR., 1998; ZANGROSSI JR., 1997; ZANGROSSI JR.; GRAEFF, 1997). O LTE foi desenvolvido baseado em um princípio semelhante ao do labirinto em cruz elevado, que é a aversão inata que ratos possuem a espaços abertos e elevados.

O aparato possui três braços de dimensões iguais, suspensos a 50 cm do chão. Os braços estão dispostos de maneira a formar um “T”, de modo que um deles é fechado por paredes laterais de 40 cm de altura e os outros dois são abertos, ou seja, sem paredes laterais (Figura 2) (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI JR., 1998; ZANGROSSI JR., 1997; ZANGROSSI JR.; GRAEFF, 1997).

Figura 2 – Representação esquemática do labirinto em T elevado (LTE)



Fonte: Próprios autores (2020).

A realização do teste envolve duas etapas, nas quais são avaliados dois comportamentos de defesa distintos, a fuga e a esquivia inibitória. Para avaliação da esquivia inibitória, o animal é colocado na extremidade do braço fechado e é registrado o tempo que ele gasta para entrar com as quatro patas nos braços abertos. No protocolo original, esse procedimento é repetido três vezes e o intervalo entre as exposições é de 30 segundos. Como o animal se depara com uma situação aversiva quando ele chega aos braços abertos, é esperado que, após cada exposição (ou tentativa), aumente a latência de saída do braço fechado, o que representa a aquisição do comportamento de esquivia inibitória. Esse parâmetro é utilizado para avaliar o transtorno de ansiedade generalizada (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI JR., 1998; ZANGROSSI JR., 1997; ZANGROSSI JR.; GRAEFF, 1997).

Na segunda etapa do teste, o rato é colocado na extremidade de um dos braços abertos para registro do tempo que ele gasta para entrar no braço fechado. Esse comportamento é definido como fuga e é utilizado para avaliar o transtorno de pânico (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI JR., 1998; ZANGROSSI JR., 1997; ZANGROSSI JR.; GRAEFF, 1997).

2.3 Teste de interação social

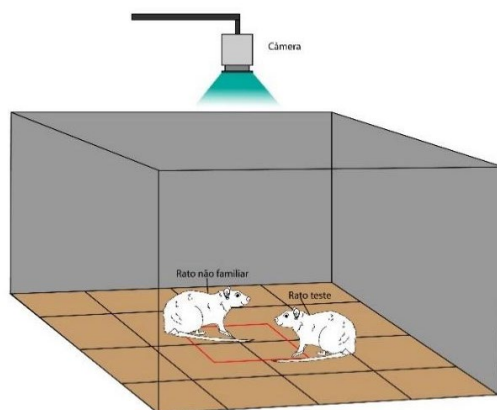
Inicialmente desenvolvido por File e Hyde (1978, 1979), o teste da interação social foi o primeiro a ser utilizado na avaliação de estados de ansiedade empregando um comportamento inato como uma medida dependente. Contrariamente aos modelos condicionados, nesse teste, não é necessária a utilização de nenhuma sessão de treino para os animais.

Primeiramente, o animal experimental é colocado individualmente em uma arena de acrílico (56 cm de comprimento x 56 cm de largura x 30 cm de altura) para habituação ao aparato (Figura 3), procedimento que deve ser realizado pelo menos um dia antes do

teste. No dia do teste, são utilizados dois animais, o rato experimental e o intruso, como é chamado o rato não familiar. Apenas os comportamentos do animal experimental são avaliados. A frequência e o tempo gasto na exibição dos comportamentos de cheirar, seguir, limpar e alisar o rato não familiar são classificados como interação social, enquanto os comportamentos de chutar, brigar ou morder são considerados agressivos. O aumento do tempo da interação social e a diminuição dos comportamentos agressivos indica uma atividade ansiolítica, de maneira contrária, a diminuição da interação e/ou aumento da agressão caracterizam um efeito ansiogênico (FILE, 1980).

Algumas condições utilizadas na execução do teste podem gerar diferentes comportamentos nos animais, entre elas, a iluminação da sala e a familiaridade pelo aparato do teste. De tal modo, quatro condições de ensaio são empregadas: i) pouca luz e arena familiar; ii) muita luz e arena familiar; iii) pouca luz e arena não familiar (gera níveis moderados de ansiedade); iv) muita luz e arena desconhecida (gera o mais alto nível da ansiedade) (FILE; SETH, 2003). O aumento da interação social é observado quando os ratos são testados em uma arena familiar e iluminada por pouca luz. Esse comportamento diminui à medida que as condições do teste se tornam mais aversivas ou ansiogênicas (FILE, 1980). Além dos diferentes comportamentos que podem ser adotados no teste, alguns autores recomendam que os ratos sejam mantidos isolados durante um curto período de tempo antes do ensaio, aproximadamente 180 minutos. Isto porque o isolamento social aumenta significativamente o tempo gasto na interação social (FILE; SETH, 2003).

Figura 3 – Representação esquemática da arena utilizada no teste de interação social



Fonte: Próprios autores (2020).

Esse foi o primeiro modelo capaz de avaliar tanto o aumento quanto a diminuição de comportamentos relacionados a ansiedade em animais, sendo, portanto, útil no estudo de efeitos ansiolíticos e ansiogênicos de substâncias. Nesse contexto, ansiolíticos como o diazepam e clordiazepóxido e drogas serotoninérgicas aumentam a interação social, enquanto drogas ansiogênicas, como pentilenotetrazol, promovem efeito oposto (FILE, 1985).

2.4 Campo aberto

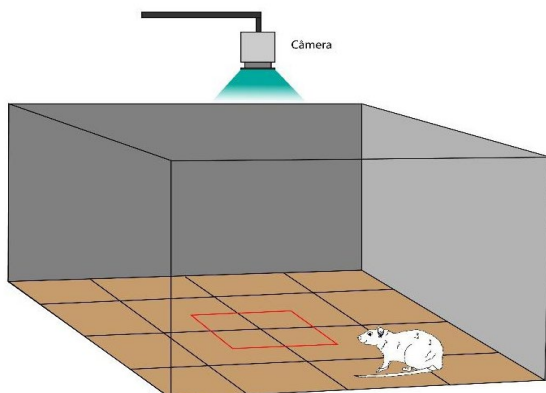
O teste de campo aberto foi desenvolvido por Hall (1934) e é um dos modelos mais antigos utilizados para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade em roedores. Esse teste foi desenvolvido baseado no princípio de que os roedores têm o hábito de explorar ambientes novos, mas evitam espaços abertos. Portanto, nesse teste, os animais mais ansiosos permanecem mais tempo explorando a periferia do aparato ao invés da parte central (HALL, 1934).

O teste de campo aberto é realizado em um aparato circular ou quadrado, chamado de arena (120 cm de comprimento x 120 cm de largura x 45 cm de altura), cercado de paredes que impedem a fuga

do animal (Figura 4). O assoalho possui marcações em quadrantes que auxiliam na quantificação do tempo que o animal permanece em cada região do aparato, o que permite a avaliação da atividade locomotora. O teste geralmente é filmado e são utilizados *softwares* que analisam o tempo gasto no centro do campo aberto e também a distância percorrida pelo animal durante o período de teste. A redução da atividade locomotora é um indicativo de um estado ansioso. Esse modelo é amplamente utilizado para demonstrar o efeito de substâncias ansiolíticas (CHEN *et al.*, 2017; CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012; HAZIM *et al.*, 2014; SCHULZ, 2018).

Os principais comportamentos avaliados nesse teste incluem a frequência de levantamentos, número de quadrantes percorridos, defecação e o tempo gasto na área central do aparato (CHOLERIS *et al.*, 2001). O efeito ansiolítico de uma substância geralmente está relacionado ao aumento da locomoção na parte central do aparato ou ao tempo gasto nesta mesma área, desde que não haja alteração na locomoção total e na frequência de levantamentos (*rearing*) do animal. A diminuição desses parâmetros e a observação do aumento do número de bolos fecais são considerados efeitos ansiogênicos (ANDREWS *et al.*, 2014; CHOLERIS *et al.*, 2001; HALL, 1934).

Figura 4 – Representação esquemática do teste de campo aberto



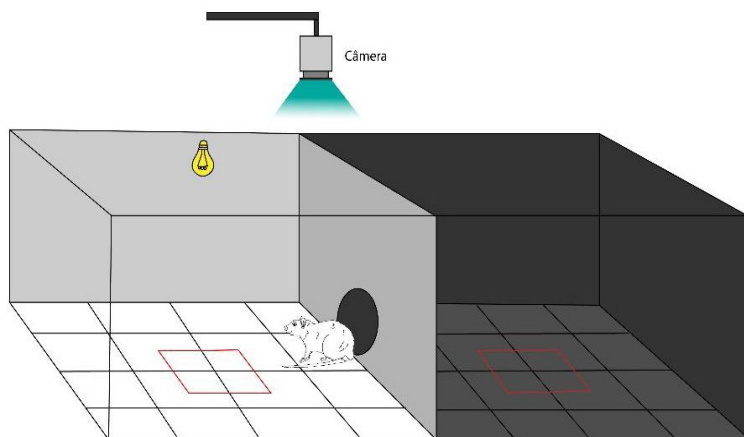
Fonte: Próprios autores (2020).

2.5 Transição claro-escuro

O teste de transição claro-escuro foi desenvolvido por Crawley e Goodwin nos anos 80 (CRAWLEY; GOODWIN, 1980). Esse modelo animal é baseado na aversão inata de roedores a locais muito iluminados. O aparato original consistia em uma caixa de 46 cm de comprimento x 27 cm de largura x 30 cm de altura, que tinha dois terços de sua área destinados à parte clara e o terço restante para a área escura do modelo. Além disso, os compartimentos eram separados por uma abertura, a área escura era pintada de preto e iluminada por luz vermelha, enquanto a clara era pintada de branco e iluminada por luz branca (CRAWLEY; GOODWIN, 1980). Várias adaptações já foram feitas ao modelo original e abrangem modificações no tamanho da caixa, nas dimensões de cada compartimento, na iluminação ou na duração do teste (Figura 5). Durante o teste, o animal é colocado no centro do compartimento claro, com a cabeça voltada para o compartimento escuro e a exploração de todo o aparato é observada por cinco minutos. Em roedores, esse modelo gera um conflito entre o comportamento exploratório desses animais e a aversão inata a ambientes intensamente iluminados (CAMPOS *et al.*, 2013; CRAWLEY; GOODWIN, 1980; CRYAN; SWEENEY, 2011).

O tempo de latência que o animal gasta para se deslocar do compartimento claro para o escuro é um dos parâmetros comportamentais avaliados neste teste. O tempo que o animal permanece em cada compartimento também é contabilizado, assim como o número total de cruzamentos entre eles. O efeito ansiogênico de substâncias nesse modelo está relacionado à redução atividade locomotora dos animais e à maior permanência deles no compartimento escuro. Considera-se que o animal entrou no compartimento escuro quando ele está com as quatro patas nesse ambiente, da mesma forma para a entrada no compartimento claro (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012; CRYAN; SWEENEY, 2011).

Figura 5 – Representação esquemática do aparato utilizado no teste de transição claro-escuro



Fonte: Próprios autores (2020).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora seja complexo reproduzir os sintomas físicos, psicológicos e comportamentais que caracterizam os transtornos de ansiedade em humanos, os modelos animais têm sido ferramentas relevantes na condução de pesquisas pré-clínicas. Esses paradigmas experimentais, ao auxiliarem no estudo e na compreensão das bases neurais subjacentes à ansiedade, possibilitam a identificação de novos alvos farmacológicos úteis no tratamento dessa psicopatologia. Assim, é importante que pesquisadores compreendam as limitações e os benefícios associados ao uso de cada modelo animal de ansiedade para definir qual o melhor paradigma a ser utilizado no seu estudo.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, N. A.; PAPAKOSTA, M.; BARNES, N. M. Discovery of novel anxiolytic agents. The trials and tribulations of pre-clinical models of anxiety. *Neurobiology of Disease*, v. 61, p. 72-78, 2014.

Capítulo 2

TESTES COMPORTAMENTAIS EM PESQUISA PRÉ-CLÍNICA

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 295-303, 2015.

BRASIL. Ministério da Previdência Social. **País gasta cerca de R\$ 70 bilhões com acidentes de trabalho**. 2017. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2012/04/pais-gasta-cerca-de-R-70-bilhoes-com-acidentes-de-trabalho>. Acesso em: 20 out. 2020.

CAMPOS, A. C.; FOGAÇA, M. V.; AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 35, p. S101-S111, 2013.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p.1193-205, 2005.

CHEN, C. J.; ZHONG, Z. F.; XIN, Z. M.; HONG, L. H.; SU, Y. P.; YU, C. X. Koumine exhibits anxiolytic properties without inducing adverse neurological effects on functional observation battery, open-field and Vogel conflict tests in rodents. **Journal of Natural Medicines**, v. 71, n. 2, p. 397-408, 2017.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A. W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F. S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235-260, 2001.

CORTESE, B. M.; PHAN, K. L. The role of glutamate in anxiety and related disorders. **CNS Spectrums**, v. 10, n. 10, p. 820-830, 2005.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167-170, 1980.

CROCQ, M. A. A history of anxiety: from Hippocrates to DSM. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 319, 2015.

CRUZ, A. P. M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. **Métodos em Neurociência**, p. 192-217, 2012.

CRYAN, J. F.; SWEENEY, F. F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1129-1161, 2011.

DSM-V. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Associação Americana de Psiquiatria. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ENNACEUR, A.; CHAZOT, P. L. Preclinical animal anxiety research—flaws and prejudices. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 4, n. 2, p. e00223,

2016. Disponível em: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/prp2.223>. Acesso em: 12 out. 2020.

FERREIRA, G. F. S. **Análise da estrutura fatorial do comportamento exploratório de ratos em modelos de ansiedade, depressão e reconhecimento.** Tese (Doutorado em Ciências do Comportamento) – Instituto de Psicologia, Universidade de Brasília, Brasília. 2010.

FILE, S. E. Animal models for predicting clinical efficacy of anxiolytic drugs: Social behavior. **Neuropsychobiology**, v. 13, n. 1-2, p. 55-92, 1985.

FILE, S. E. The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 2, n. 3, p. 219-238, 1980.

FILE, S. E.; HYDE, J. R. A test of anxiety that distinguishes between the actions of benzodiazepines and those of other minor tranquilizers and of stimulants. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 11, n. 1, p. 65-69, 1979.

FILE, S. E.; HYDE, J. R. Can social interaction be used to measure anxiety? **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 62, n. 1, p. 19-24, 1978.

FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 35-53, 2003.

GRAEFF, F. G.; FERREIRA NETTO, C.; ZANGROSSI JR., H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 237-246, 1998.

GRILLON, C.; ROBINSON, O. J.; CORNWELL, B.; ERNST, M. Modeling anxiety in healthy humans: a key intermediate bridge between basic and clinical sciences. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 12, p. 1999-2010, 2019.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.

HAZIM, A. I.; RAMANATHAN, S.; PARTHASARATHY, S.; MUZAIMI, M.; MANSOR, S. M. Anxiolytic-like effects of mitragynine in the open-field and elevated plus-maze tests in rats. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 64, n. 3, p. 161-169, 2014.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

Capítulo 2

TESTES COMPORTAMENTAIS EM PESQUISA PRÉ-CLÍNICA

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, n. 4, p. 254-260, 1955.

PADURARIU, M.; ANTIOCH, I.; BALMUS, I.; CIOBICA, A.; EL-LETHEY, H. S.; KAMEL, M. M. Describing some behavioural animal models of anxiety and their mechanistics with special reference to oxidative stress and oxytocin relevance. **International journal of veterinary science and medicine**, v. 5, n. 2, p. 98-104, 2017.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, 1985.

SCHULZ, D. Acute food deprivation separates motor-activating from anxiolytic effects of caffeine in a rat open field test model. **Behavioural Pharmacology**, v. 29, n. 6, p. 543-546, 2018.

SMITH, W. D. **Hipócrates**. Cambridge: Harvard University Press, 1994.

TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 317-331, 2015.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322-328, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Investing in treatment for depression and anxiety leads to fourfold return**. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/headlines/13-04-2016-investing-in-treatment-for-depression-and-anxiety-leads-to-fourfold-return>. Acesso em: 17 nov. 2020.

ZANGROSSI JR., H. Modelos animais de ansiedade. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Ansiedade e Transtornos de Ansiedade**. Rio de Janeiro: ECN, 1997. cap. 4, p.85-120.

ZANGROSSI JR., H.; GRAEFF, F. G. Behavioral Validation of the Elevated T-Maze, a New Animal Model of Anxiety. **Brain Research Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 1-5, 1997.



Capítulo 3

SEGURANÇA DO USO DE FÁRMACOS NA GESTAÇÃO

Uma abordagem dos protocolos de toxicidade reprodutiva

CARLOS EDUARDO LACERDA RAMALHO
MARIELLY CARVALHO
VANESSA CRISTIANE SANTANA AMARAL

1 INTRODUÇÃO

A teratologia é definida como a ciência que estuda as causas, os mecanismos e os padrões determinantes do desenvolvimento de malformações congênitas (DeSESSO, 2018). Um teratógeno compreende qualquer substância, organismo, estado nutricional ou agente físico que produz alterações funcionais ou estruturais que comprometem o desenvolvimento embrionário ou fetal (DICKE, 1989).

Um marco na história da teratologia foi a tragédia da talidomida, que aconteceu entre as décadas de 1950 e 1960, e alertou a população mundial sobre a necessidade de conscientização sobre o uso de fármacos e outras substâncias químicas durante a gestação (VARGESSON, 2018). A talidomida é uma substância sintética derivada do ácido glutâmico e foi desenvolvida na Alemanha Ocidental para uso como fármaco sedativo não-barbitúrico. Entretanto, descobriu-se, na época, que essa substância também possui propriedade antiemética, e, por essa razão, foi prescrita a inúmeras gestantes para a prevenção de náuseas e vômitos matinais (VARGESSON, 2018).

Seus efeitos teratogênicos foram descobertos no ano de 1961, após a identificação de alta incidência nas taxas de aborto e um número crescente de recém-nascidos que apresentaram redução do tamanho de membros (focomelia e displasia radial), anomalias graves na face, coluna vertebral, quadril e sistema nervoso central (VARGESSON, 2018). Várias vítimas da talidomida, como são chamadas as pessoas que sobreviveram ao incidente com esse fármaco, apresentam outros problemas de saúde como osteoartrite, problemas de mobilidade articular e doença coronariana (MCCREDIE, 2009; VARGESSON, 2009). Cerca de 50% das gestações e mais de 10 mil bebês em 466 países nasceram com malformações decorrentes da exposição a esta substância (BARTLETT; DREDGE; DALGLEISH, 2004; SMITHELLS; NEWMAN, 1992).

As informações relacionadas à segurança do uso da talidomida, na época, eram limitadas quando comparadas às que são disponibilizadas para os medicamentos comercializados atualmente. Nas décadas de 50 e 60, as agências reguladoras mundiais não dispunham de normativas e protocolos tão rigorosos para avaliar a segurança do uso de fármacos. Assim, os testes de toxicidade com a talidomida foram realizados apenas em camundongos, espécie que não apresentou sensibilidade aos efeitos tóxicos dessa substância (VARGESSON, 2009, 2015). Só após o ocorrido, identificou-se que camundongos são pouco sensíveis aos efeitos teratogênicos da talidomida, enquanto os primatas, coelhos, tatus, *xenopus*, marsupiais, hamster, peixe-zebra, hidra e bactérias são mais suscetíveis a eles (FORT *et al.*, 2000; HARTMANN *et al.*, 2014; MERKER *et al.*, 1988; STEPHENS; BUNDE; FILLMORE, 2000).

O objetivo deste capítulo é fornecer uma visão geral dos testes pré-clínicos de toxicidade reprodutiva descritos em diretrizes nacionais e internacionais e os aspectos regulatórios relacionados a estes ensaios.

2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DE TOXICIDADE REPRODUTIVA

Os estudos de toxicidade reprodutiva são destinados a identificar sinais de toxicidade decorrentes da interação entre as substâncias testadas e os sistemas biológicos, principalmente aqueles envolvidos no processo reprodutivo do animal. Nesse sentido, a abordagem experimental a ser utilizada dependerá essencialmente da finalidade ou dos objetivos do estudo.

Existem vários protocolos de agências reguladoras mundiais utilizados para avaliar a toxicidade reprodutiva e desenvolvimental de substâncias. Quando comparados, eles apresentam muitas semelhanças, por exemplo, todos utilizam a menor dose testada que não causa efeitos adversos observáveis (NOAEL – do inglês *no-observed-adverse effects*) como um dos parâmetros para definição da dose. Contudo, existem algumas diferenças importantes que precisam ser destacadas e estão relacionadas aos propósitos específicos de cada agência.

A agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA – do inglês *United States Environmental Protection Agency*) possui um protocolo adaptado para avaliação da segurança de inseticidas, fungicidas, rodenticidas e outras substâncias que possuem um potencial risco de causar efeitos adversos a humanos, incluindo possíveis danos ao sistema reprodutivo (EPA, 2000).

A agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA – do inglês *U. S. Food and Drug Administration*), por sua vez, possui um protocolo direcionado à avaliação de ingredientes alimentares e é chamado de Redbook 2000, além de outro destinado à avaliação da segurança de fármacos destinados ao registro como medicamento (FDA, 2007, 2017). Esse último também é preconizado pela agência europeia de medicamentos (EMA do inglês *European Medicines Agency*), com base na diretriz proposta no ICH (do inglês – *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for*

Registration of Pharmaceuticals for Human Use) (EMA, 2020). Além desses órgãos, destaca-se a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD – do inglês *Organisation for Economic Co-operation and Development*), que possui um protocolo de avaliação da toxicidade reprodutiva para substâncias em geral (OECD, 2016). Todos esses documentos trazem as informações necessárias à condução dos estudos de toxicidade reprodutiva como: forma e tempo de exposição, dosagens, espécies animais, parâmetros a serem observados, dentre outros pontos.

Devido à necessidade de redução do uso de animais em pesquisa pré-clínica, têm-se buscado a utilização de estudos alternativos para avaliar os efeitos de substâncias teste sobre parâmetros de desenvolvimento reprodutivo. No entanto, o valor preditivo desses estudos ainda é baixo, em decorrência da complexidade do processo de reprodução, o que não permite extrapolar com segurança os dados para humanos. Diante de tais limitações, esses testes normalmente são utilizados na fase inicial do desenvolvimento de novos fármacos, quando o objetivo é fazer uma triagem de potenciais efeitos sobre a reprodução. Assim, a título de exemplo, podemos citar a cultura de embriões inteiros de roedores, teste de célula-tronco embrionárias de camundongos e as larvas de peixe-zebra (*zebrafish*) como ensaios alternativos ao uso de mamíferos (STARK, 2016).

Nos ensaios pré-clínicos destinados a subsidiar o registro de medicamentos, por exemplo, é comum a utilização das diretrizes propostas pelo ICH, especialmente do guia ICH S5 (R3) *Guideline on Reproductive Toxicology: Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals*.

No caso dos testes de triagem, que são utilizados para identificar o risco e os efeitos tóxicos de substâncias químicas durante a gestação, o guia n. 421 da OECD *Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test* (Teste de triagem de toxicidade desenvolvimental/reprodutiva) tem sido um dos mais empregados.

Capítulo 3

SEGURANÇA DO USO DE FÁRMACOS NA GESTAÇÃO

As diretrizes propostas nesses dois guias são aceitas para avaliar a toxicidade reprodutiva em ensaios pré-clínicos com finalidade de registro de medicamentos no Brasil (BRASIL, 2013). Contudo, se o objetivo é o registro de um medicamento fitoterápico, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) estabelece como referência no seu guia “Estudos não clínicos necessários ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos” as diretrizes propostas no guia do ICH S5 (R2) para avaliação da toxicidade reprodutiva (BRASIL, 2019).

Ademais, o FDA e a EMA, agência europeia de medicamentos, também preconizam a utilização do guia ICH S5 (R3) para a realização dos estudos de toxicidade reprodutiva, devido ao maior número de informações incluídas na avaliação e integração dos dados com os estudos de toxicidade em geral, farmacodinâmica, farmacocinética, estudo comparativos de mecanismos de ação, dentre outros (EMA, 2020).

Cabe salientar que o estudo de toxicidade reprodutiva será exigido apenas para medicamentos destinados ao uso por mulheres em idade fértil. Em tal situação, são avaliados aspectos como via de administração, indicação terapêutica, dentre outros aspectos, para identificar a relevância ou a necessidade de condução do estudo de toxicidade reprodutiva.

As fases dos estudos de toxicidade reprodutiva e os principais aspectos relacionados ao uso de animais descritos nas diretrizes da OECD 421 e ICH S5 (R3) são apresentados nos Quadros 1 e 2, respectivamente.

Quadro 1 – Fases do estudo de toxicidade reprodutiva segundo os guias da OECD 421 e ICH S5 (R3)

OECD 421	ICH S5 (R3)*
Pré-exposição	Estudo 1 – Fertilidade e desenvolvimento embrionário precoce – FEED Estágio A
Duração de 14 dias. Início do estudo (avaliação do ciclo estral).	Compreende o pré-acasalamento até a concepção, período no qual é avaliado o ciclo reprodutivo de ambos os sexos.
Pré-acasalamento	Estudo 1 – Fertilidade e desenvolvimento embrionário precoce – (FEED Estágio B)
Duração de 14 dias (início da administração da substância-teste a machos e fêmeas e monitoramento diário do esfregaço vaginal das fêmeas).	Duração de 7 dias, refere-se ao período compreendido entre a concepção até a implantação.
Acasalamento	Estudo 2 Desenvolvimento embrionário em duas espécies – (EFD – Estágio C).
Um macho e uma fêmea são colocados para acasalar por até 14 dias (manutenção da administração da droga e do monitoramento do esfregaço vaginal das fêmeas até evidência do acasalamento).	Refere-se ao período seguinte a implantação embrionária até o momento de fecho do palato duro. Observa-se o desenvolvimento do embrião e a formação dos primeiros órgãos e especificamente do coração.

OECD 421	ICH S5 (R3)*
Gestação	Desenvolvimento embriofetal em duas espécies (EFD -Estágio D)
Aproximadamente 22 dias de duração (Necropsia dos machos após um período de pelo menos 4 semanas de tratamento) ou os machos podem continuar recebendo as doses caso seja possível realizar um segundo acasalamento.	Período do desenvolvimento do feto até o término da gravidez. Nessa etapa verifica-se o crescimento fetal e dos órgãos.
Lactação	Estudo 3 – Desenvolvimento pré a pós-natal (PPND – Estágio C até F).
Aproximadamente 13 dias de duração. No 13º dia pós-parto, realiza-se a necropsia das fêmeas e filhotes. Retenção dos mamilos em filhotes machos. Necropsia de machos.	Estágio E compreende o período do nascimento ao desmame. Avalia-se a função reprodutora da mãe e a adaptação do neonato ao ambiente externo. O Estágio F vai do desmame até a maturação sexual. Nesse momento, avalia-se o desenvolvimento e crescimento após o desmame, comportamento relacionado a vida independente e a função sexual.

Abreviaturas: OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development; ICH S5 – International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use Step 5

*As agências reguladoras EMA (European Medicines Agency) e FDA (Food and Drug Administration) recomendam a utilização do guia ICH S5 (R3).

Quadro 2 – Principais aspectos relacionados ao uso de animais segundo os guias da OECD 421 e ICH S5(R3)

Parâmetro	OECD 421	ICH S5 (R3)*
Animal/ Linhagem	Espécie rato, linhagem (ex: Wistar)	Fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial – no mínimo uma espécie roedora, preferencialmente, ratos. Desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna – no mínimo uma espécie roedora, preferencialmente ratos. Desenvolvimento embriofetal – duas espécies, uma roedora, preferencialmente ratos, e uma não roedora preferencialmente coelhos. Outros animais podem ser utilizados caso sejam mais adequados, desde que se justifique
Habitação e alimentação	Temperatura de 22 °C ($\pm$ 3°). Umidade entre 50 a 60%. Ciclo claro escuro de 12 h. Os animais são mantidos em caixas individualmente ou em pequenos grupos (máximo 5) separados por sexo. As fêmeas prenhes devem ficar em caixas individuais.	Os protocolos não mencionam esse aspecto. Faz-se referência ao cumprimento de boas práticas laboratoriais no uso de animais.

Parâmetro	OECD 421	ICH S5 (R3)*
Número de animais	Cada grupo deve ser composto de machos e fêmeas, sendo 10 machos e 12 a 13 fêmeas por grupo (3 grupos de teste e 1 controle). A quantidade de animais pode ser maior a depender da finalidade do estudo, substância testada e etc.	16 a 20 ninhadas (depende da finalidade do estudo, substância testada e dos dados de estudos anteriores).
Idade/sexo	Adulto de ambos os sexos. A faixa etária deve ser indicada em dias. Utilizar somente os animais com faixa de idade semelhante.	Paridade de idade. Animais adultos jovens sexualmente maduros.
Peso	Indicar a faixa de peso dos animais não podendo exceder 20% do peso médio.	Os animais devem apresentar peso semelhante (paridade de peso)

Abreviaturas: OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development; ICH S5 – International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use Step 5

*As agências reguladoras EMA (European Medicines Agency) e FDA (Food and Drug Administration) recomendam a utilização do guia ICH S5 (R3).

Em relação à integração dos dados utilizados para definição de segurança de uso em humanos, o protocolo da OECD geralmente se limita às informações obtidas no próprio estudo e/ou em estudos de toxicidade dose repetida ou toxicidade aguda. Por outro lado, os estudos conduzidos utilizando as diretrizes propostas no ICH S5 (R3) são realizados comumente quando os protótipos de medicamentos se encontram em fase de ensaios clínicos (Fase I ou Fase II). Por essa razão, muitas informações a respeito do fármaco em humanos estarão disponíveis, como: farmacocinética, farmacodinâmica, metabolismo, toxicidade aguda, dose repetida dentre outros. Serão aliados a esses aspectos, o maior número de animais e o maior tempo de duração do estudo de toxicidade reprodutiva conduzidos segundo protocolo do ICH permitem extrapolar os resultados de forma mais segura.

Todas essas informações devem ser avaliadas em conjunto com o desenho experimental, em comparação com dados clínicos obtidos tanto para a substância objeto do estudo como outras relacionadas, considerando-se os aspectos descritos no Quadro 3.

Quadro 3 – Princípios utilizados na avaliação de risco de fármacos destinados ao uso em ensaios clínicos em mulheres com capacidade reprodutiva segundo o ICH S5 (R3)

Critério	Significado	Risco
Margem de exposição	Quanto menor a margem de exposição, maior o risco para humanos. Usualmente, margens de exposição menores que 10 vezes à exposição em humanos são preocupantes. Margens de exposição superiores a 25 vezes causam pouca preocupação para o uso clínico em humanos. Evidência de resultados positivos para indução de malformações ou letalidade embriofetal na dose máxima recomendada para humanos pode ser suficiente para avaliação do risco.	Maior risco

Capítulo 3

SEGURANÇA DO USO DE FÁRMACOS NA GESTAÇÃO

Critério	Significado	Risco
Plausibilidade biológica	O mecanismo de ação do fármaco está relacionado ou tem efeito conhecido sobre a reprodução ou desenvolvimento fetal.	Maior risco
Evidência de relação dose resposta	É fator de aumento na preocupação em relação ao uso do fármaco.	Maior risco
Reversibilidade	Sinais de toxicidade reversíveis são menos preocupantes.	Menor risco
Potencial confundimento com a toxicidade parental	A evidência de toxicidade materna diminui a preocupação com o sinal observado. Contudo, não possui grande peso na análise de risco para excluir completamente o sinal de toxicidade. Assim, não se deve presumir que a toxicidade de desenvolvimento decorreu de toxicidade materna.	Menor risco
Concordância entre espécies	Ocorrência de sinal de toxicidade em mais de uma espécie aumenta o risco.	Maior risco
Origem da informação	Nível de evidência conforme o tipo do dado: uso em humanos > estudos em animais > estudos alternativos.	Maior risco (pós-mercado) menor risco (ensaios alternativos)

Abreviatura: ICH S5 – *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use Step 5*

No que se refere às doses das substâncias químicas ou compostos avaliados nos testes de toxicidade reprodutiva, vale ressaltar que são baseadas em informações obtidas de outros estudos, como por exemplo, farmacológico, toxicidade de dose repetida, toxicocinéticos, farmacocinéticos e determinação de faixa de dose (EMA, 2020). Como os testes de toxicidade referem-se a estudos de segurança de uso, as doses utilizadas geralmente excedem em várias vezes a dose máxima recomendada para humanos (EMA, 2009). O limite da dose mais alta com base em estudos anteriores envolve

fatores como: alterações de peso corporal, resposta farmacológica exagerada (hipoglicemia), convulsões, letalidade embriofetal excessiva e toxicidade alvo específica. A maior dose pode ser definida também através da margem de exposição em relação à dose máxima recomendada em humanos (MHRD do inglês – *Maximum Human Recommended Dose*) e o seu cálculo é realizado a partir de múltiplos da área sob a curva (AUC do inglês – *Area Under the Curve*) ou da concentração plasmática máxima (Cmax do inglês – *Maximum plasma concentration*). A MHRD nada mais é que a dose diária máxima indicada na bula de um medicamento, por exemplo, a cetirizina tem como posologia 10 mg uma vez ao dia.

Para definição da segurança de uso em relação a efeitos teratogênicos, uma abordagem utilizada é a avaliação de estudos de fármacos anteriormente aprovados como seguros e daqueles reconhecidamente definidos como teratogênicos. Para mensurar o potencial teratogênico, é utilizada uma dose incapaz de causar efeito adverso (NOAEL – do inglês *no-observed-adverse effects*) para malformações e letalidade embriofetal, sem evidência de toxicidade materna, determinado em estudos com ratos e coelhos. Assim, a partir da MHRD, é possível calcular a margem de segurança aceita para definir se um fármaco é mais ou menos seguro quanto ao risco de induzir malformações e letalidade embriofetal. Como resultado, observa-se que, nos fármacos teratogênicos, os sinais de malformações e letalidade embriofetal aparecem em margens menores que 4x o MHRD. Fundamentadas nesses dados, foram definidas margens de segurança em relação a MHRD para classificar a segurança de um fármaco sobre atividade reprodutiva: maior risco <10 vezes MHRD; risco intermediário >10 e < 25 vezes MHRD; pouco risco >25 vezes MHRD (ANDREWS *et al.*, 2019; EMA, 2020).

Para exemplificar, utilizando o mesmo fármaco citado anteriormente, a cetirizina é considerada negativa para efeito teratogênico, pois possui MHRD = 10 mg, AUC = 3.0 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ e a sua margem em relação ao NOAEL para malformação e/ou letalidade

embriofetal em ratos é de 111 vezes. Por outro lado, a carbamazepina possui MHRD = 1600 mg, AUC = 3.0 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ e a sua margem em relação ao NOAEL é de 2,4 vezes. Por conseguinte, é considerado teratógeno em humanos (EMA, 2020).

Também é possível utilizar a dose máxima viável para definição da dose máxima quando as propriedades físico-químicas do produto, associadas à frequência de administração ou via de administração, limitem a quantidade a ser administrada. Outra forma bastante utilizada é a dose limite de 1g/kg/dia, quando não é possível atingir os requisitos de segurança com doses mais baixas. Por fim, temos a seleção do NOAEL – que corresponde à dose em que nenhum efeito adverso foi observado. Tem como objetivo permitir uma avaliação da dose– resposta. Nesse caso, deve ser estabelecida utilizando-se um fator multiplicador entre 1 a 5 vezes em relação ao MRHD, porém, é necessária uma justificativa caso haja doses em exposições subterapêuticas (EMA, 2020; OECD, 2015).

As agências reguladoras e os patrocinadores (instituições de pesquisa, indústria farmacêutica etc.) utilizam todas as informações disponíveis para tomada de decisão sobre a segurança de uso dos produtos testados. Dentre os critérios avaliados, destacam-se a relevância dos estudos de adequabilidade dos modelos animal, margem de segurança, relação dose-resposta, plausibilidade biológica dos achados, mecanismo de ação da substância, comparação da substância testada com substâncias teratogênicas conhecidas, relação da estrutura com a atividade, concordância dos efeitos entre espécies, dentre outros quesitos (EMA, 2020). Esse é um processo contínuo, em que os dados são analisados em conjunto com o uso pretendido do fármaco e a população alvo. Embora os critérios possuam um peso individual, de acordo com o desenho da pesquisa, são avaliados de maneira conjunta.

Por fim, os protocolos de toxicidade reprodutiva são mais do que instrumentos de predição de efeitos tóxicos para mulheres grávidas e para os fetos. Esses estudos têm como finalidade permi-

tir uma avaliação de risco x benefício x segurança dos fármacos. Os dados obtidos no estudo de toxicidade reprodutiva compõem apenas parte das informações a serem utilizadas para tomada de decisão sobre a viabilidade dos ensaios clínicos com mulheres com capacidade para engravidar.

REFERÊNCIAS

BARTLETT, J.B; DREDGE, K; DALGLEISH, A.G. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 4, p. 314-322, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, DF, 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 de maio de 2014. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/pesquisa-clinica/guia-para-a-conducao-de-estudos-nao-clinicos-de-toxicologia-e-seguranca-farmacologica-necessarios-ao-desenvolvimento-de-medicamentos-versao-2.pdf/view>. Acesso em: 24 nov. 2020.

BLOMME, E.; WILL, Y. Toxicology strategies for drug discovery– Present and Future. **Chemical Research Toxicology**, v. 29, n. 4, p. 473-504, 2015.

COLLINS, T.F.X.; SPRANDO, R. L.; SHACKELFORD, M. E.; HANSEN, D. K.; WELSH, J. J. Testing guidelines for evaluation of reproductive and developmental toxicity of food additives in females. **International Journal of Toxicology**, v. 17, p. 299-325, 1998.

DASTON, G. Laboratory models and their role in assessing teratogenesis. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 157, n. 3, p. 183-187, 2011.

DeSESSO, J.M. The arrogance of teratology: A brief chronology of attitudes throughout history. **Birth Defects Research**, v. 111, n. 3, p. 123-141, 2018.

DICKE, J.M. Teratology: principles and practice. **Medical Clinics of North America**, v. 73, n. 3, p. 567-582, 1989.

EMA– European Medicines Agency. **Guideline on the use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products**. 2011. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-use-pharmacogenetic-methodologies-pharmacokinetic-evaluation-medicinal-products_en.pdf. Acesso em: 5 dez. 2020.

EMA– European Medicines Agency. **ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals**. 2009. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m3r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-marketing-authorisation_en.pdf. Acesso em: 5 jan. 2021.

EMA– European Medicines Agency. **ICH S5 (R3) guideline on reproductive toxicology: Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals**. 2019. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-s5-r3-guideline-reproductive-toxicology-detection-toxicity-reproduction-human-pharmaceuticals_en.pdf. Acesso em: 10 jul. 2020.

EPA– United States Environmental Protection Agency. **Health Effects Test Guidelines: OPPTS 870.3550 Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test**. 2000. Disponível em: <https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPPT-2009-0156-0015>. Acesso em: 10 jul. 2020.

EPA– United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment**. October 31, 1996. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-11/documents/guidelines_repro_toxicity.pdf. Acesso em: 10 jul. 2020.

EPA– United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment**, December 5, 1991. Disponível em: <https://cfpub.epa.gov/ncea/raf/pdfs/devtox.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2020.

EPA– United States Environmental Protection Agency. **Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.3200, 21/28-Day Dermal Toxicity**, August 1998. Disponível em: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0156-0012>. Acesso em: 20 jul. 2020.

FDA – U.S. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry and Other Stakeholders Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients Redbook 2000**, Washington, DC, FDA. 2007, p. 286. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/79074/download>. Acesso em: 25 jul. 2020.

FDA – U.S. Food and Drug Administration. **Toxicological Principles for the Safety Assessment of Direct Food Additives and Color Additives Used in Food, Redbook II (Draft)**. Washington, DC, 1993. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/1993-draft-redbook-ii>. Acesso em: 25 jul. 2020

FDA – U.S. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry Reproductive and Developmental Toxicities — Integrating Study Results to Assess Concerns**, Washington, DC, September 2011. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/reproductive-and->

developmental-toxicities-integrating-study-results-assess-concerns. Acesso em: 25 jul. 2020

FORT, D.J.; STOVER, E.L.; BANTLE, J.A. Evaluation of the developmental toxicity of thalidomide using frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX): biotransformation and detoxification. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 20, n. 1, p. 35-47, 2000.

HARTMANN, M.D.; BOICHENKO, L.; COLES, M.; ZANINI, F.; LUPAS, A. N.; ALVAREZ, B. H. Thalidomide mimics uridine binding to an aromatic cage in cereblon. **Journal of Structural Biology**, v. 188, p. 225-232, 2014.

JELINEK, R. The contribution of new findings and ideas to the old principles of teratology. **Reproductive Toxicology**, v. 20, n. 3, p. 295-300, 2005.

MCCREDIE, J. History, heresy and radiology in scientific discovery. **Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology**, v. 53, n. 5, p. 433-441, 2009.

MERKER, H.J.; HEGER, W.; SAMES, K.; STURJE, H.; NEUBERT, D. Embryotoxic effects of thalidomide-derivatives in the non-human primate callithrix jacchus. I. Effects of 3-(1,3-dihydro-1-oxo-2H-isindol-2-yl)-2,6-dioxopiperidine (em12) on skeletal development. **Archives of Toxicology**, v. 61, p. 165-179, 1988.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Guideline for the Testing of Chemicals – no 421: “Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test”**. 29 jul 2016. Disponível em: <https://www.oecdilibrary.org/docserver/9789264264380en.pdf?expires=1522797677&id=id&accname=guest&checksum=3FD13969A2F3DD5CF0D2D22D7B57B0F7>. Acesso em: 4 maio 2020.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Guidance Document On Mammalian Reproductive Toxicity Testing And Assessment nº 43**. Paris, FR, 2008. Disponível em: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en). Acesso em: 4 maio 2020.

SMITHELLS, R.W; NEWMAN, C.G. Recognition of thalidomide defects. **Journal of Medical Genetics**, v. 29, n.10, p. 716-723, 1992.

STEPHENS, T.D.; BUNDE, C.J.; FILLMORE, B.J. Mechanism of action in thalidomide teratogenesis. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 12, p. 1489-1499, 2000.

STARK, C.; STEGER-HARTMANN, T. Nonclinical Safety and Toxicology. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 232, p. 261-283, 2016.

STEPHENS, T.D.; BUNDE, C.J.; FILLMORE, B.J. Mechanism of action in thalidomide teratogenesis. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 1489-1499, 2000.

Capítulo 3

SEGURANÇA DO USO DE FÁRMACOS NA GESTAÇÃO

VARGESSON, N. Review Thalidomide-Induced Teratogenesis: History and Mechanisms. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**, v. 105, n. 2, p. 140-156, 2015.

VARGESSON, N. Review The teratogenic effects of thalidomide on limbs. **Journal of Hand Surgery**, v. 44, n. 1, p. 88-95, 2018.

VARGESSON, N. Thalidomide-induced limb defects: resolving a 50-year-old puzzle. **Developmental Biology**, v. 31, p. 1327-1336, 2009.

Capítulo 4

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Streptococcus mutans* E *Candida albicans* DA CAVIDADE BUCAL

REUBER MENDES ROCHA
JULIANE GUIMARÃES DE CARVALHO
PLÍNIO LÁZARO FALEIRO NAVES

1 INTRODUÇÃO

Além das funções mastigatória e de fala, a boca está ligada à aparência e à integração social, portanto, é crescente a preocupação com a saúde bucal, dada a significância do sistema estomatognático. A saúde bucal é frequentemente comprometida por doenças como cárie, lesões inflamatórias, infecciosas, cistos e tumores (JIN *et al.*, 2016). A disponibilidade de açúcares estimula a microbiota bucal acidogênica residente a proliferar e secretar ácido láctico que, por sua vez, induz à dissolução dos tecidos dentários duros, o que é conhecido como cárie (ALMEIDA *et al.*, 2017).

A cárie dentária pode ser definida como um sinal clínico do processo de desmineralização da superfície dentária, causado pelo metabolismo de biofilme bacteriano na presença de açúcar, principalmente a sacarose. A dissolução da superfície dentária é um processo quase sempre lento e, se não houver alguma interferência, pode progredir até a destruição dentária (FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2017). O processo de desmineralização ocorre devido ao desequilíbrio nas flutuações do pH resultante de produção de ácido

lático proveniente do metabolismo microbiano, principalmente de *Streptococcus mutans* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A complexidade da microbiota bucal humana não permite creditar unicamente a um tipo de micro-organismo o desenvolvimento da cárie dentária. Estudos *in vivo* demonstraram que, além dos *Streptococcus mutans*, outros micro-organismos acidogênicos participam da etiologia do processo carioso, dentre eles, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus salivarius* e *Streptococcus sanguis* (JORGE, 2012).

Inicialmente, os micro-organismos interagem para a formação do biofilme e expressam genes em resposta às condições bucais como pH, oxigenação, nutrientes e presença de superfície sólida (RODRIGUES, 2019). O estabelecimento de biofilme polimicrobiano é um importante fator na patogenia, pois propicia proteção aos micro-organismos associados, que, ao fermentarem os carboidratos disponíveis, reduzem o pH local e intensificam a perda mineral (MALTZ *et al.*, 2016).

Contudo, nem todas as espécies residentes na boca humana são eminentemente prejudiciais. *Candida albicans* é outro importante micro-organismo bucal que, em situações de normalidade do hospedeiro, é um componente comensal, mas que pode se comportar como patogênico quando fatores locais e sistêmicos são desencadeados (WILLIAMS *et al.*, 2013). A capacidade de transição de levedura para filamentosa está diretamente relacionada à sua patogenia (HAN; CANNON; VILLAS-BÔAS, 2011).

Essa levedura tem capacidade de colonizar a mucosa bucal e superfícies de próteses (MARTIN *et al.*, 2011) e é relatada como causa frequente de infecções orofaríngeas (HILLER *et al.*, 2011); também apresenta potencial cariogênico, sendo encontrada em 10% de dentes cariados sem *S. mutans* (AAS *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2018).

É crescente a demanda por compostos sintéticos e naturais que atuem de maneira complementar ao arsenal já disponível no controle de micro-organismos patogênicos na cavidade bucal (MELO *et al.*, 2015). A compreensão da dinâmica da formação de biofilme contribui diretamente para o estudo de estratégias que visam ao controle

de doenças microbianas bucais relacionadas à presença e quantidade de biofilme microbiano nesse sítio anatômico. Nesse contexto, o objetivo deste capítulo é descrever as metodologias empregadas para o isolamento e identificação de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* da cavidade bucal e estabelecer o perfil de formação de biofilme dos isolados em condições laboratoriais.

2 *Streptococcus mutans*

S. mutans é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa e imóvel com crescimento ideal a 37 °C na presença de 5 a 10% de dióxido de carbono. Agrega-se e forma biofilme bacteriano, metaboliza açúcares, especialmente a sacarose, libera ácido lático que promove desmineralização dental, sendo, portanto, considerado como o principal agente etiológico da cárie humana (ARAÚJO, 2012; MEI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2008).

Os estreptococos mutans estão classificados em quatro subgrupos: C, E, F, K, baseados na composição polissacarídeo ramnose-glicose celular externa: cerca de 75% são tipo C, 20% tipo E e o restante, tipos F ou K. Essa descrição permitiu aprimoramento de estudos sobre mecanismo de ação, infecção e progressão patológica da bactéria (LEMOS *et al.*, 2018).

S. mutans pertence à família *Streptococaceae*, que possui 6 grupos: *mutans*, *anginosus*, *mitis*, *salivarius* encontrados na boca. O grupo *mutans*, por sua vez, engloba as espécies *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. downei*, *S. macacae*, *S. ferus*. O Quadro 1 apresenta um compilado das principais características de cada um.

Além do papel central na etiologia da cárie, *S. mutans* também pode causar a endocardite bacteriana, condição que é desencadeada por micro-organismos presentes na microbiota bucal indígena, dentre os quais figuram *S. mutans* e *Candida*, enterococos e outros estreptococos. Geralmente acomete válvulas cardíacas danificadas, mas pode ocorrer em qualquer parte do endocárdio comprometido, resultando em embolia, infarto, febre baixa e suores e até morte (SCHMALZLE, 2020).

Quadro 1 – Caracterização dos estreptococos do grupo *mutans*

Espécies	Características	Identificação
<i>S. mutans</i>	São isolados aderidos à superfície dentária humana e são grandes metabolizadores de sacarose. Estão relacionados à cárie humana	Fermentação de manitol, sorbitol, lactose, manose e produz ácido em presença de carboidratos. Não fermentam xilose, glicerol. Possuem 3 antígenos polissacarídeos <i>c,e,f</i> . Produzem H_2O_2 . Produzem polissacarídeos extracelulares e intracelulares.
<i>S. sobrinus</i>	São isolados aderidos a superfície dentária humana e podem estar relacionados à cárie dentária em humanos	Fermentação de manitol, lactose, sorbitol, rafinose. Produção de H_2O_2 através da enzima piruvato-oxidase (converte piruvato em acetil-fosfato em presença de O_2 e libera H_2O_2 e CO_2 .)
<i>S. rattus</i>	Isolados da microbiota bucal de roedores. Ocasionalmente, são isolados da boca humana.	Produção de glucano como polissacarídeo extracelular. São acidogênicos a partir de carboidratos assim como <i>S. mutans</i> .
<i>S. ferus</i>	Isolados da microbiota bucal de roedores.	Não sintetizam glucano. São acidogênicos a partir de carboidratos assim como <i>S. mutans</i> e <i>S. rattus</i> .
<i>S. macacae</i>	Isolados da microbiota bucal de primatas	Produção de polissacarídeos extracelulares. São acidogênicos a partir de carboidratos assim como <i>S. mutans</i> , <i>S. rattus</i> e <i>S. ferus</i> .
<i>S. cricetus</i>	Presente na boca de roedores (ratos e hamsters). Ocasionalmente são isolados da boca humana.	Produção de polissacarídeos extracelulares como <i>S. mutans</i> e <i>S. macacae</i> . São acidogênicos a partir de carboidratos. <i>S. mutans</i> , <i>rattus</i> , <i>macacae</i> e <i>ferus</i>

Fonte: Zhou e Li (2015) e Moraes (2011).

3 *Candida albicans*

As leveduras *C. albicans* são células esféricas, aerofacultativas, com crescimento ideal em 30 a 37 °C por 24 a 48 horas em ágar *Sabouraud* Dextrose Cloranfenicol (ASDC), que é o meio mais utilizado para cultivo e isolamento (VASCONCELOS *et al.*, 2019).

O gênero *Candida* tem como principais espécies descritas a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, sendo a *C. albicans* a mais patogênica para humanos (NUCCI *et al.*, 2010). Os processos infecciosos são denominados como candidoses e podem ser do tipo cutâneo-mucosa ou sistêmica. No primeiro grupo, está a candidose oral e genital – tratáveis com antifúngicos menos complexos. Já no segundo grupo, temos o acometimento de órgãos internos ou disseminação sanguínea (ANAISSE; MCGINNIS; PFALLER, 2009).

C. albicans é responsável por 95% dos casos de candidose; geralmente, é um fungo comensal que não apresenta patogenia em indivíduos imunocompetentes (HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016). A capacidade de desencadear uma candidose depende basicamente de imunodepressão, entretanto essa infecção também está diretamente relacionada à virulência da levedura, uma vez que expressa fatores como aderência, polimorfismo, variabilidade fenotípica, produção de exoenzimas, toxinas, biofilme (SANTANA *et al.*, 2013).

C. albicans está presente em cerca de 35% das pessoas saudáveis, sendo mais frequente em recém-nascidos. Os sítios bucais preferidos para colonização são as mucosas, a saliva e o palato, e, neste último a candidose é relativamente comum, devido ao contato do acrílico da prótese apoiado no palato duro (céu da boca) do usuário uma vez que o material plástico é mais propício à retenção e à colonização (ZHOU; LI, 2015). O dorso da língua é o local onde as leveduras estão abundantemente e, a partir desse sítio anatômico, ocorre distribuição para mucosa, dentes, placa e saliva secundariamente (JORGE, 2012).

O micro-organismo possui mecanismos de fixação que lhe atribuem maior virulência. Geralmente, a adesão à boca se dá por

relações eletrostáticas e ligações às superfícies epiteliais da boca. A saliva atua como barreira física e química pela presença de antimicrobianos, como lisozima, lactoferrina e defensinas. O próprio ambiente bucal controla proliferação de *C. albicans* por meio do fluxo salivar ou pelo movimento dos alimentos na mastigação (PETERS *et al.*, 2012).

É fundamental compreender que *C. albicans*, no ambiente bucal humano, tem várias apresentações clínicas. A patogenia está diretamente relacionada à transição morfológica de levedura para hifa, que ocorre como resposta a alterações locais do organismo. As hifas iniciam a fixação, o espalhamento e a candidose por consequência (WALL *et al.*, 2019).

4 FORMAÇÃO DE BIOFILME MICROBIANO NA CAVIDADE BUCAL

O biofilme microbiano é formado na superfície dentária recoberta pela película adquirida composta por proteínas e glicoproteínas da saliva e fluidos gengivais. Essa película é formada em até 15 minutos após a higienização e polimento do esmalte dentário e é considerada como a primeira etapa para a fixação de *S. mutans* e na formação de biofilme dentário (FARIA *et al.*, 2020).

A instalação de biofilme bucal ocorre por etapas: inicialmente, organismos primários grudam na superfície que possui proteínas e substâncias orgânicas. Uma vez aderidas, as células geram microcolônias formadoras de matriz de exopolissacarídeos que funciona como matéria que adere colonizadores secundários e estes podem colar nos organismos primários ou se juntar com outros organismos e posteriormente se aderir aos primários. É importante ressaltar que o biofilme bucal é uma comunidade complexa e distinta que está propensa a alterações locais químicas, físicas ou imunológicas. Logo, a microbiota, quantidade e localização de biofilme bucal, pode mudar entre os indivíduos portadores ou até mesmo no próprio indivíduo (NUNEZ; GARCEZ; RIBEIRO, 2015).

O biofilme microbiano é considerado precursor na instalação e progressão de doenças bucais, como cárie, gengivite e periodontite (PEDRAZZI *et al.*, 2009; SVOBODA *et al.*, 2004). Entretanto, pode ser removido com a escovação dentária devido ao atrito mecânico das cerdas da escova com a superfície dentária e do fio dental nos espaços interdentais (OPPERMANN *et al.*, 2015).

Uma vez instalado e maturado, o biofilme torna-se um emaranhado multipopulacional de micro-organismos que aumentam a acidez e desmineralizam progressiva e irreversivelmente o dente (ZENG; BURNE, 2013). Assim como para *S. mutans* e para *C. albicans*, a formação de biofilme é essencial para patogenicidade no ambiente bucal (JEON *et al.*, 2011).

5 ESTUDO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR MICRO-ORGANISMOS DA CAVIDADE BUCAL

5.1 Obtenção dos micro-organismos

Os micro-organismos avaliados foram obtidos de voluntários estudantes em nossa universidade. As amostras foram coletadas pelos próprios participantes através de salivação não estimulada por meio da escovação. Foram fornecidas escovas dentais descartáveis embaladas individualmente, de cabo reto, cabeça pequena com arestas arredondadas, tamanho 30 cerdas médias para maximizar a remoção dos micro-organismos aderidos às superfícies dentais dos voluntários (LINDHE; LANG; KARRING; 2010, adaptado) (Figura 1).

O método de Bass modificado foi adotado, uma vez que é descrito na literatura como padrão-ouro de higienização para adultos, já que promove remoção adequada de placa e não produz injúrias ao tecido gengival (LINDHE; LANG; KARRING, 2010). Um encarte ilustrado auxiliou a instrução dos participantes sobre os passos da técnica e o tempo da coleta foi cronometrado para ser eventualmente utilizado como variável influenciadora dos resultados.

Os participantes foram orientados a higienizar todas as faces dos dentes e a língua não foi escovada.

Figura 1 – Coleta das amostras bucais de voluntários



Created with BioRender.com

Legenda: Técnica de Bass modificada. 1. Movimentos de vibração leve, englobando de 1 a 2 dentes (vestibular); 2. Movimentos de vibração leve, englobando de 1 a 2 dentes (palatina/lingual); 3. Movimentos de varredura nos dentes anteriores, de cervical para incisal; 4. Movimentos de varredura nos dentes anteriores, de cervical para incisal (palatina); 5. Movimentos de varredura nos dentes anteriores, de cervical para incisal (lingual); 6. Movimento de vaivém nas faces oclusais de todos os dentes, começando pelos últimos; 7. Inserção imediata em solução fisiológica estéril 0,9%.

Fonte: Próprios autores (2021). Criado com BioRender.com e imagem (escova de dente) de pixabay.com

Como a dinâmica da formação do biofilme inicia-se com a agregação dos micro-organismos na película adquirida, a sua proliferação ocorre entre 0 a 4 horas após a limpeza da superfície dentária. Entre 4 e 24 horas, existe uma grande proliferação microbiana e formação de microcolônias; após esse prazo, haverá sucessão microbiana e coagregação entre 1 a 14 dias e, a partir de 2 semanas, já se tem biofilme maduro (CARRANZA *et al.*, 2011). Considerando a dinâmica do crescimento dos biofilmes microbianos, as coletas foram feitas dentro do prazo de 0 a 4 horas, contado a partir da última higienização relatada pelo participante, seguindo os protocolos de período utilizados por Oliveira (2004) e Saraiva (2010), que preconizam 2 e 3 horas, respectivamente.

Após a coleta, as escovas foram acondicionadas em tubos tipo Falcon, contendo 15 mL de solução fisiológica estéril (SFE 0,9%) suficiente para manter a cabeça das escovas imersas. (SOARES *et al.*,

Capítulo 4

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

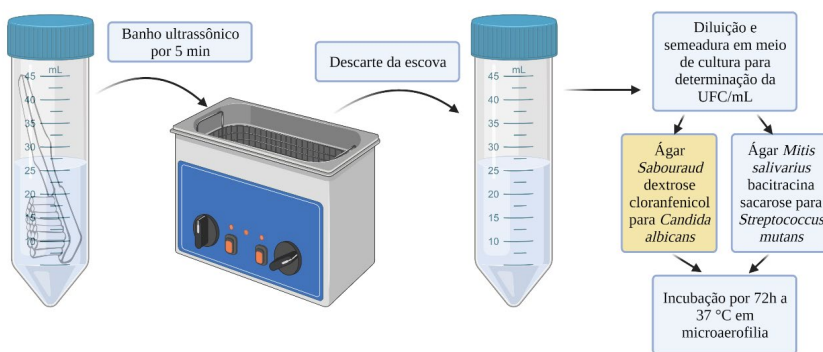
2007). Os tubos foram transportados até o Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Goiás para o processamento.

A execução dos ensaios microbiológicos depende dos cuidados com as coletas, que devem propiciar amostras livres de contaminação ambiental, ao mesmo tempo em que a rapidez do transporte das amostras para processamento no laboratório deve garantir a representatividade da microbiota bucal dos voluntários.

Após as coletas, as escovas encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia foram submetidas a banho ultrassônico por 5 minutos para o desprendimento dos micro-organismos aderidos. Após esse período, os tubos foram agitados e as escovas, removidas e descartadas.

Em seguida, as suspensões resultantes foram diluídas em SFE 0,9% até 10^{-7} e repicadas em placas de ágar *Mitis Salivarius* Bacitracina Sacarose (AMSBS) e ágar *Sabouraud* Dextrose Cloranfenicol (ASDC) para crescimento de *S. mutans* e *C. albicans*, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C em microaerofilia durante 48 a 72 horas para o crescimento dos micro-organismos (Figura 2).

Figura 2 – Processamento microbiológico das amostras obtidas na coleta



Created with BioRender.com

Fonte: Próprios autores (2021). Criado com BioRender.com e imagem (escova de dente) de pixabay.com.

AMSBS é um dos meios seletivos mais utilizados para *S. mutans* devido à adição de 0,2 UI (unidades internacionais) de bacitracina e por conter 20% de sacarose como fonte primária de açúcar. A bacitracina inibe crescimento de *S. cricetus*, *S. downei*, *S. macacae*, *S. ferus*. Por outro lado, *S. mutans*, *S. sobinus* e *S. rattus* são favorecidos por serem resistentes. A presença de cristal violeta na composição do meio evita proliferação de outras bactérias Gram-positivas (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973; JORGE, 2012).

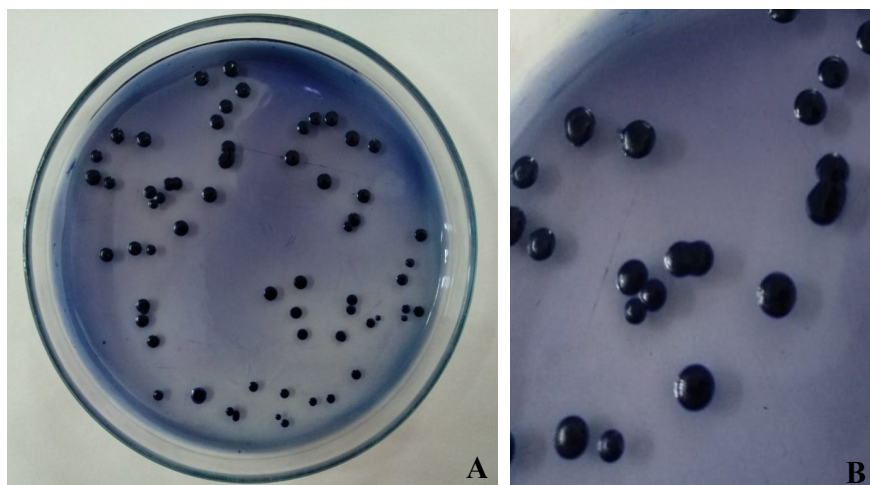
O preparo de AMSBS requer que, após a esterilização e resfriamento a 50 °C, se adicione 1 mL de telurito de potássio 1% previamente esterilizado por filtração, e de 3,3 miligramas de bacitracina em 10 mL de água destilada para cada litro final de preparado de acordo com a metodologia empregada por Campos (2006).

As colônias do *S. mutans* crescidas em AMSBS (Figura 3) têm aspecto liso, brilhante, levemente elevado e arredondado, pegajoso, semelhante a uma gota e/ou aspecto multilocular parecido com vidro moído, com centro elevado e cor azul escura que ao toque, é dura e quebradiça (SARAIVA, 2010; ZHOU; LI, 2015).

Capítulo 4

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

Figura 3 – Morfologia macroscópica de colônias crescidas em ágar *mitis salivarius* bacitracina sacarose (AMSBS) a 37 °C após 72 horas em microaerofilia. A, aspecto geral. B, Detalhe em aproximação. Colônias de cor azul escuro, centro levemente mais escurecido. Centro elevado, aspecto pegajoso

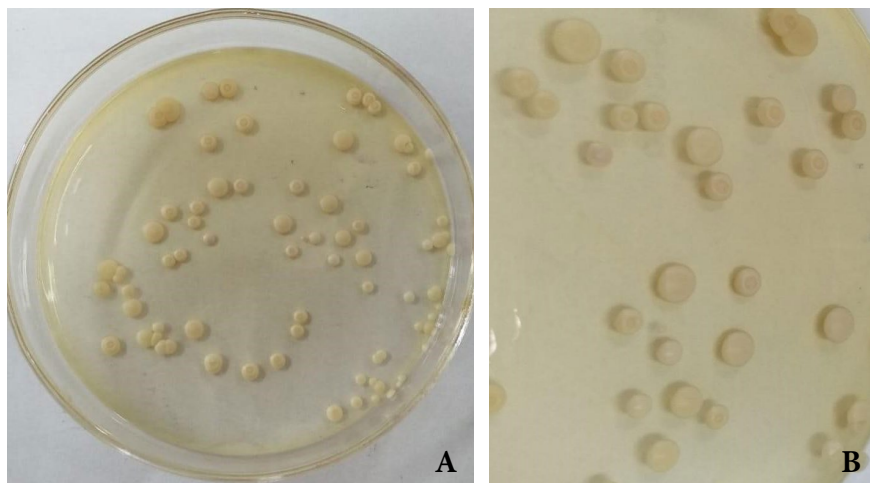


Fonte: Próprios autores (2021).

A morfologia macroscópica típica de *C. albicans* em ASDC (Figura 4) é de colônias esbranquiçadas a amarelas, opacas, com centro levemente mais escurecido que as bordas e cheiro característico de pão (fermentação).

Após os períodos de incubação das placas, foi realizada a identificação presuntiva por meio da análise da morfologia colonial em ambos os meios de cultivo. Assim que identificadas, colônias típicas de *S. mutans* e *C. albicans* foram repicadas em outras placas com ASDC e AMSBS e incubadas para o isolamento do cultivo. A partir dessas placas, 3 a 5 colônias típicas e isoladas foram transferidas para tubos, contendo caldo, infusão, cérebro e coração (BHI) com 20% de glicerol e, após incubação, alíquotas de 1 mL do caldo crescido foram transferidas para tubos *Eppendorfe* e, estes, armazenados em refrigerador a 8 °C durante sete dias e congelamento em *freezer* a -20 °C para armazenamento para as próximas etapas do estudo (SILVA; COSTA; RECHE, 2008, adaptado).

Figura 4 – Morfologia macroscópica de colônias crescidas em ágar *Sabouraud* dextrose cloranfenicol (ASDC) a 37 °C após 72 horas em microaerofilia. A, aspecto geral. B, Detalhe em aproximação. Colônias esféricas esbranquiçadas, centro levemente mais elevado



Fonte: Próprios autores (2021).

5.2 Ensaio da formação de biofilme

Aliquotas congeladas dos micro-organismos foram repicadas em placas com AMSBS e ASDC, conforme descrito previamente. Após a incubação, colônias crescidas típicas foram transferidas para tubos contendo 3 mL de SFE 0,9%. Em seguida, a turvação da suspensão foi ajustada visualmente com a escala 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ ufc/mL) e 0,2 mL foram transferidos para um tubo Falcon com 19,8 mL de caldo BHI e o inóculo inicial dos micro-organismos foi ajustado a $1,5 \times 10^6$ ufc/mL para a realização do ensaio de formação de biofilme.

Uma escova nova foi assepticamente colocada no tubo com a suspensão bacteriana, seguido de homogeneização e incubação (OLIVEIRA, 2004). Logo após, a escova foi transferida para outro tubo contendo 20 mL de SFE 0,9% e agitada em homogenizador por 10 segundos (CAMARGO *et al.*, 2013). Em seguida, a escova foi colocada em outro tubo com 20 mL de SFE 0,9% e submetido a ultrassom por 5 minutos para desprendimento dos micro-organismos associa-

dos ao biofilme formado (CHAVES *et al.*, 2007). Posteriormente, as escovas foram retiradas e a suspensão dos micro-organismos foi diluída e plaqueada para a determinação de número de unidades formadoras de colônias recuperadas do biofilme.

5.3 Ensaio da inibição da formação de biofilme

Os ensaios de inibição da formação de biofilme foram realizados seguindo o mesmo protocolo para os ensaios de formação, entretanto, a formação de biofilme foi verificada na presença de concentrações subinibitórias de digluconato de clorexidina 0,06%, quitosana 1,5% e uma mistura de ambos a proporção de 1:1.

Todos os testes foram feitos em triplicata e os resultados foram organizados como média e desvio padrão. A significância das diferenças encontradas é testada com o teste t de *Student* com nível de significância de 5%.

6 CONCLUSÕES

O controle de biofilme na cavidade bucal constitui um grande desafio e é parte fundamental na garantia da saúde humana. A dinâmica do desenvolvimento dessa estrutura microbiana impacta na etiologia e evolução das doenças bucais. Assim, a higienização incipiente da cavidade oral propicia o contato dos micro-organismos residentes com nutrientes que favorecem o desenvolvimento do biofilme. Nesse contexto, o conhecimento de métodos para a redução da carga microbiana bucal é fundamental para limitar a maturação do biofilme ao menor nível possível (MEYLE; CHAPPLE, 2015).

O potencial da combinação da quitosana com o digluconato de clorexidina abre um panorama no controle de formação de biofilme em escovas dentárias, em outros produtos bucais e na própria cavidade bucal. Sua investigação deve ser estimulada devido à atividade antimicrobiana dos compostos, à viabilidade econômica e à eficiência clínica da associação da clorexidina.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Estadual de Goiás – Câmpus Central – Anápolis – GO. Agradecimento especial ao professor Gustavo Adolfo Martins Mendes, pela sua colaboração imensurável.

REFERÊNCIAS

- AAS, J. A.; GRIFFEN, A. L.; DARDIS, S. R.; LEE, A. M.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E.; LEYS, E. J.; PASTER, B. J. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1407–1417, 2008.
- ALMEIDA, A. K.; GUIMARÃES, M. C. M.; GRISI, D. C.; DAME-TEIXEIRA, N. Doença cárie em portadores de diabetes mellitus: uma revisão narrativa da literatura. **Oral Sciences**, v. 9, n. 1, p. 18-23, 2017.
- ANAISSE, E. J.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. **Clinical Mycology**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- ARAÚJO, N. C.; FONTANA, C. R.; BAGNATO, V. S.; GERBI, M. E. M. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 20, n. 7, p. 293-399, 2012.
- CAMARGO, R. SCHIMIM, S. C.; ALVES, F. B. T.; CHIBINSKI, A. C. R. Avaliação microbiológica da efetividade de uma escova antibacteriana: um estudo *in vivo*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 41, n. 1, p. 54-58, 2013.
- CAMPOS, C. C. **Estreptococos do grupo *mutans*: transmissão vertical entre crianças com Síndrome de Down e suas mães**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- CARRANZA, F. A.; NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.; KLOKKEVOLD, P. R. **Periodontia clínica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- CHAVES, R. A. C.; RIBEIRO, D. M. L.; ZAIA, J. E.; ALVES, E. G.; SOUZA, M. G. M.; MARTINS, C. H. G.; MESTRINER, S. F. Avaliação de soluções antibacterianas na descontaminação de escovas dentais de pré-escolares. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 36, n. 1, p. 29-33, 2007.

Capítulo 4

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

FARIA, J. B.; SANTIAGO, M. B.; SILVA, C. B.; GERALDO-MARTINS, V. R.; NOGUEIRA, R. D. Development of *Streptococcus mutans* biofilm in the presence of human colostrum and 3' -sialyllactose. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 33, p. 1-6, 2020.

FEJERSKOV, O.; NYVAD, B.; KIDD, E. **Cárie dentária: fisiopatologia e tratamento**. 3. ed. São Paulo: Santos, 2017.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 18, p. 1357-1364, 1973.

HAN, T. L.; CANNON, R. D.; VILLAS-BÔAS, S. G. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 8, p. 747-763. 2011.

HILLER, E.; ZAVREL, M.; HAUSER, N.; SOHN, K.; KENTISCHER-BURGER, A.; LEMUTH, K.; RUPP, S. Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host-focus on the function of cell wall proteins. **International Journal of Medic Microbiology**, v. 301, n. 5, p. 384-389. 2011.

HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies and the microbiota. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 149-169, 2016.

JEON, J. G.; ROSALEN, P. L.; FALSETTA, M. L.; KII, H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. **Caries Research**, v. 45, p. 243-263, 2011.

JIN, L.; LI, J.; WANG, J.; JIANG, J.; ZUO, Y.; LI, Y.; YANG, F. Global burden of oral diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health. **Oral Diseases**, v. 22, n. 7, p. 609-619, 2016.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia e Imunologia Oral**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012

LEMOES, J. A.; PALMER, S. R.; ZENG, L.; WEN, Z. T.; KAJFASZ, J. K.; FREIRES, L., A.; ABRANCHES, J.; BRADY, L., J. The Biology of *Streptococcus mutans*. **Gram-Positive Pathogens**, v. 7, p. 435-448, 2018.

LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

MALTZ, M.; GROISMAN, S.; TENUTA, L. M. A.; CURY, J. A. **Cárie dentária: conceitos e terminologia**. 2016. Disponível em: <https://statics-submarino.b2w.io/sherlock/books/firstChapter/128369051.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2020.

MARTIN, R.; WÄCHTLER, B.; SCHALLER, M.; WILSON, D.; HUBE, B. Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. **International Journal of Medical Sciences**, v. 301, n. 5, p. 417-422. 2011.

MEI, M-L.; CHU, C-H.; LOW, K-H.; CHE, C-M; LO, E-C-M. Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 18, n. 6, p. 824-831, 2013.

MELO, N. I.; CARVLHO, C. E.; FRACAROLLI, L.; CUNHA, W. R.; SOLA, V. R. C.; MARTINS, C. H. G.; CROTTI, A. E. M. Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. (Lamiaceae) against cariogenic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 1-7, 2015.

MEYLE, J.; CHAPPLE, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 69, n. 1, p. 7-17, 2015.

MORAES, J. J. C. **Avaliação da função do sistema de dois componentes VicRK na biologia de *Streptococcus sanguinis***. 2011. Tese (Doutorado em Estomatologia) – Faculdade de Odontologia, UNICAMP, Piracicaba, 2011.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.

NUNEZ, S.; GARCEZ, A. S.; RIBEIRO, M. S. **PDT- Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

OLIVEIRA, R. A. **Avaliação do efeito antimicrobiano *in vitro* de quitosana e da associação quitosana/clorexidina sobre a saliva e *Streptococcus mutans***. 2004. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

OPPERMANN, R. V.; HAAS, A. N.; ROSING, C. K.; SUSIN, C. Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America. **Periodontology 2000**, v. 67, n. 1, p. 13-33, 2015.

PEDRAZZI, V.; SOUZA, S. L. S.; OLIVEIRA, R. R.; CIMÕES, R.; GUSMÃO, E. S. Métodos mecânicos para o controle do biofilme dentário supragengival. **Revista Periodontia**, v. 19, n. 3, p. 26-33, 2009.

PEREIRA, D. A.; SENEVIRATNE, C. J.; KIGA-ITO, C. Y.; SAMARANAYAKE, L. P. Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? **Oral Diseases**, v. 24, n. 4, p. 518-526, 2018.

PETERS, B. M.; OVCHINNIKOVA, E. S.; KROM, B. P.; SCHLECHT, L. M.; ZHOU, H.; HOYER, L. L.; BUSSCHER, H. J.; van der Mei, H. C.; JABRA-RIZK, M. A.; SHIRTLIFF, M. E. *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. **Microbiology**, v. 158, n. 12, p. 2975-2986, 2012.

RODRIGUES, A. C. C. **Análise proteômica do biofilme dentário em crianças portadoras de hipomineralização molar-incisivo (HMI)**. 2019. Dissertação

Capítulo 4

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

(Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Ciência da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

SANTANA, D. P.; RIBEIRO, E. L.; MENEZES, A. C. S.; NAVES, P. L. F. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 229-233, 2013.

SARAIVA, M. E. **Quantificação e identificação morfológica e bioquímica para confirmação fenotípica de *S. mutans* e *S. sobrinus*, utilizando o meio de cultura SB-20 modificado: Estudos *in vitro* e *in vivo***. 2010. Tese (Doutorado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

SCHMALZLE, S. A classic and fatal case of *Streptococcus mutans* subacute bacterial endocarditis; a now potentially underappreciated disease. **IDCases**, v. 19, p. 1-3, 2020.

SILVA, A. C. B.; CRUZ, J. S.; SAMPAIO, F. C.; ARAÚJO, D. A. M. Detection of oral streptococci in dental biofilm from caries-active and caries-free children. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 648-651, 2008.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a -20°C. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 1, p. 73-74, 2008.

SOARES, D. G. S.; OLIVEIRA, C. B.; LEAL, C.; DRUMOND, M. R. S.; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana *in vitro* da tintura de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na descontaminação de escovas dentais contaminadas pelo *S. mutans*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 7, n.3, p. 253-257, 2007.

SVOBODA, J. M. Periodontal disease: prophylaxis and oral hygiene procedures. **EMC Dentisterie**, v. 1, p. p. 349-360, 2004.

TORTORA, G. T.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VASCONCELOS, G. L.; LOURENÇO, L. S.; SILVA, R. M.; PUCCI, F. V. C. Atividade antifúngica dos *Lactobacillus* presentes no iogurte sobre a *Candida albicans in vitro*. **REVISA**, v. 8, n. 3, p. 322-328, 2019. Disponível em: <http://revistafacsa.senaaires.com.br/index.php/revisa/article/view/428/323>. Acesso em: 31 jul. 2020.

WALL, G.; JAUREGUI-MONTELONGO, D.; BONIFACIO, B. V.; RIBOT-LOPEZ, J. L. L.; UPPULURI, P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 1-6, 2019.

WILLIAMS, D. L.; JORDAN, R. P. C.; WEI, X. Q.; ALVES, C. T. A.; WISE, M. P.; MELANIE, J. W.; LEWIS, M. A. O. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. **Journal of Oral Microbiology**, v. 5. n. 22434, p. 1-8, 2013.

ZENG, L.; BURNE, R. A. Comprehensive mutational analysis of sucrose-metabolizing pathways in *Streptococcus mutans* reveals novel roles for the sucrose phosphotransferase system permease. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 4, p. 833-843, 2013.

ZHOU, X.; LI, Y. **Atlas of oral microbiology: from healthy microflora to disease**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.



Capítulo 5

CULTURA CELULAR NO DESENVOLVIMENTO DE NOVAS TERAPIAS ANTIVIRAIS

ANA CAROLINE DE SOUZA BARNABÉ
ELIETE SOUZA SANTANA
ANA PAULA DE MORAES

1 INTRODUÇÃO

As terapias antivirais são uma das maiores conquistas da humanidade em termos de diminuição das doenças. Em sua maioria, são de caráter preventivo, como as vacinas que servem para estimular o sistema imunológico, pois, ao serem aplicadas, elas introduzem vírus ou bactérias inativas no organismo e fazem com que o sistema imunológico reconheça agentes que causam doenças, produzindo anticorpos que evitam as moléstias causadas por esses microrganismos (BOUSADA; PEREIRA, 2017).

O desenvolvimento de novas terapias antivirais tem arregimentado esforços de laboratórios e grupos de pesquisa do mundo inteiro, pois possui magnitude de impacto sanitário, social, econômico e político, o que torna este tema bem atual na área das ciências da saúde. A pesquisa, desenvolvimento e inovação desses produtos possui caráter interdisciplinar, pois necessita da existência de uma capacitação tecnológica de alto nível em diferentes áreas do conhecimento, com destacada participação das ciências básicas, aliando os campos mais avançados da ciência biológica, como biologia molecular, genética molecular, imunologia molecular,

genômica, proteômica, bioinformática, engenharia genética e biotecnologia em geral (HOMMA *et al.*, 2003). Deve-se dispor de laboratórios dotados de infraestrutura adequada, com equipamentos modernos, e que atendam às normas de boas práticas de laboratório e biossegurança.

Uma grande dificuldade imposta pelos vírus advém de sua própria natureza biológica. Diferentemente de bactérias e fungos, que são organismos vivos e autônomos, os vírus não são muito mais que pequenos complexos de proteínas e ácidos nucleicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Sem o maquinário celular necessário à sua sobrevivência autônoma, são parasitas intracelulares obrigatórios, razão pela qual, uma vez dentro do corpo humano, rapidamente tentam invadir e se estabelecer nas células pelas quais nutrem afinidade.

O desenvolvimento de técnicas laboratoriais permite manter células vivas e em crescimento, que simulam as condições naturais em um ambiente artificial (*in vitro*) com o objetivo de estudar a sua fisiologia e bioquímica. Dessa forma, um grupo particular de células pode ser cultivado em grandes quantidades para estudar suas atividades, diferenciações e proliferações.

Nesse sentido, a cultura de células se tornou um método valioso para estudar seus mecanismos de operações, sendo empregada em diversas áreas, na obtenção de produtos para saúde. Sua aplicação compreende desde pesquisas sobre o câncer até a fabricação de vacinas, produção de proteína recombinante, seleção e melhoria de medicamentos, terapia genética, biologia de células-tronco e tecnologia de fertilização *in vitro*.

A pesquisa de terapias antivirais com a utilização de culturas celulares tem contribuído para o avanço da ciência contemporânea, evoluindo constante e radicalmente há mais de um século. Nesse contexto, o presente capítulo tem como objetivo descrever e enfatizar a importância da cultura celular na pesquisa, desenvolvimento e inovação de terapias antivirais.

2 CULTURA CELULAR

As doenças infecciosas têm representado grandes desafios para a saúde humana e para a sobrevivência da população mundial. Nos últimos anos, agentes infecciosos emergentes representaram um grande perigo para saúde pública, especialmente aqueles que causam doenças virais. Os vírus de RNA, como, por exemplo, o Sars Cov 2, são mais propensos a causar doenças emergentes, devido à sua replicação rápida e a altas taxas de mutação (LINDAHL; GRACE, 2015). Os estudos dos mecanismos das doenças virais, terapias antivirais e vacinas são fundamentais para responder qualquer questionamento a respeito de doenças virais. Antes de realizar estudos clínicos *in vivo*, os ensaios *in vitro* precisam ser conduzidos para saber qual o nível de citotoxicidade do fármaco para a célula e em qual fase de replicação do vírus o composto antiviral age. Desse modo, as culturas celulares são utilizadas por serem mais bem adaptadas à multiplicação viral e disporem de outras vantagens, como melhor controle físico-químico do ambiente de cultivo, maior homogeneidade das amostras e menor custo.

A cultura celular é a técnica pelo qual células humanas, animais ou de invertebrados são cultivadas em ambiente artificial favorável ao seu crescimento (VERMA *et al.*, 2020). Os primeiros estudos relacionados à cultura celular são relatados há mais de um século. Ross Harrison (1870–1959) e Leo Loeb (1869–1959), no início do século XX, utilizaram em experimentos pedaços de órgãos mantidos vivos em tubos de ensaio usando coágulos de sangue, ágar e soluções de sal como o meio de cultura líquido (TAYLOR, 2014). O primeiro registro de isolamento viral em cultura de células ocorreu em 1913 com o vírus vaccinia foi cultivado em culturas de células. Posteriormente, durante a década de 1930, tanto o vírus da varíola quanto o vírus da febre amarela foram propagados em culturas celulares, com o objetivo de produção de vacinas. A partir da década de 1950, o interesse em usar culturas celulares para isolamento viral aumentou devido à

descoberta da capacidade de proliferação dos poliovírus em cultura de células (LELAND; GINOCCHIO, 2007).

A cultura celular é basicamente dividida em dois tipos principais de cultivos celulares: os cultivos primários e as linhagens celulares. Os cultivos celulares primários são obtidos diretamente de órgãos ou tecidos por ação química, ou mecânica, ou enzimática (VERMA *et al.*, 2020). Esse tipo de cultura possui maior sensibilidade para propagação viral, pois detêm características fisio-morfológicas semelhantes aos órgãos originais. As linhagens celulares ou linhagens contínuas são formadas por células derivadas de células tumorais ou de tecidos normais que passaram por transformação *in vitro*. Esse tipo de cultivo celular é utilizado na maioria dos laboratórios, por apresentar uniformidade, estabilidade e maior facilidade de manuseio (BRUM; WEIBLEN, 2012).

Em relação à forma de crescimento, as culturas celulares são classificadas em suspensão e em aderência. As células em suspensão crescem suspensas em meio de cultura, sendo capazes de sobreviver e proliferar sem fixação ao recipiente da cultura. As células aderentes, por sua vez, crescem, formando uma monocamada ligada à superfície do recipiente de cultura. A vantagem desse tipo celular é o seu uso em ensaios de microscopia e hibridizações (BARKER, 1998).

Outro tipo de cultura celular é a tridimensional (3D), modelo bastante recomendado para o estudo de novos fármacos (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013). Uma das principais vantagens do uso das células 3D é a de apresentarem características que estão mais próximas das complexas condições *in vivo* do hospedeiro (RAVI *et al.*, 2015). Na cultura celular 3D, as células são cultivadas em ambientes reproduzindo a matriz-extracelular do tecido *in natura*. As respostas bioquímicas e fisiológicas são mais parecidas com as encontradas no hospedeiro de origem da linhagem celular (WANG *et al.*, 2014).

3 MEIOS DE CULTURA CELULAR

Os meios de cultura celulares, são utilizados com base no tipo de célula, a origem (espécie animal) e a finalidade da cultura. Um exemplo de meio de cultura é o MEM (*Minimum Essential Medium*), desenvolvido por Harry Eagle, em 1934. Esse meio de cultura sintético apresenta componentes mínimos necessários (sais inorgânicos, açúcar, aminoácidos essenciais e vitaminas solúveis em água), havendo necessidade de suplementação com soro. Além do MEM, também são utilizados na cultura celular outros tipos de meios de cultura, como o DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco), meios Medium 199 e Ham's F-12, entre outros (YAO; ASAYAMA, 2017).

O soro no cultivo celular serve como fonte de aminoácidos, proteínas, vitaminas, carboidratos, lipídios, hormônios, fatores de crescimento, sais inorgânicos, entre outros compostos. Também auxilia a melhora do tamponamento do pH do meio, reduz a tensão de cisalhamento (danos físicos que podem ser causados pela manipulação e agitação da pipeta) e permite uma melhor aderência das células. A escolha do tipo de soro baseia-se nas suas características e no tipo de cultura. O soro fetal bovino (FBS) é o tipo de soro mais utilizado atualmente. O soro fetal bovino é rico em fatores de crescimento e contém baixos níveis de gamaglobulinas (que têm um inibidor de crescimento celular). Outro soro também usado em cultivo celular é o soro equino (YAO; ASAYAMA, 2017).

4 CRIOPRESERVAÇÃO DE CULTURAS CELULARES

Para a preservação e o armazenamento das linhagens celulares, é utilizada a criopreservação. Em temperaturas criogênicas, os processos químicos, biológicos e físicos que ocorrem normalmente no nível celular podem permanecer suspensos temporariamente. No entanto, durante os ciclos de congelamento e descongelamento, as células, inevitavelmente, sofrem de lesões criogênicas. A formação e

o crescimento de gelo durante a criopreservação podem danificar mecanicamente a estrutura biológica das células (YANG *et al.*, 2020).

Para evitar estas lesões celulares e aprimorar o armazenamento celular em temperaturas criogênicas, utiliza-se crioprotetores. Os crioprotetores celulares podem ser classificados em permeáveis e não permeáveis na membrana celular da célula a ser preservada. Comumente, essa permeabilidade é estimulada por um gradiente de concentração e confere proteção intracelular às células. No entanto, a maioria dos crioprotetores permeáveis causam toxicidade à célula. São exemplos de crioprotetores permeáveis o glicerol e o dimetilsulfoxido (DMSO) (GURRUCHAGA *et al.*, 2018).

Os crioprotetores não permeáveis protegem apenas extracelularmente a célula. Geralmente, seu uso é combinado com crioprotetores permeáveis. Carboidratos naturais não tóxicos, como a trealose, a sacarose e biomacromoléculas, como proteínas e polímeros, são empregados como crioprotetores não permeáveis (ELLIOTT *et al.*, 2017). Para a maioria dos tipos celulares, o protocolo de criopreservação convencional envolve o congelamento gradual da célula, utilizando DMSO de 10 a 20% (YANG *et al.*, 2020). O DMSO é bastante usado por apresentar baixa toxicidade. O soro fetal bovino é um criopreservante não permeável utilizado em combinação com o DMSO para várias linhagens celulares, pois suporta uma melhor recuperação celular (VARMA *et al.*, 2015).

5 CONTAMINAÇÃO EM CULTURA CELULAR

Um dos grandes problemas no uso de culturas celulares é a contaminação, principalmente por micoplasma, constituindo uma ameaça para laboratórios acadêmicos e para a indústria biofarmacêutica (ARMSTRONG; MARIANO; LUNDIN, 2010). Os laboratórios de cultura celular devem estabelecer procedimentos regulares de teste de micoplasma na forma de um programa de triagem de rotina. Além disso, recomenda-se a realização a detecção de mico-

plasma por PCR em soros, meios de culturas, suplementos e linhagens celulares. Todas as linhagens celulares novas recebidas no laboratório devem ficar em quarentena até que o *status* de contaminação seja verificado (WINNER; ROSENGARTEN; CITTI, 2000).

O uso geral de antibióticos em culturas celulares não é recomendado, exceto em casos especiais ou por breves períodos. O uso contínuo pode levar a lapsos na técnica asséptica, à seleção de microrganismos resistentes a antibióticos e à detecção tardia de infecção por micoplasmas ou outras bactérias. É recomendável que estoques principais de linhagens celulares livres de contaminação sejam armazenados adequadamente para fornecer suprimento de células, caso os estoques em funcionamento estejam contaminados. As linhagens celulares contaminadas devem ser descartadas ou tratadas o mais rápido possível, a fim de impedir propagação para outras células (DREXLER; UPHOFF, 2002).

6 MULTIPLICAÇÃO VIRAL EM CULTURA CELULAR

Os vírus só replicam no interior de células, portanto, o seu isolamento necessita de hospedeiros apropriados. A propagação do vírus em linhagens celulares permite que quantidades mínimas de partículas virais sejam detectadas e posteriormente caracterizadas (BRUM; WEIBLEN, 2012). A detecção do crescimento viral nas células é feita pela observação do efeito citopático (ECP), cujas alterações celulares podem ser visualizadas ao microscópio óptico invertido. O ECP é característico para cada grupo de vírus (RÁCZ, 2008). Os principais ECP produzidos pelos vírus são a vacuolização do citoplasma, a formação de células gigantes multinucleadas denominadas sincícios e o arredondamento celular (PAYMENT, 2007; BRUM; WEIBLEN, 2012).

O título viral é determinado pela maior diluição capaz de produzir infecção, considerando o ECP ou antígenos virais, em 50% dos cultivos celulares. Os valores obtidos nesses testes em placas, contendo o vírus e a cultura celular, são submetidos a cálculos mate-

máticos, como exemplo o método de Reed & Muench, bastante utilizado para cálculo do título viral (BRUM; WEIBLEN, 2012).

7 ENSAIO VIRAL EM CULTURA CELULAR

Quando se buscam novas drogas antivirais, são realizados ensaios em placas de cultura, nas quais o vírus é colocado em contato com o fármaco a ser estudado. Os ensaios antivirais são realizados com o objetivo de selecionar um fármaco que reduza ou inative a replicação viral em uma concentração que não seja tóxica para a célula (SIMONI, 2003).

Além do potencial virucida, outro ponto que deve ser considerado no estudo de um novo fármaco antiviral é o seu efeito tóxico nas células. Um fármaco antiviral ideal deve apresentar um mínimo de toxicidade para a célula hospedeira. A atividade citotóxica de um composto antiviral é feita pelo teste de citotoxicidade. As células contendo o composto antiviral são coradas e a citotoxicidade é determinada com base nas alterações morfológicas das células com o antiviral quando comparadas com as células controle (DE BRUYNE; BERGHE, 1997). O brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2y-l)-2,5-difenil tetrazolium], conhecido por MTT, é um corante utilizado para medir a atividade metabólica celular, indicando viabilidade, proliferação e citotoxicidade celular. O ensaio de MTT é um ensaio colorimétrico que consiste na redução do MTT em cristais roxos de formazan por células metabolicamente ativas. Os cristais de formazan insolúveis são dissolvidos com uma solução de solubilização e a solução colorida resultante é quantificada medindo a absorbância em espectrofotômetro. Quanto mais escura for a solução, maior será o número de células viáveis e metabolicamente ativas (VISTICA *et al.*, 1991).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para as doenças infecciosas virais, uma das principais medidas sanitárias adotadas é a vacinação. No entanto, quando o hospedeiro já se encontra infectado, são utilizados fármacos antivirais para o tratamento dos pacientes. Para isso, a cultura celular é a técnica mais empregada durante os ensaios de seleção de candidatos a fármacos antivirais, analisando a inibição da ação viral e a toxicidade do fármaco.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2017.
- ARMSTRONG, S. E.; MARIANO, J. A.; LUNDIN, D. J. The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 211-213, 2010.
- BARKER, K. **Na Bancada**: Manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas. Porto Alegre: Artmed, 1998.
- BOUSADA, G. M.; PEREIRA, E. L. Produção de vacinas virais Parte I: engenharia de bioprocessos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 15, n. 1, p. 309-332, jan./jul. 2017.
- BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5-6, p. 240-249, 2013.
- BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. p. 55-80.
- DREXLER, H. G.; UPHOFF, C. C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. **Cytotechnology**, v. 39, p. 75-90, 2002.
- ELLIOTT, G. D.; WANG, S. P.; FULLER, B. J. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, v. 76, p. 74-91, 2007.
- GURRUCHAGA, H.; SAENZ DEL BURGO, L.; HERNANDEZ, R. M.; ORIVE, G.; SELDEN, C.; FULLER, B.; CIRIZA, J.; PEDRAZ, J. L. Advances in the slow freezing cryopreservation of microencapsulated cells. **Journal of Controlled Release**, v. 281, p. 119-138, 2018.

HOMMA, A.; MARTINS, R. M.; JESSOUROUM, E.; OLIVA, O. Technological development: a weak link in vaccine innovation in Brazil. **História, Ciências, Saúde**. Manguinhos, v. 10 (sup. 2), p. 671-696, 2003.

JUNQUEIRA, L. U.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

LELAND, D. S.; GINOCCHIO, C. C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 49-78, 2007.

LINDAHL, J. F.; GRACE, D. The consequences of human actions on risks for infectious diseases: a review. **Infection Ecology & Epidemiology**, v.5, p. 1-11, 2015.

PAYMENT, P. Cultivation and Assay of Animal Viruses. In: HURST, C.; CRAWFORD, R.; GARLAND, J.; LIPSON, D.; MILLS, A.; STETZENBACH, L. (Ed.). **Manual of Environmental Microbiology**. 3. ed. Washington DC: ASM Press, 2007. p 93-100.

RÁCZ, M. L. Cultivo de vírus. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008, p. 577-580.

RAVI, M.; PARAMESH, V.; KAVIYA, S. R.; ANURADHA, E.; SOLOMON, P. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 1, p. 16-26, 2015.

SIMONI, I. C. Tratamentos antivirais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 65, n. 1-2, p. 41-44, 2003.

TAYLOR, M. W. **Viruses and man: A history of interactions**. Switzerland: Springer International Publishing, 2014.

VARMA, V. P.; DEVI, L.; VENNA, N. K.; MURTHY, C. H. L.; IDRIS, M. M.; GOEL, S. Ocular Fluid as a Replacement for Serum in Cell Cryopreservation Media. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. 1-17, 2015.

VERMA, A.; VERMA, M.; SINGH, A. Animal tissue culture principles and applications. **Animal Biotechnology**, p. 269-293, 2020.

VISTICA, D. T.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, M. R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Research**, v. 51, n. 16, p. 2515-2520, 1991.

VLIETINCK, A. J.; DE BRUYNE, T.; BERGHE, D. A. V. Plant Substances as Antiviral Agents. **Current Organic Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 307-344, 1997.

WANG, C.; TANG, Z.; ZHAO, Y.; YAO, R.; LI, L.; SUN, W. Three-dimensional in vitro cancer models: a short review. **Biofabrication**, v. 6, n. 2, p. 1-9, 2014.

Capítulo 5

CULTURA CELULAR E TERAPIAS ANTIVIRAIS

WINNER, F.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. In Vitro Cell Invasion of Mycoplasma gallisepticum. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4238-4244, 2000.

YANG, J.; GAO, L.; LIU, M.; SUI, X.; ZHU, Y.; WEN, C.; ZHANG, L. Advanced Biotechnology for Cell Cryopreservation. **Transactions of Tianjin University**, v. 26, p. 409-423, 2020.

YAO, T.; ASAYAMA, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 16, n. 2, p. 99-117, 2017.



Capítulo 6

TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA USO EM SAÚDE

LUCIANA REBELO GUILHERME
ALINE FERNANDES BARCELOS

1 INTRODUÇÃO

O uso de sistemas nanoestruturados na área da saúde é extensamente explorado, devido a suas propriedades singulares. Podemos encontrar sistema nanoestruturados aplicados nas mais diversas áreas da saúde, com variedade incrível de funcionalidades, podem ser relacionadas, por exemplo: ao monitoramento de doenças, por meio de nanossensores; ao tratamento de doenças, por meio de fármacos nanoestruturados e/ou terapias incluído nanomateriais; ao diagnóstico precoce de possíveis enfermidades, por meio de kits de diagnósticos contendo nanocompostos, dentre tantos outros usos. Antes de ser empregado em sistemas biológicos, é necessário conhecer suas propriedades físicas e químicas cuidadosamente. Para tanto, se faz necessária a caracterização destes nanossistemas. A caracterização pode ser realizada basicamente por meio de técnicas de espectroscopia, de microscopia e de difratometria. Com essa gama variada de técnicas de caracterização, é possível realizar uma análise cuidadosa da composição, da estrutura, da morfologia, das fases cristalinas e da estabilidade físico-química dos sistemas nanoestruturados. Sendo assim, o obje-

tivo deste capítulo é apresentar como essas técnicas podem ser utilizadas para caracterizar sistemas nanoestruturados.

2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

O capítulo será inicialmente dividido em técnicas de caracterização: (i) por imagem, com ênfase em microscopia eletrônica; (ii) por difratometria, com ênfase em difração de raios X (DRX) de pó e (iii) por espectroscopia, com ênfase em correlação de fótons.

2.1 Caracterização por imagem

De Galileu Galilei (1564-1642), Antony van Leeuwenhoek (1632– 1723), Robert Hooke (1635 – 1703) a Ahmed Zwail (1946 -2016), é inegável o avanço da ciência como consequência da observação de imagens, principalmente no que diz respeito aos avanços na saúde, visto que permitem aumentar o alcance do olho humano (PORTER, 1976). Com o advento das microscopias de super-resolução, espera-se que vários processos biológicos sejam esclarecidos, principalmente no que tange à ligação de nanoestruturas às células e suas consequências (GRAND VIEW RESEARCH, 2020).

As imagens auxiliam na compreensão das características dos materiais nanoestruturados, bem como, por meio de observação, determinar a qualidade do nanossistema proposto. Por meio das microscopias, é possível analisar o arranjo atômico da rede cristalina; a estrutura química; a morfologia da superfície; além de fornecer dados de qualidade sobre propriedades como: topografia, análise química, fractografia, entre outras (GRAND VIEW RESEARCH, 2020).

No Quadro 1, resumimos os tipos atuais de microscopias, seus alcances em termos de ampliação, exemplos do que pode ser observado por cada uma delas e por quem basicamente foram desenvolvidas ou popularizadas. O Quadro 1 visa localizar, temporalmente, o desenvolvimento de técnicas de caracterização por meio de imagens, sejam elas de sistemas biológicos complexos, sejam elas para observar reações químicas que auxiliem na compreensão destes sistemas.

Quadro 1 – Resumo dos tipos de microscopias e suas peculiaridades

Tipo de Microscópio	Ampliação/ Magnificação/ Tempo	O que pode ser observado?	Desenvolvido em/por
Microscópio óptico	40 a 280 x	Descrever bactérias, células vermelhas do sangue e a vida em uma gota de água.	1632-1723/Anton van Leeuwenhoek (PORTER, 1976)
Microscópio composto por duas lentes	10 a 300 x	Observar pêlos em uma pulga. Poros na cortiça.	1635-1703/Robert Hook (MARTINS, 2011)
Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET ou TEM)	8.000 x	Observar a fibra de um fio de algodão.	1932/Max Knoll e Ernst Ruska (LAMBERT; MULVEY, 1996)
	800.000 x	Resolução atômica	1975/Ernst Ruska (LAMBERT; MULVEY, 1996)
Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV ou SEM)	300.000 x	Aparelhos modernos permitem análise da maior parte de materiais sólidos.	1935/Max Knoll (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007)
Microscópio Eletrônico de Varredura por Transmissão (STEM)	8.000x	Cristal de ZnO	1938/Von Ardenne (VON ARDENNE, 1938)
Microscopia Óptica Confocal	300.000 x	Imagens de células e tecidos fixos ou vivos.	1955/Marvin Minsky (PADDOCK; FELLERS; DAVIDSON, 2020)

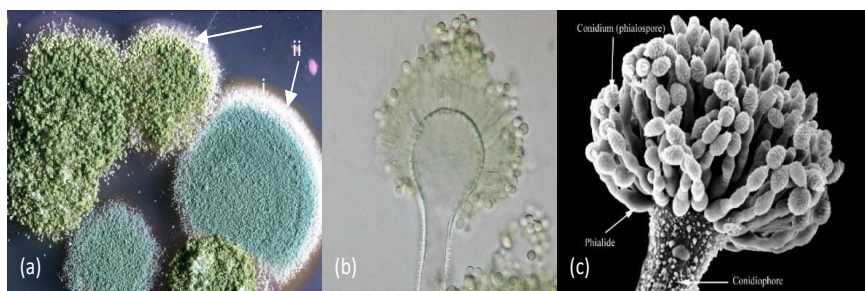
Tipo de Microscópio	Ampliação/ Magnificação/ Tempo	O que pode ser observado?	Desenvolvido em/por
Microscópio de Tunelamento (STM)	100 milhões x	Pilhas de átomos presentes na ponta da agulha.	1981/Gerd Binning e Heinrich Rohrer (VALADARES, 1992)
Microscópio Óptico de Campo Próximo – (SNOM)	50 a 200 nm	Topografia de superfícies	1984/D.W.Pohl, W.Denk and M. Lanz.
Microscópio de Força Atômica – (AFM)	Milhões x	Resolução atômica, propriedades mecânicas	1985/Binning, Gerber, Quate (FERREIRA; YAMANAKA, 2006)
Microscópio ultra-rápido	nanossegundos	Movimento elétrons e átomos individuais, crescimento intermedário de cristais.	1987/Bostanjoglo, Tornow e Tornow (BOSTANJOGLO; TORNOW; TORNOW, 1987)
Microscópio eletrônico 4D	femtossegundos	reações químicas em tempo real.	1999/ Ahmed Hassan Zewail (FLANNIGAN; ZEWEIL, 2012; LOBASTOV; SRINIVASAN; ZEWEIL, 2005; ZEWEIL, 1980, 1988, 1993)

Fonte: Próprios autores (2020).

Como mostrado no Quadro 1, cada tipo de microscopia é capaz de fornecer diferentes informações acerca de nanobiosistemas. Sistemas biológicos podem ser monitorados por intermédio de microscópios óticos, em que os constituintes celulares podem ser diferenciados claramente com o auxílio de corantes. Por outro lado, a observação de nanoestruturas por meio de microscópios óticos convencionais em geral era limitada, pois a ampliação máxima destes não permitia visualizar as estruturas em escala nanométrica. Já as microscopias eletrônicas são capazes de fornecer imagens, até mesmo, de átomos individuais. No entanto, os constituintes celulares nessas imagens são vistos basicamente nas cores preto e branco, o que não impede que as imagens forneçam valiosas informações sobre a morfologia, tamanho e estado de agregação dos sistemas estudados. Mas, em pouco tempo, microscopias óticas com amplificadores sem ressonância, pulsos de lasers e campo próximo poderão ser popularizados, e as escalas nanométricas também farão parte da rotina da pesquisa nanobiotecnológica (CAMPAGNOLA *et al.*, 2001; LEWIS *et al.*, 1990, 1999; SINGH *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2020; ZHU; UDUPA; GODDARD, 2020).

Na Figura 1, exemplificamos, por intermédio de micrografias, a diferença entre as imagens, obtidas por meio de microscopias óticas (Figuras 1a e 1b) e microscopias eletrônicas (Figura 1c). Na Figura 1, pode-se observar que existem duas espécies distintas: o *Aspergillus flavus* (i) e o *Penicillium cyclopium* (ii). A imagem foi gerada por meio de microscopia ótica. Nela, observam-se distintas colorações para as duas espécies, contudo, os detalhes das estruturas individuais não ficam claros devido a ampliação da imagem ser limitada. Na Figura 1b, apesar de tratar-se também de micrografia ótica, a ampliação é maior e notam-se as peculiaridades do *Aspergillus flavus*, como as fiálides. Na Figura 1c, apesar de a imagem ser em preto e branco, detalhes da morfologia do *Aspergillus flavus*, como os conidióforos, podem ser perfeitamente observados. Isso só é possível devido à impressionante ampliação da imagem (BARRON, 2013a,b; MEDMYCO, 2016).

Figura 1 – (a) *Aspergillus flavus* (i) e *Penicillium cyclopium* (ii); (b) microscopias óticas e (c) microscopia eletrônica de varredura – MEV



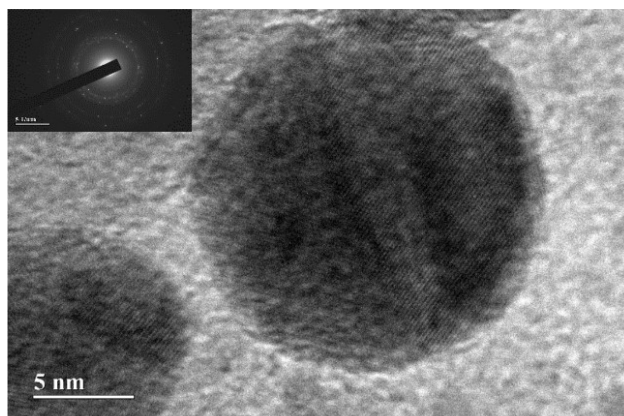
Fonte: Barron (2013 a,b) e MEDMYCO (2016).

As microscopias eletrônicas, diferentemente das microscopias óticas convencionais, que utilizam luz para gerar imagens, utilizam feixe de elétrons que incidem sobre a amostra para gerar as imagens bidimensionais chamadas de micrografias eletrônicas. As microscopias eletrônicas mais comuns utilizadas para caracterização de sistemas nanoestruturados em sistemas biológicos são a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Um excelente exemplo da necessidade de obter imagens de microscopia eletrônica sejam elas MEV ou MET pode ser observado no trabalho de Vigneshwaran *et al.* (2007). As imagens de MEV, utilizadas no referido trabalho, mostram que é possível diferenciar um micélio fúngico do *Aspergillus flavus* incubado com água deionizada de um micélio fúngico incubado com solução de nitrato de prata 1,0 mM por 72 h. O trabalho mostra claramente as nanopartículas de prata (NP-Ag) depositadas na superfície do micélio fúngico incubado com solução de nitrato de prata. Nesse exemplo, o uso da micrografia eletrônica foi essencial para conseguir constatar que o fungo possui a capacidade de sintetizar nanopartículas de prata. Com o auxílio da MET, os autores puderam, ainda, verificar que o fungo, além de sintetizar NP-Ag, o fazia com forma e tamanho controlados, forma esférica e tamanho médio de $8,92 \pm 1,92$ nm (razoavelmente monodisperso e com pouca aglomeração) (VIGNESHWARAN *et al.*, 2007).

A Figura 2, que apresenta uma micrografia de uma NP-Ag aproximadamente esférica e com 18 nm, mostra que a MET pode, ainda, auxiliar a confirmação da estrutura cristalina de amostras metálicas. Para isso utiliza-se a área de uma partícula individual e, por meio do padrão de difração de raios X de área selecionada, *in set*, é possível determinar que as NP-Ag, neste caso, pertencem ao sistema cristalino cúbico de face centrada (cfc). As distâncias dos halos de difração são medidas e comparadas aos padrões presentes na literatura e essa etapa normalmente é realizada quando se obtém os dados.

Figura 2 – Micrografia de nanopartículas de prata



Fonte: Próprios autores (2019).

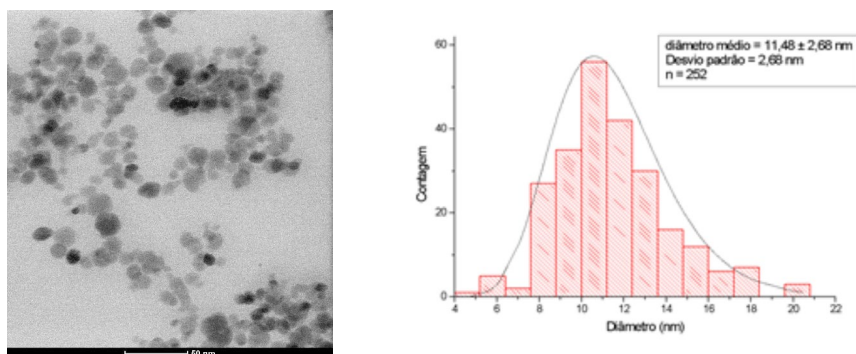
Outra informação importante a ser obtida por MEV ou por MET é o tamanho médio dos materiais nanoestruturados. A Figura 3a apresenta uma micrografia de nanopartículas de óxido de ferro e a Figura 3b mostra um histograma de distribuição de diâmetro das nanopartículas, realizado no software *Origin 6.0*. Esses dados foram obtidos realizando-se uma contagem do diâmetro médio das partículas contidas em cada micrografia, utilizando-se o software *IPEX32*, via contagem manual. O valor médio do diâmetro (11,48 nm) pôde ser calculado e o histograma de distribuição de tamanho pôde, então, ser construído. A estatística permitiu, ainda, determinar o desvio padrão ($\pm 2,68$ nm) dos dados e o índice de dispersão

(ou polidispersão) da amostra obtido (0,054) mostra que a distribuição de tamanho é homogênea, ou seja, indica que se trata de uma amostra relativamente monodispersa. O índice de dispersividade (ID) é definido como o desvio padrão (σ) da distribuição do diâmetro das partículas dividido pelo diâmetro médio das partículas, conforme a Equação 1 (CLAYTON *et al.*, 2016).

$$ID = \left(\frac{\sigma}{d} \right)^2 \quad (\text{Equação 1})$$

Falaremos mais sobre polidispersão na seção 2.3. A determinação desses parâmetros pode auxiliar no entendimento dos efeitos dos nanomateriais em sistemas biológicos.

Figura 3 – MET de uma amostra de nanopartículas de óxido de ferro (esquerda) e histograma de distribuição no tamanho das nanopartículas de óxido de ferro (direita)

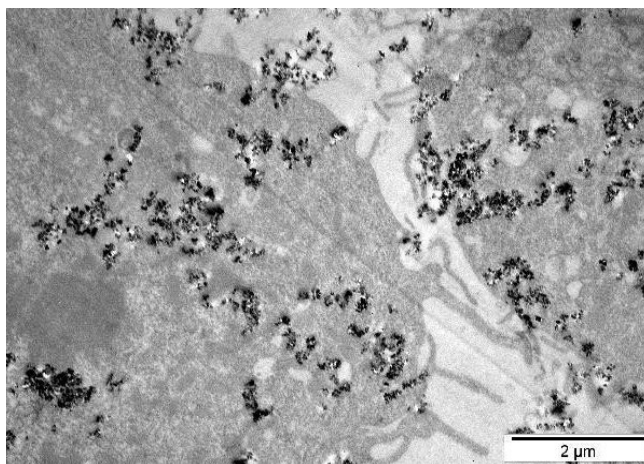


Fonte: Próprios autores (2020).

É conhecido que sistemas biológicos podem diferenciar a forma (GAGNER *et al.*, 2011), o tamanho (JIANG *et al.*, 2008) e o estado de agregação dos nanocomposto (LANKOFF *et al.*, 2012). No trabalho de Lu *et al.* (2009), por exemplo, foi verificado, em células HeLa, que a internalização de nanopartículas de sílica mesoporosa era limitada pelo tamanho de 50 nm. Lankoff *et al.* (2012) apresentam microgra-

fias em que materiais nanoestruturados à base de prata ou de óxido de titânio são capazes de permear células e encontrou esses nanomateriais no núcleo de células hepáticas humanas, bem como em células epiteliais humanas da linhagem A549, Figura 4. No trabalho, os autores concluem que o estado de agregação pode, sim, induzir efeito citotóxico frente a diferentes linhagens células. Desse modo, o uso das micrografias obtidas por MET fornece informações valiosas para caracterizar a morfologia, o tamanho e o estado de agregação dos materiais nanoestruturados, além de possibilitar o acompanhamento dos processos de internalização dos nanossistemas em tecidos biológicos (LANKOFF *et al.*, 2012).

Figura 4 – Células epiteliais linhagem A549, humana, permeadas com material nanoparticulado



Fonte: Cortesia da Prof. Anna Lankoff do *Institute of Nuclear Chemistry and Technology Centre for Radiobiology and Biological Dosimetry* – Varsóvia, Polónia (2012).

Muito em breve com a popularização dos microscópios ultrarrápidos e da femtoquímica, imagens em tempo real poderão auxiliar a desvendar com precisão as reações químicas envolvidas nos mais complexos processos biológicos (DELATTRE, 2007; FLANNIGAN; ZEWAİL, 2012; ZEWAİL, 1994).

Por hora, o acesso a MET e MEV podem fornecer os dados necessários para a caracterização de sistemas nanoestruturados e acompanhamento de sua inclusão nos sistemas biológicos.

2.2 Caracterização por difração de raios X

Os raios X são utilizados para diagnosticar a saúde humana desde sua descoberta, em 1895, por Wilhelm Conrad Roentgen (1845-1923). Por ser uma técnica de análise de amostras não destrutiva, as imagens obtidas pelos raios X têm ampla utilização médica ainda hoje (LIMA; AFONSO; PIMENTEL, 2009). Uma das características dos raios X é o fenômeno de difração, que pode ser utilizado para: determinar com perfeição a disposição de átomos em uma estrutura cristalina; diferenciar e caracterizar fármacos polimórficos em geral; diferenciar e caracterizar compostos nanoestruturados e outros usos aqui não exemplificados.

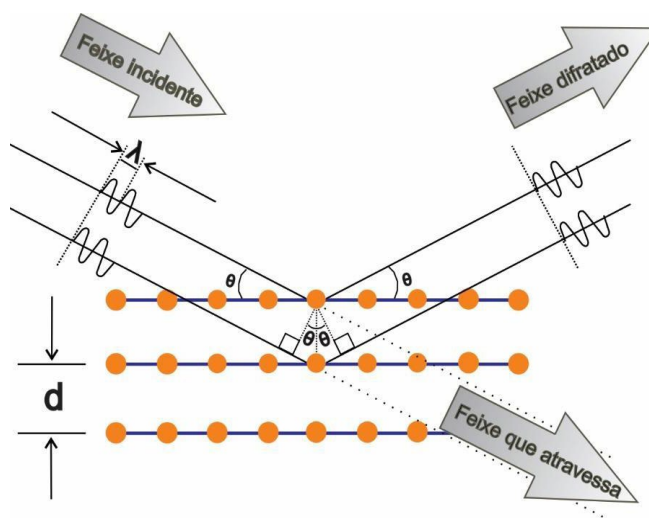
Para determinar a disposição atômica em uma estrutura cristalina com precisão, a técnica da difração de raios X de monocristais é a técnica de escolha. Brevemente, um único cristal (monocristal) é submetido a um feixe de raios X e os dados coletados permitem, por meio da análise da distância entre os átomos, determinar a identidade da amostra.

Para diferenciar e caracterizar fármacos polimórficos em geral, bem como compostos nanoestruturados, a difração de raios X de pó pode ser a técnica de escolha. Essa técnica consegue determinar a composição das fases cristalinas, bem como permite calcular o diâmetro médio dos cristalitos que compõem o pó dos materiais analisados. A limitação da técnica é a cristalinidade do composto. Para compreender o porquê de a cristalinidade ser a limitação da técnica, devemos primeiro entender um pouco como um difratograma é obtido.

Quando um feixe de raios X (fótons) é gerado, por meio de uma fonte de radiação com comprimento de onda (λ) conhecido,

pode incidir sobre a superfície de uma rede cristalina¹, e desviar sua trajetória (difratar) ao colidir com os átomos desta rede (Figura 5). Desse modo, o fenômeno de difração de raios X ocorre devido ao espalhamento da radiação eletromagnética.

Figura 5 – Representação de feixes de raios X incidindo sobre uma superfície cristalina



Fonte: Próprios autores (2020).

Quando observamos a Figura 5 pode notar-se que o ângulo da incidência da radiação é o mesmo ângulo de saída do feixe difratado. Deste modo, Bragg e Bragg (1913) propõem que a distância (d) entre dois planos cristalinos paralelos está relacionada ao com ângulo θ do feixe difratado com comprimento de onda (λ) previamente selecionado ($1,54\text{\AA}$), de acordo com a Equação 2, conhecida atualmente como Lei de Bragg.

$$n\lambda = 2d\theta \quad n = 1, 2, 3 \dots \quad (\text{Equação 2})$$

1 Átomos organizados tridimensionalmente, com distâncias entre eles bem definidas, que apresentam periodicidade.

Desse modo, Bragg e Bragg (1913) notaram que compostos que possuíssem redes cristalinas poderiam apresentar padrões de difração específicos para cada composto cristalino,—ou seja, apenas compostos com periodicidade poderiam criar padrões de difração.

A lei de Bragg possibilitou também que Debye e Scherrer (1916) propusessem a Equação 3, para determinar o diâmetro médio (D_{hkl}) de amostras policristalinas.

$$D_{hkl} = \frac{\lambda \cdot K}{\beta \cos \theta} \quad (\text{Equação 3})$$

Na equação, o diâmetro é relacionado, em seu numerador com o comprimento de onda da radiação incidente (λ), que geralmente vem de uma fonte de cobre (1,54 Å) multiplicado por uma constante (K), que depende da forma das partículas (esfera = 0,94). A equação utiliza a largura na metade da altura do pico de difração (β) multiplicada pelo cosseno do ângulo de difração ($\cos \theta$) em seu denominador. Um cuidado que deve ser tomado ao realizar a determinação de D_{hkl} é a transformação dos ângulos de graus para radianos. Com esses cuidados, o valor do diâmetro médio obtido será em angstroms (Å) e poderá facilmente ser convertido para nanômetros.

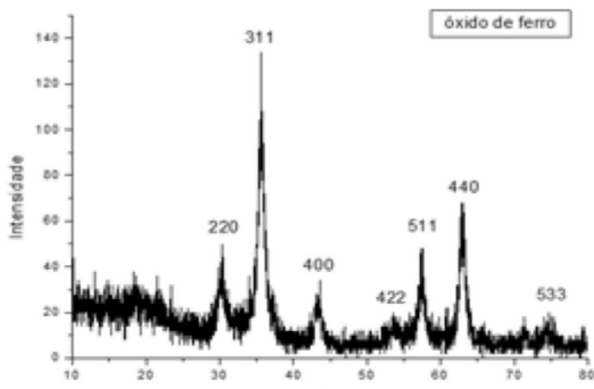
Ao observarmos a Figura 6, que apresenta um difratograma de pó de uma amostra de óxido de ferro, notamos que existem vários picos estreitos. Esses picos referem-se aos padrões de difração obtido para cada plano cristalino. Cada plano de uma amostra conhecida pode ser comparado em um banco de dados (ex. *Internacional Centre For Diffraction Data* – ICDD) e, assim, sua identidade ser determinada, ou seja, suas fases. Essa determinação permite que os índices de Müller hkl sejam escritos em cima de cada pico.

Para determinar D_{hkl} da amostra de óxido de ferro da Figura 6, utilizamos normalmente o pico de maior intensidade, o chamado pico [311], que fica em torno de 35°. Utilizando, então a Equação 3,

com os dados obtidos da Figura 6, essa amostra possui o valor de D_{hkl} de 10,81 nm.

Com base nesses conhecimentos sobre a difração de raios X, Watson e Crick (1953) apresentaram um modelo molecular em forma de dupla hélice que permitiu compreender o que chamamos de ácido desoxirribonucleico (ADN), conhecido amplamente como DNA no qual pares de bases nitrogenadas ligadas em duas longas cadeias paralelas apresentaram padrões de difração que permitiram determinar sua estrutura.

Figura 6 – Difratoograma de uma amostra de óxido de ferro



Fonte: Próprios autores (2020).

A descoberta dos Bragg possibilita, ainda hoje, identificar compostos cristalinos utilizando-se os padrões de difração encontrados. Espera-se que, em algum tempo, o uso diagnóstico da difração de raios X venha a fazer parte da rotina médica, analisando-se propriedades dos nanocompósitos presentes no organismo, como nos ossos, por exemplo (TADANO; GIRI, 2011). Assim, será possível analisar a saúde de um paciente em escala nanométrica, a futura nanomedicina, a saúde nanoestrutural.

2.3 Caracterização por espectroscopia

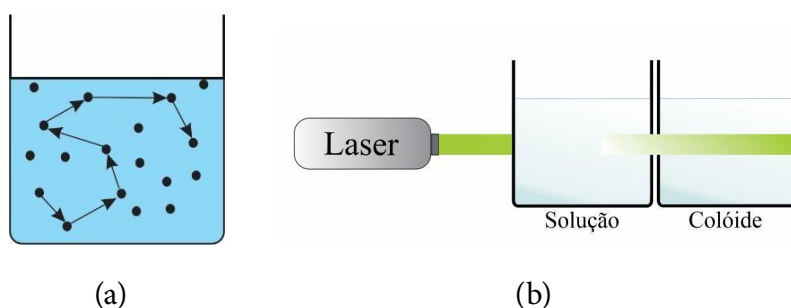
Praticamente todas as técnicas espectroscópicas podem ser utilizadas no estudo de sistemas nanoestruturados. O uso adequado de cada técnica depende a que se destinam os resultados. A espectroscopia estuda a interação entre a matéria e a radiação eletromagnética, sendo assim, a espectroscopia pode ser de absorção, de emissão, de difração, de espalhamento, dentre outras. A técnica espectroscópica que destacamos neste capítulo é a espectroscopia de correlação de fótons (*Photon Correlation Spectroscopy*, PCS), conhecida também como *quasielastic laser light scattering* ou *dynamic light scattering* (DLS) ou espalhamento dinâmico de luz.

A técnica DLS é versátil e sua aplicação pode ser bastante variada. Por exemplo, Simpanya *et al.* (2008) usam DLS para determinar o tamanho de proteínas em lentes oculares, a fim de compreender uma possível aceleração à catarata nuclear humana, devido à radiação UVA. Lee *et al.* (2012) têm utilizado DLS acoplado a outras técnicas para gerar imagens 3D de alta resolução para tomógrafos, para provar a eficiência de sua técnica ele apresenta imagens do fluxo sanguíneo cerebral em animais vivos. Sakurai *et al.* (2010) propõem o uso de DLS medição do tamanho das partículas de LDL, pois este tem sido associado à doença cardíaca coronária. Mustafaoglu, Kiziltepe e Bilgicer (2017) utilizam o DLS para determinar, de forma muito sensível, a concentração 55 pmol/L de antígeno específico da próstata (PSA) ligado a nanopartículas de ouro funcionalizadas.

Para compreender o uso da espectroscopia de correlação de fótons nos estudos de compostos nanoestruturados, em Saúde, faz-se necessário conhecer alguns aspectos de sistemas coloidais. Um aspecto importante que possuem os sistemas coloidais é o movimento Browniano (BROWN, 1828). A Figura 7 representa esse movimento aleatório que ocorre em partículas coloidais e permite que a dispersão da luz nesses meios seja visualizada por meio do efeito

Tyndall Figura 7b (TYNDALL, 1871). O efeito Tyndall ocorre em meios coloidais com bastante clareza e o caminho que a luz percorre dentro deste meio pode ser observada facilmente, diferentemente de soluções que não possuam materiais particulados suspensos.

Figura 7 – Representação esquemática do Movimento Browniano (a) e do Efeito Tyndall (b)



Fonte: Próprios autores (2020).

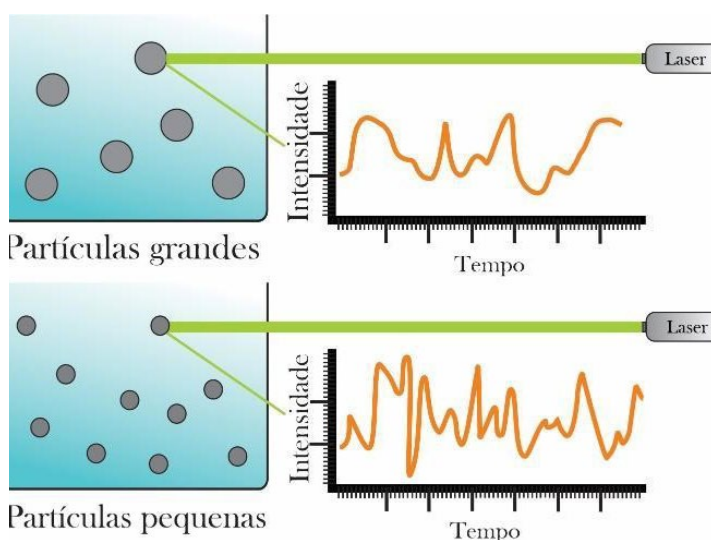
Essas propriedades estão estreitamente relacionadas ao tamanho e à forma das partículas em suspensão. Sendo assim, o espalhamento da luz em meios com partículas pequenas é diferente do espalhamento da luz em meios com partículas grandes (SHAW, 1992).

A espectroscopia de correlação de fótons (DLS) pode ser realizada medindo-se o espalhamento da luz, que ocorre quando uma partícula em suspensão desvia os ângulos de incidência do feixe de radiação luminosa sob cada partícula (MALVERN INSTRUMENTS, 2011).

A Figura 8 mostra uma representação de como um feixe de luz monocromática, normalmente um laser verde, varia no tempo, em intensidade, em contato com partículas grandes ou pequenas, seguindo as observações de Lord Rayleigh e Gustav Mie (MIE, 1908; RAYLEIGH, 1879, 1885, 1888, 1899). O espalhamento da luz pode ser observado, pois o movimento Browniano das partículas faz com que a intensidade do feixe inicial varie no tempo, quando colide com as partículas. Partículas grandes se movimentam lenta-

mente, enquanto partículas pequenas se movimentam rapidamente. Esse comportamento dinâmico das partículas gera interferências construtivas e destrutivas da luz, espalhada de modo diferente para variados tamanhos e formas. Sendo assim, a flutuação de intensidade no tempo é maior para as nanopartículas menores (MALVERN INSTRUMENTS, 2011; SHAW, 1992).

Figura 8 – Representação esquemática do DLS de partículas grandes e pequenas



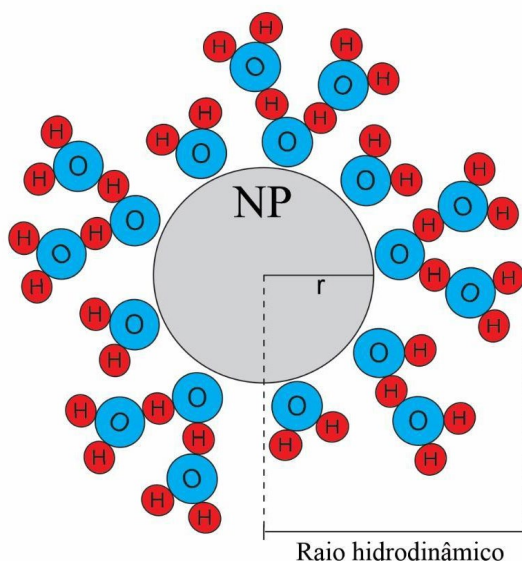
Fonte: Adaptação de Mike Jones, CC BY-SA 3.0. Acesso em: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=10502233>.

A autocorrelação do sinal obtido da intensidade do espalhamento da luz no tempo, pode, então, utilizando um algoritmo apropriado com as aproximações de Rayleigh, Mie e Stokes-Einstein, gerar um gráfico de distribuição de diâmetro hidrodinâmico das partículas (MALVERN INSTRUMENTS, 2011).

Na Figura 9, há uma representação esquemática do raio hidrodinâmico de nanopartículas. Pode-se notar que as moléculas do solvente, no caso, água, envolvem a nanopartícula e, quando ela se

movimenta, as moléculas do solvente a acompanham. Sendo assim, o solvente também influenciará o espalhamento da radiação. Desse modo, o raio observado contém as moléculas de solvente. Esse fato explica por que o diâmetro das partículas observadas por MET é menor que o diâmetro obtido por DLS. O raio observado em MET normalmente não contém as moléculas de solvente.

Figura 9 – Representação esquemática do raio hidrodinâmico de nanopartículas em meios aquosos



Fonte: Próprios autores (2020).

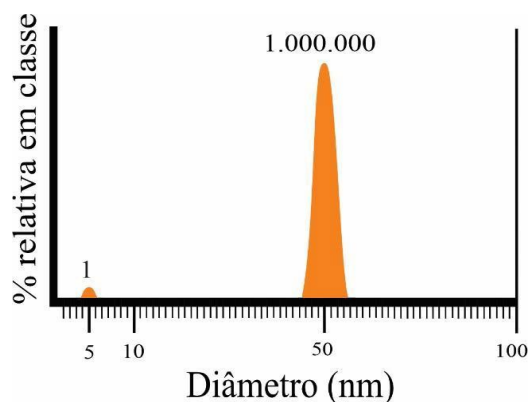
O tamanho do diâmetro hidrodinâmico (DH) é, então, duas vezes o raio hidrodinâmico das partículas observadas. O conhecimento dessa medida é muito importante para compreender os processos de internalização das nanopartículas, bem como sua excreção. Choi *et al.* (2007) verificaram que o aumento do diâmetro hidrodinâmico, de quantuns dots², de 4,36 para 8,65 nm,

2 Neste caso, nanopartículas núcleo/casca fluorescentes de CdSe/ZnS.

aumentava o tempo de meia vida dessas partículas de 48 minutos para 20 horas. Os pesquisadores afirmam, ainda, que, para prevenir acumulação das nanopartículas utilizadas para diagnósticos, por excreção renal, o diâmetro hidrodinâmico deve estar entre 5 – 6 nm, e que, talvez, para $DH > 7 - 9$ nm, a excreção renal não ocorra (CHOI *et al.*, 2007).

A Figura 10 apresenta uma representação hipotética de um gráfico de DLS para diâmetro hidrodinâmico. No gráfico, podemos notar que a intensidade relativa de partículas com DH em torno de 50 nm é um milhão de vezes maior que em torno de 5 nm. Desse modo, o valor de DH será considerado 50 nm e as demais partículas estarão contidas dentro do índice de dispersão (ID)³, que observa o segundo momento de distribuição da população de partículas (NIDHIN *et al.*, 2008).

Figura 10 – Representação hipotética de uma distribuição do diâmetro hidrodinâmico obtida por DLS



Fonte: Adaptação de MALVERN INSTRUMENTS (2011).

Os valores de ID variam entre 0,0 e 1,0. Quanto mais homogênea a distribuição de tamanho das partículas, mais próximo de 0,0 o valor será, ou seja, perfeitamente monodispersa. Em 2017, a

3 nomenclatura recomendada IUPAC ao invés de índice de polidispersão (IPD)

International Organization for Standardization (ISO) publicou um documento para padronizar especificações do uso do DLS. No documento, dentre outras especificações, os valores de ID classificam as partículas com estreita distribuição de tamanhos como altamente monodispersa e com ampla distribuição de população como polidispersa (ISO 22412:2017). A Tabela 1 sumariza as informações obtidas na ISO 22412:2017 e no *Guidelines for Dynamic Light Scattering Measurement and Analysis* (NANOCOMPOSIX, 2015), bem como das referências deste capítulo.

Tabela 1 – Relação entre índice de dispersão e monodispersão das partículas

ID	Dispersividade
0-0,1	Próxima a monodispersão
> 0,1 – < 0,7	quasi-monodisperso
≥ 0,7	Polidisperso, tamanhos heterogêneos

Fonte: Próprios autores (2020).

Danaei *et al.* (2018) verificaram, em sua revisão, que, em trabalhos com vesículas fosfolipídicas (nanolipossomos e lipossomos), um valor de ID abaixo de 0,3 era considerado aceitável para aplicações farmacêuticas e indicava uma população homogênea. Afirmam, também, que faltam padrões e diretrizes mais específicos para a aceitabilidade da faixa ID de produtos para diferentes aplicações (por exemplo, em alimentos, cosméticas, farmacêuticas etc.) e diferentes rotas de administração bioativa precisam ser definidos pelas autoridades reguladoras (DANAEI *et al.*, 2018). Essa preocupação vem de encontro aos resultados obtidos pelos mais variados estudos, que têm demonstrado a interferência do tamanho, da forma e da dispersão dos compostos nanoestruturados e seus efeitos biológicos diferenciados.

REFERÊNCIAS

- BARRON, G. *Aspergillus flavus* and *Penicillium cyclopium*. 1 fotografia, [s. l.], 2013a. Disponível em: <https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/6015>. Acesso em: 23 jun. 2020.
- BARRON, G. *Aspergillus flavus* – scanning electron micrograph, rough conidiophore. 1 fotografia, [s. l.], 2013b. Disponível em: <https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/5997>. Acesso em: 23 jun. 2020.
- BOSTANJOGLO, O.; TORNOW, R. P.; TORNOW, W. Nanosecond-exposure electron microscopy of laser-induced phase transformations. **Ultramicroscopy**, v. 21, n. 4, p. 367-372, 1987.
- BRAGG, W. H.; BRAGG, W. L. The reflection of X-rays by crystals. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character**, v. 88, n. 605, p. 428-438, 1913.
- BROWN, R. XXVII. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. **The Philosophical Magazine**, v. 4, n. 21, p. 161-173, 1828.
- CAMPAGNOLA, P. J.; CLARK, H. A.; MOHLER, W. A.; LEWIS, A.; LOEW, L. M. Second-harmonic imaging microscopy of living cells. **Journal of Biomedical Optics**, v. 6, n. 3, p. 277-286, 2001.
- CHOI, H. S.; LIU, W.; MISRA, P.; TANAKA, E.; ZIMMER, J. P.; ITTY IPE, B.; BAWENDI, M. G.; FRANGIONI, J. V. Renal clearance of quantum dots. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 10, p. 1165-1170, 2007.
- CLAYTON, K. N.; SALAMEH, J. W.; WERELEY, S. T.; KINZER-URSEM, T. L. Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. **Biomicrofluidics**, 2016.
- DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAIEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2018.
- DEBYE, P.; SCHERRER, P. Interferenz an regellos orientierten Teilchen im Röntgenlicht I. **Physikalische Zeitschrift**, 1916.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura**. 1. ed. Porto alegre: EDIPUCRS, 2007.
- DELATTRE, E. Fundamentos de Eletrofisiologia: Potenciais de membrana. **Medicina**, v. 40, n. 3, p. 378-393, 2007.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.

FLANNIGAN, D. J.; ZEWAİL, A. H. 4D electron microscopy: Principles and applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 10, p. 1828-1839, 2012.

GAGNER, J. E.; LOPEZ, M. D.; DORDICK, J. S.; SIEGEL, R. W. Effect of gold nanoparticle morphology on adsorbed protein structure and function. **Biomaterials**, v. 32, n. 29, p. 7241-7252, 2011.

GRAND VIEW RESEARCH. **Super-resolution Microscopes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Technology (STED, SIM, STORM, FPALM, PALM), By Application (Life Science, Nanotechnology), By Region, And Segment Forecasts, 2020 – 2027**, nº 978-1-68038-404–8. San Francisco, United States of America: [s.n.], 2020. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/super-resolution-microscopes-industry>. Acesso em: 29 jan 2021.

ISO – THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 22412:2017**. Norma, 2, nº 22412:2017. Genebra: ISO, 2017.

JIANG, W.; KIM, B. Y. S.; RUTKA, J. T.; CHAN, W. C. W. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 3, p. 145-150, 2008.

LAMBERT, L.; MULVEY, T. Ernst Ruska (1906–1988), Designer Extraordinaire of the Electron Microscope: A Memoir. **Advances in Imaging and Electron Physics**, v. 95, n. C, p. 2-62, 1996.

LANKOFF, A.; SANDBERG, W. J.; WEGIEREK-CIUK, A.; LISOWSKA, H.; REFSNES, M.; SARTOWSKA, B.; SCHWARZE, P. E.; MECZYNSKA-WIELGOSZ, S.; WOJEWODZKA, M.; KRUSZEWSKI, M. The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP-1 cells. **Toxicology Letters**, v. 208, n. 3, p. 197-213, 2012.

LEE, J.; WU, W.; JIANG, J. Y.; ZHU, B.; BOAS, D. A. Dynamic light scattering optical coherence tomography. **Optics Express**, v. 20, n. 20, p. 22262, 2012.

LEWIS, A.; ISAACSON, M.; BETZIG, R. E.; HAROOTUNIAN, A. **Near field scanning optical microscopy**. US4917462A. Concessão: 16 ago. 1990.

LEWIS, A.; RADKO, A.; AMI, N. Ben; PALANKER, D.; LIEBERMAN, K. Near-field scanning optical microscopy in cell biology. **Trends in Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 70-73, 1 fev. 1999. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892498014378>. Acesso em: 29 jan. 2021.

LIMA, R. S.; AFONSO, J. C.; PIMENTEL, L. C. F. Raios-x: fascinação, medo e ciência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 263-270, 2009.

LOBASTOV, V. A.; SRINIVASAN, R.; ZEWEIL, A. H. Four-dimensional ultrafast electron microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 20, p. 7069-7073, 2005.

LU, F.; WU, S.-H.; HUNG, Y.; MOU, C.-Y. Size Effect on Cell Uptake in Well-Suspended, Uniform Mesoporous Silica Nanoparticles. **Small**, v. 5, n. 12, p. 1408-1413, 2009.

MALVERN INSTRUMENTS. **Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes Technical Note MRK656-01**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: https://warwick.ac.uk/fac/cross_fac/sciencecity/programmes/internal/themes/am2/booking/particlesize/intro_to_dls.pdf. Acesso em: 6 jul. 2020.

MARTINS, R. de A. Robert Hooke e a pesquisa microscópica dos seres vivos. **Filosofia e História da Biologia**, v. 6, n. 1, p. 105-142, 2011. Disponível em: <http://www.abfhib.org/FHB/FHB-06-1/FHB-6-1-07.html>. Acesso em: 18 jun. 2020.

MEDMYCO. **Aspergillus flavus**. 31 ago. 2016. 1 fotografia. Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus_flavus.jpg. Acesso em: 23 jun. 2020.

MIE, G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. **Annalen der Physik**, v. 330, n. 3, p. 377-445, 1908.

MUSTAFAOGLU, N.; KIZILTEPE, T.; BILGICER, B. Site-specific conjugation of an antibody on a gold nanoparticle surface for one-step diagnosis of prostate specific antigen with dynamic light scattering. **Nanoscale**, v. 9, n. 25, p. 8684-8694, 2017.

NANOCOMPOSIX. **Guidelines for Dynamic Light Scattering Measurement and Analysis**. San Diego: [s. n.], 2015. Disponível em: [http://50.87.149.212/sites/default/files/nanoComposix Guidelines for DLS Measurements and Analysis.pdf](http://50.87.149.212/sites/default/files/nanoComposix%20Guidelines%20for%20DLS%20Measurements%20and%20Analysis.pdf). Acesso em: 28 fev. 2021.

NIDHIN, M.; INDUMATHY, R.; SREERAM, K. J.; NAIR, B. U. Synthesis of iron oxide nanoparticles of narrow size distribution on polysaccharide templates. **Bulletin of Materials Science**, v. 31, n. 1, p. 93-96, 2008.

PADDOCK, Stephen W.; FELLERS, Thomas J.; DAVIDSON, Michael W. **Introductory Confocal Concepts – Nikon's Microscopy U**. [s. l.], [2020?]. Disponível em: <https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/introductory-confocal-concepts>. Acesso em: 1 jul. 2020.

PORTER, J. R. Antony Van Leeuwenhoek. Tercentenary of his discovery of bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 40, n. 2, p. 260-269, 1976.

RAYLEIGH, L. On waves propagated along the plane surface of an elastic solid. **Proceedings of the London Mathematical Society**, 1885.

RAYLEIGH, L. XI The theory of anomalous dispersion. **The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science**, v. 48, n. 290, p. 151-152, 1899.

RAYLEIGH, L. XXVI On the remarkable phenomenon of crystalline reflexion described by Prof. Stokes. **The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science**, 1888.

RAYLEIGH, L. XXXI Investigations in optics, with special reference to the spectroscope. **The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science**, 1879.

SAKURAI, T.; TRIRONGJITMOAH, S.; NISHIBATA, Y.; NAMITA, T.; TSUJI, M.; HUI, S.-P.; JIN, S.; SHIMIZU, K.; CHIBA, H. Measurement of lipoprotein particle sizes using dynamic light scattering. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 47, n. Pt 5, p. 476-481, 2010.

SHAW, D. J. **Colloid & Surface Chemistry**. Fourth ed. London: Elsevier Sci Ltd, 1992.

SIMPANYA, M. F.; ANSARI, R. R.; LEVERENZ, V.; GIBLIN, F. J. Measurement of Lens Protein Aggregation *in vivo* Using Dynamic Light Scattering in a Guinea Pig/UVA Model for Nuclear Cataract. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 6, p. 1589-1595, 2008.

SINGH, P.; KIM, Y. J.; WANG, C.; MATHIYALAGAN, R.; YANG, D. C. Microbial synthesis of Flower-shaped gold nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 1469-1474, 2016.

TADANO, S.; GIRI, B. X-ray diffraction as a promising tool to characterize bone nanocomposites. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 12, n. 6, p. 064708, 2011.

TYNDALL, J. On dust and smoke. **The Royal Institute Library of Science (TRILS-ps)**, 1871.

VALADARES, Eduardo de Campos. Introdução aos Microscópios Eletrônicos de Varredura e Tunelamento. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 14, n. 2, p. 63-71, 1992.

VIGNESHWARAN, N.; ASHTAPUTRE, N. M.; VARADARAJAN, P. V.; NACHANE, R. P.; PARALIKAR, K. M.; BALASUBRAMANYA, R. H. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. **Materials Letters**, v. 61, n. 6, p. 1413-1418, 2007.

VON ARDENNE, M. Das Elektronen-Rastermikroskop. **Zeitschrift für Physik**, v. 109, n. 9-10, p. 553-572, 1938.

WANG, K.; DAHAN, R.; SHENTCIS, M.; KAUFFMANN, Y.; BEN HAYUN, A.; REINHARDT, O.; TSESSES, S.; KAMINER, I. Coherent interaction between free electrons and a photonic cavity. **Nature**, v. 582, n. 7810, p. 50-54, 2020.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 738-739, 1953.

ZEWAIL, A. H. Femtochemistry. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 48, p. 3-22, 1993.

ZEWAIL, A. H. Laser Femtochemistry. **Science**, v. 242, p. 1645-1633, 1988.

ZEWAIL, A. H. Laser selective chemistry – is it possible? **Physics Today**, v. 33, n. 11, p. 27-33, 1980.

ZHU, J.; UDUPA, A.; GODDARD, L. L. Visualizable detection of nanoscale objects using anti-symmetric excitation and non-resonance amplification. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2020.



Capítulo 7

RADIOFREQUÊNCIA

Uso da tecnologia na saúde estética

ADAMIANE SILVA MORAES SCHWAICKARDT
LUCAS HENRIQUE FERREIRA SAMPAIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 O que é a radiofrequência

O princípio da radiofrequência (RF) se baseia em uma corrente elétrica alternada em que o calor é gerado em torno da ponta de um eletrodo. O termo *radiofrequência* é usado para definir ondas eletromagnéticas que são empregadas na comunicação, transmissões de televisão, rádio, celulares e satélites. Além disso, a RF vem sendo utilizada há mais de 75 anos, com vasta aplicabilidade na medicina (LOLIS; GOLDBERG, 2012).

Em tecidos biológicos ricos em eletrólitos, campos elétricos e magnéticos oscilantes produzem calor e induzem movimento de íons, rotação de moléculas dipolares e distorção de apolares (BELENKY *et al.*, 2012).

Há uma crescente demanda por aparelhos emissores de RF, despertando interesse comercial e científico. Um campo inovador de investigação que mostra um elevado potencial para a aplicação seletiva de substâncias, tratamento de feridas, remoção e regeneração de tecidos.

dos, terapia de infecções cutâneas e desinfecção de tecido através da inativação de diversos agentes patogênicos. A escolha pelo uso da radiofrequência como tecnologia na área estética apresenta grande potencial nos tratamentos de rejuvenescimento cutâneo (DAYAN *et al.*, 2020). Desse modo, suscitam, cada vez mais, a participação de áreas distintas do saber, pautadas em processos interdisciplinares, com o objetivo de melhorar a acurácia desses dispositivos e contribuir com conhecimentos científicos nas áreas envolvidas, este capítulo abordará a ação, ainda pouco elucidada, da RF em tratamentos cutâneos estéticos.

Nos aparelhos geradores de RF, as correntes alternadas de alta frequência geram campo magnético que é liberado na ponta do eletrodo acoplado ao equipamento, de tal maneira que a ação do sistema será obtida por ondas eletromagnéticas e não por corrente elétrica (BELENKY *et al.*, 2012). Descrita na literatura médica como uma radiação no espectro eletromagnético que gera calor por conversão de ondas compreendidas entre 30 KHz e 300 MHz, a RF é um recurso indicado em todos os processos degenerativos que impliquem na diminuição ou retardo do metabolismo, irrigação e nutrição, sendo, em geral, usado na terapêutica de patologias crônicas, que pode ser aplicada por via cutânea, percutânea, laparoscópica ou por meio de laparotomia, como forma de tratamento primário ou alternativo (RIBEIRO JR *et al.*, 2007).

Existem diferentes tipos de sistemas de radiofrequência, que se caracterizam como capacitiva ou resistiva. A RF capacitiva é capaz de gerar calor de dentro para fora do corpo por ondas curtas, enquanto a resistiva atua gerando calor externo por meio de um campo elétrico que, por meio do atrito gerado com o tecido, torna-se um campo eletromagnético, aquecendo o tecido. De acordo com os modos de emissão e com o número de emissores na base da manopla ou aplicador se distinguem em monopolar, bipolar, multipolar e fracionada (ALEXIADES, 2020; DAYAN *et al.*, 2019).

O sistema monopolar eleva a temperatura em tecidos mais profundos, através da passagem de corrente de um eletrodo ativo

para um passivo, que é colocado em uma região distante da área de tratamento (ELSAIE, 2009; KRUEGER; SADICK, 2013). O sistema bipolar opera com a corrente limitada entre os dois eletrodos, de modo que a corrente de entrada e saída estão no mesmo cabeçote, porém, o efeito é mais superficial, atingindo até 2mm de profundidade (GAN *et al.*, 2018; TAGLIOLATTO, 2016).

Nos tipos multipolares com três ou mais eletrodos, a energia é gerada quando a corrente passa entre os eletrodos e a profundidade de penetração é aproximadamente a distância média entre os três eletrodos (LOZANO *et al.*, 2013). No entanto, nos dispositivos bipolar e multipolar, a energia de RF não penetra na profundidade necessária e, portanto, é menos eficiente para o aperto da pele (TANAKA, 2018).

A tecnologia RF fracionada é outra forma de tratamento. A energia é entregue usando-se uma ponta fracionada na superfície da pele ou usando uma matriz de agulhas inseridas na pele. Embora os dispositivos RF geralmente não afetem a epiderme, esses novos dispositivos fornecem a energia RF bipolar através de micro canais, utilizando os mesmos princípios de lasers de recapeamento fracionados não ablativos (PRITZKER; HAMILTON; DOVER, 2014). Este capítulo visa demonstrar as muitas formas de utilização da radiofrequência em diferentes campos da saúde, especialmente, na medicina estética e no tratamento anti-idade.

2 RADIOFREQUÊNCIA NA MEDICINA

Dentre os distintos emissores de onda eletromagnética de radiofrequência, a similaridade dos dispositivos é caracterizada pela hipertermia, que pode ser definida como uma elevação da temperatura bem acima da corpórea normal (BELENKY *et al.*, 2012). O mecanismo pelo qual a hipertermia exerce seus efeitos fisiológicos no organismo ainda é pouco conhecido na literatura, mas sabe-se que, quando a temperatura ultrapassa 41 °C, as enzimas sofrem desnatu-

ração, a função das mitocôndrias é comprometida, as membranas celulares desestabilizam-se e as vias metabólicas dependentes de oxigênio são perturbadas concomitantemente com a elevação da mortalidade celular local (LOUIS *et al.*, 2020; GOATS, 1989).

Incorporada pela medicina na modalidade ablativa, a radiofrequência é empregada como método alternativo para o tratamento de neoplasias, como hepatocarcinoma (o mais estudado), câncer de pulmão, tumores ósseos. A RF também pode ser usada na terapêutica da fibrilação atrial, redução de varizes e no controle de dores crônicas de face e cabeça, incluindo neuralgia ou dor neuropática trigêmea e síndromes atípicas de dor facial. É importante frisar que cada terapêutica deve estabelecer e obedecer aos protocolos clínicos específicos, como potências adequadas e tempo de aplicação de acordo com as patologias a serem tratadas e as diferentes condições do paciente. Das patologias abordadas, apenas o carcinoma hepatocelular e a fibrilação atrial possuem estudos mais sólidos e protocolos mais bem definidos. As demais patologias, apesar de apresentarem resultados positivos em seus estudos, ainda carecem de estudos para determinação específica de protocolos de segurança e eficácia (RIBEIRO JR *et al.*, 2007).

A aplicação da tecnologia de RF no tratamento de outros tipos de câncer, ainda pouco explorados, pode aumentar exponencialmente a qualidade de vida dos pacientes. A termossensibilidade das células tumorais, devido ao pH comumente mais baixo, a hipersensibilidade de células hipóxicas e o fluxo reduzido de sangue nas células tumorais tornam a hipertermia um procedimento potencialmente útil quando a técnica é utilizada simultaneamente com agentes quimioterápicos ou com a radioterapia (TAMAROV *et al.*, 2014).

Em outra modalidade, dispositivos de radiofrequência são utilizados como fonte de plasma. A pesquisa da RF como fonte de plasma é um campo inovador de investigação que mostra um elevado potencial de utilizações na área da saúde (ANDERSON *et al.*, 2019). Embora os plasmas térmicos tenham sido usados no passado em

vários campos médicos (por exemplo, para cauterização e esterilização de instrumentos médicos), a pesquisa atual é direcionada, principalmente, na aplicação de plasmas não térmicos, incluindo descarga de barreira dielétrica, gerados por radiofrequência. As pesquisas incidem sobre a investigação da física fundamental, da composição do plasma, sobre a interação dos plasmas com células procarióticas e eucarióticas, vírus, esporos e fungos, estruturas celulares como membranas celulares, DNA, lipídios e proteínas em tecidos vegetais, animais e humanos (ISBARY *et al.*, 2013).

Os plasmas, gerados por RF, influenciam processos bioquímicos e oferecem novas possibilidades para a aplicação seletiva de substâncias e medicamentos, cura de feridas e regeneração de tecidos, terapia de infecções cutâneas e, provavelmente, muitas outras doenças. Uma tarefa importante será a introdução do plasma na medicina clínica e, simultaneamente, a investigação mais aprofundada dos mecanismos de ação do plasma a nível celular. Possíveis utilizações cutâneas incluem, entre outros, a desinfecção de tecido através da inativação de diversos agentes patogênicos (fungos, bactérias, vírus, esporos e parasitas), remoção e regeneração de tecidos (ANDERSON *et al.*, 2019).

Desde que foi desenvolvida como eletrocautério, para aplicações médicas na década de 1920, a RF também tem sido amplamente utilizada na neurologia, cardiologia, ortopedia e proctologia (RAUS; VERHAERT, 2018). Porém, só em 2002, foi aprovado pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) um dispositivo de radiofrequência monopolar destinado a tratamentos estéticos faciais e posteriormente para aplicações corporais em 2006. No Brasil, apenas em 2008, foi fabricado o primeiro aparelho de radiofrequência aplicada a tratamentos estéticos, chamado de Spectra® (DUNBAR; GOLDBERG, 2015; FELIPE *et al.*, 2007).

3 RADIOFREQUÊNCIA NA SAÚDE ESTÉTICA

Na última década, houve um despertar nos interesses comerciais e científicos pelos efeitos da RF na área da estética, o que tem gerado uma crescente demanda no desenvolvimento de novos dispositivos. Os pontos clínicos avaliados nos trabalhos usando a RF em estética diferem entre os estudos. Alguns trabalhos avaliam o impacto da RF na frouxidão da pele, na redução de rugas e no rejuvenescimento geral da pele. Alguns outros estudos avaliam a melhora da cicatrização cutânea e outros medem redução da adiposidade (PRITZKER; HAMILTON; DOVER, 2014; SADICK; ROTHaus, 2016).

A modalidade terapêutica de RF é considerada atualmente valiosa para o rejuvenescimento da pele foto envelhecida, por atuar de forma pouco invasiva. Estudos demonstram como principais benefícios o menor tempo de inatividade pós-procedimento e os poucos efeitos adversos (KRUEGER; SADICK, 2013).

O processo de envelhecimento pode se manifestar por progressivas alterações estéticas e funcionais no organismo que levam à senescência, que se caracteriza pela diminuição da homeostase, aumento da vulnerabilidade do organismo, declínio das funções biológicas e da capacidade do organismo se adaptar ao estresse metabólico com o tempo. Atualmente, há interesse em entender os mecanismos envolvidos na senescência, para a identificação de intervenções, na tentativa de direcionar células senescentes como terapia contra doenças relacionadas à idade. As estratégias de tratamento e a intervenção no fotoenvelhecimento são baseadas, principalmente, na prevenção e não na terapêutica (VICTORELLI; PASSOS, 2020).

As correntes eletromagnéticas dos dispositivos terapêuticos de radiofrequência penetram nas células da epiderme, derme e hipoderme, podendo alcançar, inclusive, as células musculares. Ao passar pelos tecidos mais profundos, geram uma resistência. A resistência (impedância), na derme e no tecido celular subcutâneo, converte a corrente elétrica em energia térmica, produzindo calor. A profundi-

dade de penetração das correntes eletromagnéticas é inversamente proporcional à sua frequência. Enquanto ocorre o aquecimento volumétrico sobre as camadas mais internas da pele, a energia concentrada preserva a epiderme, que quase não apresenta resistência à passagem da radiofrequência (KLEIDONA *et al.*, 2020).

A pele envelhecida tem uma função de barreira afetada, resultando em um risco aumentado sobre distúrbios da pele. O conhecimento sobre os mecanismos do envelhecimento cutâneo é importante para desenvolver melhores produtos, dispositivos e técnicas que retardam o envelhecimento e reduzem risco de malignidade cutânea. Considerando que o aumento na produção de colágeno e sua organização na derme constitui o ponto chave para a redução do envelhecimento cutâneo, os dispositivos de radiofrequência atraíram interesse científico e comercial como um possível tratamento superlativo para rejuvenescimento (HASHIZUME, 2004).

Os efeitos térmicos da radiofrequência promovem desnaturação do colágeno e ocasiona a contração cutânea imediata, gerando um efeito *lifting*, com temperatura aproximada de 41 °C. Por meio da estimulação do fibroblasto, a RF gera um efeito tardio, induzindo neocolagênese, elastogênese e angiogênese. Essa reorganização na remodelação dérmica torna mais eficiente a sustentação da pele (BUSNARDO; AZEVEDO, 2011; GADELHA *et al.*, 2018).

Em 2005, a FDA (*Food and Drug Administration*) liberou, para aplicações cosméticas, a modalidade de plasma para rejuvenescimento da pele e para o tratamento de rugas. A aplicação de calor gerado por plasma atmosférico, com dispositivos de radiofrequência, induz à formação de danos térmicos controlados na pele, o que resulta na produção de novo colágeno e redução de fibras elásticas (HASHIZUME, 2004).

Levando em consideração as descobertas a respeito do potencial dos dispositivos RF em induzir uma neocolagenagênese e a capacidade de aumentar a permeabilidade cutânea, acreditamos

que o uso tópico de substâncias, combinado ao estímulo do dispositivo, potencializará resultados na produção de colágeno e sua organização. Além disso, a segurança comprovada do método de radiofrequência, somado ao fato de ter menor tempo de inatividade, comparado a outras tecnologias, e baixo custo, torna essa modalidade terapêutica atrativa sob o ponto de vista de eficácia e segurança (ELSAIE, 2009).

Graças à cooperação interdisciplinar em medicina, física, química, biologia e engenharia, a tecnologia de radiofrequência se tornou um campo de pesquisa inovador e dinâmico nos últimos anos. Muitas perguntas permanecem sem resposta em relação aos mecanismos de ação envolvidos na terapêutica, especialmente o de interação entre as ondas em diferentes modalidades de dispositivos, frequências, intensidade e células/tecidos vivos e a otimização da corrente dependendo do efeito desejado. Porém, os estudos até o momento ilustram o grande potencial da aplicabilidade dos dispositivos.

Pesquisas em relação às ciências da vida e às tecnologias da saúde muitas vezes se materializam através de relatos de caso. Ainda que essas pesquisas apresentem pouca evidência científica, elas ajudam no processo interdisciplinar, para que as distintas áreas possam, juntas, gerar resultados que favoreçam o avanço científico, tecnológico, social e econômico. Investigações físicas e biofísicas, testes biológicos celulares e estudos com aplicações *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para entender os diferentes mecanismos de interação entre variadas modalidades de radiofrequência, células e tecidos vivos e para projetar dispositivos para aplicações específicas. São necessários estudos de boa qualidade metodológica e, possivelmente, novos padrões para dosagens, aplicações e requisitos de segurança eletromagnética. Atualmente, ainda é difícil prever todas as opções de tratamento nas quais os dispositivos de RF podem ser úteis. Porém, estudos realizados até o momento mostram que o uso da RF no tratamento do fotoenvelhecimento é um campo de pesquisa em expansão e altamente promissor

REFERÊNCIAS

- ALEXIADES, M. Microneedle Radiofrequency Skin laxity. **Facial Plastic Surgery Clinics of NA**, v. 28, n. 1, p. 9-15, 2020.
- ANDERSON, S. R.; FAUCETT, S.C.; FLANIGAN, D.C.; GMABARDELLA, R.A.; AMIN, N.H. The history of radiofrequency energy and Coblation in arthroscopy: a current concepts review of its application in chondroplasty of the knee. **Journal of Experimental Orthopaedics**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2019.
- BELENKY, I.; MARGULI, A.; ELMAN, M.; BAR-YOSEF, U.; PAUN, S.D. Exploring channeling optimized radiofrequency energy: A review of radiofrequency history and applications in esthetic fields. **Advances in Therapy**, v. 29, n. 3, p. 249-266, 2012.
- BERNHARDT, T.; SEMMLER, M.L.; SCHÄFER, M.; BEKESCHUS, S.; EMMERT, S.; BOECKMANN, L. Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1-10, 2019.
- BUSNARDO, V. L.; AZEVEDO, M. F. Estudo dos efeitos da radiofrequência no tratamento facial em mulheres entre os 50 e 60 anos de idade. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 14, p. 1-19, 2011.
- CARVALHO, G. F.; SILVA, R.M.; MESQUITA F.; JOAQUIM, J.T.; MEYER, P.F.; RONZIO, O. A.; MEDEIROS, J.O.; NÓBREGA, M.M.S.; BARICHELLO, P. A.; MENDONÇA, W. M.; FERNANDES, A.S.; CAVALCANTE, J.L. Avaliação dos efeitos da radiofrequência no tecido conjuntivo. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 68, n. 2, p. 10-25, 2011.
- DAESCHLEIN, G.; SCHOLZA, R. A.; VON WOEDTKEC, H. T.; HAASEA, M. N.; KINDEL, E.; BRANDENBURGC, R.; WELTMANN, K.D.; JUENGERA, M. Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma. **Journal of Hospital Infection**, v. 81, n. 3, p. 177-183, 2012.
- DAYAN, E.; CHIA, C.; BURNS, A.J.; THEODOROU, S. Adjustable Depth Fractional Radiofrequency Combined with Bipolar Radiofrequency: A Minimally Invasive Combination Treatment for Skin Laxity. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 39, p. S112-S119, 2019.
- DAYAN, E.; THEODOROU, S.; ROHRICH, R.J.; JAY-BURNS, A. Aesthetic Applications of Radiofrequency: Lymphatic and Perfusion Assessment. **Plastic and Reconstructive Surgery – Global Open**, v. 8, n. 2, p. 1-6, 2020.
- DOBNIG, H.; AMREIN, K. Value of monopolar and bipolar radiofrequency ablation for the treatment of benign thyroid nodules. **Best Practice and Research:**

Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 33, n. 4, p. 101283, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.05.007>. Acesso em: 15 dez. 2020.

DUNBAR, S. W.; GOLDBERG, D. J. Radiofrequency in Cosmetic Dermatology: An Update. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 14, n. 11, p. 1229-1238, 2015.

ELSAIE, M. L. Cutaneous remodeling and photorejuvenation using radiofrequency devices. **Indian Journal of Dermatology**, v. 54, n. 3, p. 201-205, 2009.

FELIPE, I.; DEL CUETO, S.R.; PÉREZ, E.; REDONDO, P. Adverse reactions after nonablative radiofrequency: Follow-up of 290 patients. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 6, n. 3, p. 163-166, 2007.

GADELHA, R. D. L.; PAIVA, D.L.M.; GAYOSO, C.W.; CILENTO, J.N.M. Radiofrequência pulsada para flacidez periorbitária: estudo comparativo. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 10, n. 2, p. 140-146, 2018.

GAN, L.; ZHANG, S.; POORUN, D.; LIU, D.; LU, X.; HE, M.; DUAN, X.; CHEN, H. Medical applications of nonthermal atmospheric pressure plasma in dermatology. **JDDG – Journal of the German Society of Dermatology**, v. 16, n. 1, p. 7-14, 2018.

GELKER, M.; MROTZEK, J.; ICHTER, A.; MÜLLER-GOYMANN, C.C.; VIÖLA, W. Influence of pulse characteristics and power density on stratum corneum permeabilization by dielectric barrier discharge. **Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects**, v. 1863, n. 10, p. 1513-1523, 2019.

GOATS, G. C. Continuous short-wave (radio-frequency) diathermy. **British Journal of Sports Medicine**, v. 23, n. 2, p. 123-127, 1989.

HASHIZUME, H. Skin aging and dry skin. **Journal of Dermatology**, v. 31, n. 8, p. 603-609, 2004.

HEINLIN, J.; MORFILL, G.; LANDTHALER, M.; STOLZ, W.; ISBARY, G.; SHIMIZU T.; ZIMMERMAN, J.; KARRE, S. Plasma medicine: possible applications in dermatology. **JDDG – Journal of the German Society of Dermatology**, v. 8, n. 12, p. 968-977, 2010.

HEINLIN, J.; ISBARY G.; STOLZ, W.; MORFILL, G.; LANDTHALER, M.; SHIMIZU, T.; STEFFES, B.; NOSENKO, T.; ZIMMERMANN, J.; KARRER, S. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 1, p. 1-11, 2011.

ISBARY, G.; ZIMMERMANN, J.L.; SHIMIZU, T.; LI, F.; MORFILL, G.E.; THOMAS, H.M.; STEFFE, B.; HEINLIN J.; KARRER, S.; STOLZ, W. Non-thermal plasma-More than five years of clinical experience. **Clinical Plasma Medicine**, v. 1, n. 1, p. 19-23, 2013.

KLEIDONA, I.A.; KARYPIDIS, D.; LOWE, N.; MYERS, S.; GHANEM, A. Fractional radiofrequency in the treatment of skin aging: an evidence-based treatment protocol. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 22, n. 1, p. 9-25, 2020.

KRUEGER, N.; SADICK, N. S. New-generation radiofrequency technology. **Cutis**, v. 91, n. 1, p. 39-46, 2013.

LOLIS, M. S.; GOLDBERG, D. J. Radiofrequency in cosmetic dermatology: A review. **Dermatologic Surgery**, v. 38, n. 11, p. 1765-1776, 2012.

LOUIS, F.; FUJII, N.; KATSUYAMA, M.; OKUMOTO, S.; MATSUSAKI, M. Effects of radiofrequency and ultrasound on the turnover rate of skin aging components (skin extracellular matrix and epidermis) via HSP47-induced stimulation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. S006, n. 20, p. 73-79, 2020.

LOZANO, J.N., VACAS-JACQUES, P.; ANDERSON, R.R.; FRANCO, W. Effect of fibrous septa in radiofrequency heating of cutaneous and subcutaneous tissues: Computational study. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 45, n. 5, p. 326-338, 2013.

PRITZKER, R. N.; HAMILTON, H. K.; DOVER, J. S. Comparison of different technologies for noninvasive skin tightening. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 13, n. 4, p. 315-323, 2014.

RAUS, P.P.M.; VERHAERT, P.D.M. Radiofrequency surgery: 3500 years old and still young. **Orbit (London)**, v. 37, n. 3, p. 159-164, 2018.

RIBEIRO JR, M. A. F.; COLANERI, R.P.; NUNES, B.S.; CHAIB, E.; D'IPOLITTO, G.; GAMA-RODRIGUES, J.J.; SAAD, W.A.; CECCONELLO, I. Ablação por radiofrequência de tumores hepáticos primários e metastáticos: experiência em 113 casos. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 38-44, 2007.

SADICK, N.; ROTHUS, K. O. Aesthetic Applications of Radiofrequency Devices. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 43, n. 3, p. 557-565, 2016.

SHAHBAZI RAD, Z.; ABBASI DAVANI, F. Experimental investigation on electrical characteristics and dose measurement of dielectric barrier discharge plasma device used for therapeutic application. **Review of Scientific Instruments**, v. 88, n. 4, p. 101-109, 2017.

TAGLIOLATTO, S. Radiofrequência: Método não invasivo para tratamento da flacidez cutânea e contorno corporal. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 7, n. 4, p. 332-338, 2016.

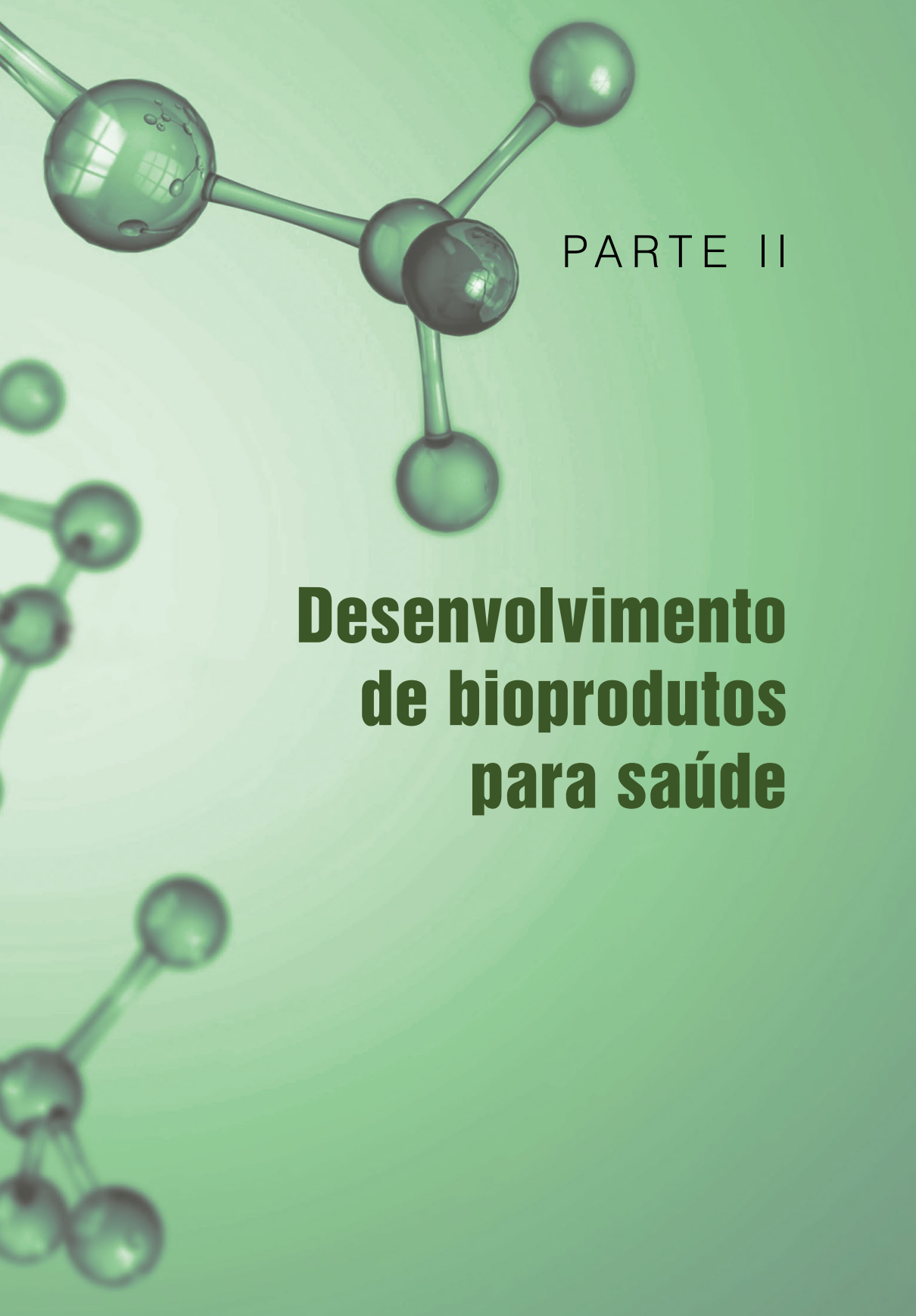
TAMAROV, K. P.; OSMINKINA, L.A.; ZINOVYEV, S.V.; MAXIMOVA, K.A.; KARGINA, J.; GONGALSKY, M.B.; RYABCHIKOV, Y.; AHMED AL-KATTAN;

SVIRIDOV, A.P.; SENTIS, M.; IVANOV, A.; NIKIFOROV, V.N.; KABASHIN, A.V.; TIMOSHENKO, V.Y. Radio frequency radiation-induced hyperthermia using Si nanoparticle-based sensitizers for mild cancer therapy. **Scientific Reports**, v. 4, n. 13, p. 1-7, 2014.

TANAKA, Y. Treatment of Skin Laxity Using Multisource, Phase Controlled Radiofrequency. **Dermatologic Surgery and Procedures**, v. S.I, n. 1, p. 175-192, 2018.

TIEDE, R.; J. HIRSCHBERG, J.; DAESCHLEIN, G.; T. VON WOEDTKE, T.; VIOEL, W. Plasma Applications: A Dermatological View. **Contributions to Plasma Physics**, v. 54, n. 2, p. 118-130, 2014.

VICTORELLI, S.; PASSOS, J. F. Telomeres: beacons of autocrine and paracrine DNA damage during skin aging. **Cell Cycle**, v. 19, n. 5, p. 532-540, 2020.



PARTE II

Desenvolvimento de bioprodutos para saúde



Capítulo 8

UMA INTRODUÇÃO AOS ESTUDOS DA METABOLÔMICA

VALDIRENE NEVES MONTEIRO

1 INTRODUÇÃO

Em séculos passados, o uso de moléculas bioativas se dava como misturas complexas e sem o conhecimento detalhado do seu mecanismo de ação. No século 19, vários avanços nas diversas áreas, sobretudo nas metodologias de síntese orgânica e no isolamento de compostos de misturas complexas, permitiu a utilização do conhecimento dessas moléculas para a elucidação de fenômenos biológicos e na descoberta de novas drogas (ZIEGLER *et al.*, 2013).

Interessante que, com o avanço do conhecimento no século XIX, promoveu-se a unidisciplinaridade e, somente no século XX, a interdisciplinaridade surgiu como uma necessidade no compartilhamento de saberes para que a pesquisa e o desenvolvimento atinxissem seu ponto alto nos dias atuais sobretudo no estudo de biomoléculas (SANTOS *et al.*, 2007). Nota-se que 43% das matérias vinculadas em veículos de notícias sobre pesquisas em ciência e tecnologia em saúde se referem à produção de medicamentos, incluindo aí nano medicamentos, enzimas, neuroquímicos, genes sintéticos, DNA artificial, anticorpos, vacinas, anticoncepcional, hormônios e testes diagnósticos, e 82% dessas matérias sobre

pesquisas científicas almejam a disponibilização de novos medicamentos e procedimentos para consumo no mercado (CARON; IANNI; LEFEVRE, 2018).

Um dos desafios nas ciências da saúde na atualidade é a busca de novas estratégias para controlar o risco e mitigar doenças infecciosas emergentes. Então, a metabolômica faz parte das chamadas Ciências Ômicas, que vêm se desenvolvendo rapidamente a partir dos anos 90, junto com outras ômicas, genômica (genes), transcriptômica (mRNA), proteômica (proteínas), com o objetivo em avaliar globalmente os metabólitos de um sistema (FIEHN, 2001).

As estruturas e atividades biológicas de vários metabólitos secundários vêm sendo estudados em diferentes organismos, com o objetivo de entendimento e caracterização da via biossintética, o que tem viabilizado a descoberta de vários e novos compostos com impacto em vários campos da biotecnologia (CHAGAS *et al.*, 2017; FENG *et al.*, 2019; TCHOUKOUA *et al.*, 2018; VAISHNAV; DEMAINE, 2010).

Micro-organismos e plantas podem produzir uma gama de metabólitos secundários com funções importantes sendo explorados para aplicações como antibióticos, anticancerígeno, antifúngico entre outras aplicações (OSBOURN, 2010).

O metabolismo de um organismo é definido como a reunião das reações bioquímicas realizadas por um organismo em que os metabólitos são os produtos intermediários do metabolismo sendo restritos a pequenas moléculas (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005; TIWARI; RANA, 2015).

O termo *metabolismo secundário* é utilizado para diferenciar do metabolismo primário, presente em todas as células vivas. O metabolismo secundário não constitui o esqueleto molecular básico do organismo, e, sendo derivado do metabolismo primário, sua ausência não restringe a vida de um organismo, mas sua sobrevivência pode ser prejudicada, o que pode levar a uma desvantagem dentre um grupo filogenético (THIRUMURUGAN *et al.*, 2018).

Metabólitos secundários são moléculas com estruturas heterogêneas de baixa massa molecular (<1000 Da) e não são necessários para o crescimento do organismo. Quando comparados com proteoma e transcriptoma, constituem um conjunto diverso de arranjos atômicos, proporcionando uma grande variação nas propriedades físicas e químicas (BELINATO *et al.*, 2019; BRAKHAGE, 2013). Parecem ser produzidos quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários, como piruvato, aminoácidos, acetato entre outros, se acumulam (YU; KELLER, 2005).

A biossíntese de metabólitos secundários está relacionada com genes localizados em *clusters*, os quais possuem genes que codificam para enzimas biossintéticas, proteínas reguladoras, resistência contra ação tóxica dos próprios metabólitos, o que evitaria ação tóxica contra as próprias espécies produtoras, além da secreção dos metabólitos secundários (BRAKHAGE, 2013). Esses aglomerados gênicos, comuns em bactérias, fungos filamentosos e plantas, são modulados por estímulos ambientais tais como fonte de carbono, luz, pH entre outros, sendo relevantes para determinados grupos gênicos e que irão variar entre as espécies fúngicas (YIN; KELLER, 2011).

A importância dos metabólitos secundários se dá pela sua funcionalidade como: moléculas solúveis em lipídios que transportam íons pela bicamada lipídica da membrana celular (ionóforos); hormônios sexuais; simbióticos, compostos letais contra bactérias, fungos, plantas, insetos; efetores de diferenciação e atividades ainda desconhecidas (DEMAIN; ADRIO, 2008). Metabólitos secundários são classificados levando em consideração a diversidade da função, estrutura e biossíntese (THIRUMURUGAN *et al.*, 2018), em cinco classes: (1) Terpenoides e Esteroides: Terpenoides apresentam uma variedade diferente de estruturas não relacionadas entre si e são o principal grupo de substâncias derivadas biossinteticamente do difosfato de isopentenila. Já os esteroides, possuem um esqueleto de carbono tetracíclico comum às estruturas sendo terpenoides modifi-

cados com biossíntese a partir do triterpeno lanosterol; (2) Alcaloides: A maioria dos alcaloides tem propriedades básicas conectadas com um nitrogênio terciário heterocíclico. A maioria dos alcaloides são biossinteticamente derivados de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, triptofano, ornitina e lisina apresentando em sua maioria propriedades básicas conectadas com um nitrogênio terciário heterocíclico (O'CONNOR, 2010); (3) Derivados de ácidos graxos e policetídeos: Policetídeos são um amplo grupo de metabólitos secundários conhecidos por possuírem alta variedade em suas estruturas e funções com bioatividades como antibacteriano, antifúngico, anticancerígeno, antiviral, imunossupressor, anti-inflamatório, redução do colesterol (RISDIAN; MOZEF; WINK, 2019). Derivados de ácidos graxos são biossintetizados a partir de precursores acil, tais como propionil CoA, acetil CoA e metilmalonil CoA (THIRUMURUGAN *et al.*, 2018); (4) Polipeptídeos Não ribossomais: Compostos derivados de aminoácidos sintetizados por um complexo multifuncional de enzimas sem transcrição direta de RNA (SOLTANI, 2016); (5) Peptídeos sintetizados ribossomicamente e modificados pós traducionalmente (RiPPs) compreende um grupo de metabólitos secundários encontrados e muito estudados em bactérias. Recentemente, estudos mostraram que fungos basidiomicetos e ascomicetos também são hábeis em produzir RiPPs (MCINTOSH *et al.*, 2011).

Os microrganismos são capazes de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários que podem ser usados em diversas aplicações e apresentam uma importante fonte de compostos bioativos para agroquímicos e farmacologia (CRANEY; AHMED; NODWELL, 2013). Vários metabólitos secundários com diferentes estruturas e atividades biológicas têm sido isolados de diferentes organismos e diversos estudos têm sido realizados para entender e caracterizar a via biossintética, levando à descoberta de novos compostos (COLLEMARE *et al.*, 2008).

A diversidade estrutural dos metabólitos secundários revela uma ampla variedade na atividade biológica destes, tais como agen-

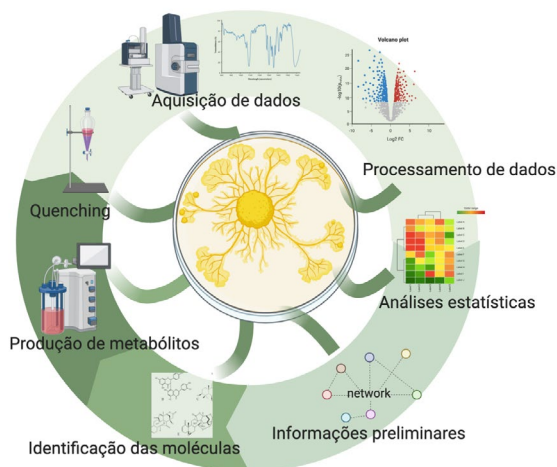
tes antimicrobianos, inibidores enzimáticos e antitumorais, imunossupressores, antiparasitários, estimuladores no crescimento de plantas, herbicidas, inseticidas entre outras atividades biológicas (DEMAIN, 1999; KELLER *et al.*, 2005).

Este capítulo tem como objetivo fornecer uma visão geral da metabolômica, tendo como cenário, noções básicas das etapas utilizadas em estudos na obtenção e identificação de metabólitos secundários os quais apresentam as mais diversas aplicações biotecnológicas.

2 DELINEAMENTO PARA O ESTUDO DA METABOLÔMICA

Para um estudo metabolômico, deve-se ter clara a questão do delineamento experimental (Figura 1) dessa forma. O fluxo de trabalho deve estar bem estabelecido em todas as etapas, compreendendo a produção, extração, mensuração, processamento dos dados, análises estatística e identificação dos metabólitos (KLUGER; LEHNER; SCHUHMACHER, 2015).

Figura 1 – Delineamento experimental para o estudo metabolômico



Fonte: Próprio autor (2021) – Criado com Biorender.com.

2.1 Seleção de micro-organismos

O processo tradicional para a descoberta de novos metabólitos frequentemente envolve a seleção de uma única cepa microbiana e, muitas vezes, essas cepas podem ter o aporte de técnicas de biologia molecular para a elevação da sua performance tais como genes nocautes, mudanças de promotores de genes nativos por promotores constitutivos ou induzíveis ou mesmo a superexpressão de fatores de transcrição, tornando-as mais efetivas na produção de metabólitos secundários. Tudo isso devido à exploração do genoma de micro-organismos, sobretudo os fúngicos, que revelou um alto número de grupos gênicos envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários (BRAKHAGE *et al.*, 2008; RANK; LARSEN; FRISVAD, 2010). Observa-se, ainda, a técnica de co-cultivo de mais de um micro-organismo, que tem se mostrado uma boa ferramenta para mimetizar as condições fisiológicas que ocorrem durante a interação microbiana em seu ambiente natural, com grande potencial para a descoberta de novas moléculas bioativas (GONZÁLEZ-MENÉNDEZ *et al.*, 2018).

O que se observa, na prática, é que os fatores limitantes na triagem de grandes coleções, o tempo gasto para reativar cepas estoques em meio ágar e, posteriormente, inoculá-las em tubos ou frascos Erlenmeyer em meio líquido, torna o processo lento. Porém, esse gargalo pode ser minimizado se empregado um grande número de estirpes microbianas ao mesmo tempo, em vez de modo sequencial, utilizando-se placas de microtitulação com 96 poços, por exemplo, o que vem sendo frequentemente utilizado (BADER *et al.*, 2010; DUETZ *et al.*, 2000).

2.2 Amostragem

Uma parte importante no planejamento experimental em estudos de metabolômica está relacionada à amostra. Assim, devemos ter em mente pelo menos quatro abordagens em relação à amostra, que são: (1) tipo de amostra podendo um organismo, uma

célula, tecido ou mesmo um fluido biológico; (2) a quantidade de amostra a serem avaliadas; (3) o modo de coleta; (4) e armazenamento (CANUTO *et al.*, 2018). O grupo de amostras deve representar as diferentes condições experimentais, como controle, tipo de tratamento, tipo selvagem ou mutante e estes devem ser cultivados simultaneamente em períodos definidos e as amostras retiradas e armazenadas para análises posteriores. Contudo, é importante levar em consideração as condições de armazenamento que devem conservar os níveis de metabólitos sem alterar a composição bioquímica das amostras biológicas (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012).

2.3 Produção dos metabólitos

A produção de metabólitos secundários por micro-organismos está diretamente ligada às condições de crescimento bem como a fatores bióticos e abióticos (BODE *et al.*, 2002). Fatores como variações das condições abióticas (luz, temperatura, disponibilidade de nutrientes, etc.) no meio de cultura, interação com outros micro-organismos concorrentes em uma co-cultura em uma condição de estresse, podem afetar a maquinaria celular obtendo como resposta uma quimiodiversidade importante (SCHERLACH; GRAUPNER; HERTWECK, 2013).

A abordagem de uma cepa e muitos compostos (OSMAC) é proposta para otimização na produção de metabólitos. Nessa abordagem, os meios de cultura e nutrientes são sistematicamente variados simulando diferentes ambientes e, dessa forma, induz-se à produção de uma variabilidade em metabólitos secundários (BODE *et al.*, 2002). Nesse tipo de abordagem, as variações abióticas para o meio de cultura compreendem as fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e sais inorgânicos, podendo, também, haver suplementação com metais pesados, funcionando como indutores ou supressores do crescimento, ou mesmo com a adição a esses meios de cultura de solventes orgânicos (PETTIT, 2011; TISCH; SCHMOLL, 2010). A abordagem OSMAC promove uma modulação epigenética e mostrou-se bem-sucedida na

produção de novos metabólitos secundários, bem como na produção de compostos semelhantes a drogas (RIGALI *et al.*, 2008).

2.4 Quenching

Antes da extração dos metabólitos, uma etapa importante é o *quenching* metabólico, que tem como objetivo a interrupção rápida do metabolismo pela inibição da atividade enzimática endógena, suprimindo mudanças no perfil metabólico, o que é particularmente importante em análises de células e tecidos, em que o objetivo é a elucidação do perfil de metabólitos do endometaboloma e exometaboloma, ou seja, dentro e fora da célula, respectivamente. O processo de *quenching* deve ser rápido, para evitar mudanças metabólicas que possam ocorrer. Deve-se manter a integridade, especialmente no caso de células, minimizando perdas de metabólitos intracelulares, não se devem promover variações significativas nas propriedades físicas ou químicas dos metabólitos, ou até mesmo em suas concentrações. Resumindo, as amostras que passam pelo processo de *quenching* devem estar aptas para as etapas subsequentes do processo analítico. As estratégias de *quenching* mais comuns são baseadas nas modificações de pH, com mudanças bruscas em extremos de pH de álcali para ácido ou vice-versa; utilização de temperaturas baixas é realizada por temperaturas abaixo de -20 °C, sendo o método mais utilizado, o *quenching* com metanol gelado em protocolos para metabólitos intra ou extracelular, largamente aplicado em leveduras, bactérias, fungos filamentosos, algas unicelulares e muito pouco em células mamíferas (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ; PRIEGO-CAPOTE; LUQUE DE CASTRO, 2010a; BELINATO *et al.*, 2019; PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012).

2.5 Extração

A extração de metabólitos tem como objetivo vários aspectos, tais como: liberação eficiente dos metabólitos da amostra; remoção de interferentes que possam dificultar análises subsequentes

(proteínas, sais, açúcares, etc.); ser compatível com as técnicas analíticas que serão utilizadas (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ; PRIEGO-CAPOTE; LUQUE DE CASTRO, 2010b). Dessa forma, a qualidade dos dados finais na análise metabolômica, ou seja, a identificação dos metabólitos, está diretamente relacionada à qualidade no processo de extração dos metabólitos, sendo assim, um passo importante nas análises metabolômicas (GONG *et al.*, 2017).

Para amostras sólidas, o protocolo mais utilizado para extração de metabólitos é a extração sólido-líquido e, para amostras líquidas, são utilizadas as extrações líquido-líquido (LLE), extração fase sólida (SPE) e micro extração fase sólida (SPME) (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ; PRIEGO-CAPOTE; LUQUE DE CASTRO, 2010b). A utilização dessas técnicas tem como objetivo a remoção de interferentes e a concentração das amostras (CANUTO *et al.*, 2017). Posteriormente, as amostras extraídas e preparadas são analisadas por técnicas como ressonância magnética nuclear (NMR), cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) ou cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS) permitindo a detecção de um grande número de metabólitos secundários simultaneamente (GUMMER *et al.*, 2012).

3 FERRAMENTAS ANALÍTICAS USADAS NAS ANÁLISES METABOLÔMICAS

A sociedade de Metabolômica (<http://metabolomicssociety.org/>) possui um fórum de discussões para trocas de experiências em experimentos e dados em metabolômica (<http://metabolomicssociety.org/resources/metabolomics-standards>). Nesse fórum, são tratados temas que vão desde a definição da padronização no procedimento a ser adotado em estudos e publicações sobre metabolômica, fornecimento de uma descrição clara do sistema biológico em estudo a componentes de estudo. Além disso, ainda permite que os dados sejam aplicados e compartilhados (FIEHN, 2002). Grande parte dos estudos de metabolômica utilizam como principais técnicas a Cromatografia gasosa

acoplada à Espectrometria de massas (do inglês *Gas Chromatography coupled Mass Spectrometry* – GC-MS) ou cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de massas (do inglês *Liquid Chromatography coupled Mass Spectrometry* – LC-MS), por apresentarem uma combinação de linearidade e elevada sensibilidade na detecção dos metabólitos e alta seletividade na separação física dos mesmos permitindo a determinação, em uma única técnica analítica, de centenas de metabólitos secundários (KLUGER; LEHNER; SCHUHMACHER, 2015; KOEK *et al.*, 2006). Devido à diversidade química e concentrações variadas dos metabólitos, secundários torna-se quase impossível determinar todo o conteúdo metabolômico de um organismo com uma única técnica analítica. Na realidade, a maior abrangência de substâncias químicas detectadas, aquisição de dados, maior entendimento biológico do organismo em estudo metabolômicos só é possível com a utilização de multiplataformas de análises (KUEHNBAUM; BRITZ-MCKIBBIN, 2013).

3.1 Espectrometria de massas (MS)

A espectrometria de massas é uma técnica analítica física para detectar e identificar moléculas de interesse por meio da medição da sua massa e da caracterização de sua estrutura química. O princípio básico de um espectrômetro de massa (do inglês *mass spectrometer* – MS) consiste em criar íons de compostos orgânicos por um método adequado, separá-los de acordo com a sua razão de massa/carga (m/z) na sequência, detectá-los qualitativa e quantitativamente por sua respectiva razão m/z e abundância dos íons (ASLAM *et al.*, 2017). Um espectrômetro de massas consiste em uma **fonte de íons** na qual os componentes de uma amostra são ionizados, sendo as fontes de ionização: ionização por elétrons, química, bombardeamento atômico rápido (FAB), ionização por eletrospray (ESI), Matriz de desorção a laser assistida por ionização (MALDI), seguido por um **analisador de massas** que separa os íons de acordo com a razão massa/carga (m/z), que podem ser do tipo: quádrupolo (Q), o íon

trap 3D (IT) ou linear (LIT), tempo de voo (TOF), Transformada de Fourier de ressonância ciclotron de íons (FT-ICR) e Orbitrap e um **detector** (transforma a corrente de íons em sinais elétricos que posteriormente vão para um sistema de computador que processa o sinal). Todos os componentes do espectrômetro de massas são operados sob alto vácuo (VESSECCHI *et al.*, 2011).

3.2 Cromatografia gasosa (GC)

Um Cromatógrafo Gasoso é um instrumento analítico que permite analisar diversos compostos em uma amostra. O princípio da técnica de cromatografia gasosa consiste em inserir uma solução de amostra no injetor do equipamento, que é transportada por um gás (hélio ou nitrogênio) através de um tubo de separação (coluna). Os componentes presentes na amostra são separados dentro da coluna e a quantificação da amostra de concentração é desconhecida. Um padrão conhecido é injetado no equipamento e, assim, o tempo de retenção do padrão e sua área serão comparados com os da amostra e utilizados para o cálculo da concentração (ZINI, 2009).

Os cromatogramas obtidos pela cromatografia gasosa são utilizados na determinação da pureza de compostos orgânicos, podendo ocorrer picos adicionais atribuídos a contaminantes (GREEF, 1986). O tempo de retenção de cada substância é comparado com um padrão utilizado como referência na identificação qualitativa dos componentes da amostra. Porém, variações podem ocorrer nesse tempo de retenção, devido a fatores limitantes da técnica, que podem ser contornados quando colunas são acopladas a espectrômetros de ultravioleta, infravermelhos ou de massas, constituindo ferramentas complementares, importantes para o aumento da resolução da técnica na identificação de misturas complexas (PENG *et al.*, 2003).

3.3 Acoplamento das técnicas analíticas

A espectrometria de massas pode ser utilizada através da infusão direta dos extratos (DIMS, *direct infusion mass spectrometry*), na qual podem ocorrer dificuldades na análise por problemas de supressão de ionização, em que esses problemas obtidos nas análises por DIMS, decorrente de matrizes complexas, podem ser contornados pelo acoplamento delas com técnicas analíticas de separação, como a cromatografia gasosa (GC) a cromatografia líquida de alta eficiência (LC) (KLUGER; LEHNER; SCHUHMACHER, 2015).

3.4 Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de massas (GC/MS)

A Cromatografia a gás, acoplada à Espectrometria de massas, do inglês, *Gas Chromatography coupled Mass Spectrometry* (GC/MS), é uma técnica analítica que apresenta elevada resolução, robustez e reprodutibilidade, e está entre as técnicas mais empregadas nos estudos da metabolômica. Por ser uma técnica híbrida, funciona em duas etapas: uma realiza a separação dos componentes de uma mistura gasosa a ser analisada (GC) e a outra, espectrometria de massas (MS), realiza a identificação dos componentes químicos gasosos separados pelo GC (KLUGER; LEHNER; SCHUHMACHER, 2015). Assim, o analisador GC/MS funciona em modo Tandem (sequencial) e os compostos químicos precursores de uma mistura gasosa são separados pelo GC e logo detectados e quantificados em seus produtos, pelo MS (DUNN *et al.*, 2013). Entretanto, essa técnica requer que a amostra sofra derivatização química (técnica utilizada para transformar uma substância em outra de estrutura semelhante, um derivado, por meio de reação química em que, normalmente, um grupo funcional específico da substância em questão é alvo da reação de derivatização) tornando os metabólitos voláteis a baixas temperaturas (CANUTO *et al.*, 2018; KLUGER; LEHNER; SCHUHMACHER, 2015). A etapa de derivatização na técnica de GC/MS é trabalhoso,

pode ocasionar perdas por volatilização no processo e é limitante quando em amostras a serem trabalhadas em conjunto (HALKET *et al.*, 2005). A GC/MS confere elevada confiabilidade na identificação dos metabólitos, devido à construção de bibliotecas de espectros em uma combinação da informação de tempo de retenção e o padrão de fragmentação obtido, em decorrência da ionização por elétrons (CANUTO *et al.*, 2018). Por outro lado, compostos voláteis presentes no metaboloma são analisados sem a necessidade de derivatização em cromatografia gasosa por *headspace* (GC *headspace*), utilizada para analisar compostos em baixas concentrações na quais o analito é mais volátil que a matriz, sendo determinado sem a interferência de outros compostos presentes na amostra (GOBATO; LANÇAS, 2001). É importante ressaltar que metabólitos polares e massas moleculares elevadas não são adequados para serem analisados por cromatografia gasosa (GARCIA; BARBAS, 2011). Tripathi *et al.* (2021) relatam um estudo de espectrometria de massa não direcionada empregada para detectar pequenas moléculas em bioespécimes complexas que geram dados difíceis de interpretar. Esse grupo desenvolveu uma estratégia de exploração de dados chamada Qemistree que é baseada na organização em hierarquia de impressões digitais moleculares a partir de espectros de fragmentação permitindo que os dados de espectrometria de massa sejam representados no contexto de metadados de amostras e visualizar a diversidade química em uma coleção heterogênea de amostras.

3.5 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de massas (LC-MS)

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) é uma técnica que possibilita analisar diversas substâncias devido à grande variedade de fases estacionárias disponíveis, além dos diferentes modos de separação, como a eluição em fase reversa com ou sem pareamento iônico, interação hidrofílica, e troca iônica (ARDREY, 2003). Na cromatografia, é feita a separação

dos componentes de uma mistura entre duas fases: uma fixa e de grande área superficial denominada fase estacionária, e um fluido que interage com a fase fixa, chamado fase móvel (MALVIYA *et al.*, 2010). É uma técnica analítica muito utilizada em metabolômica por ser sensível, seletiva e robusta e ainda de fácil operação (CANUTO *et al.*, 2018). A técnica de LC-MS é uma plataforma adequada para análise de compostos polares e apolares pouco voláteis, nos quais a derivatização não é a reação mais adequada (XU *et al.*, 2014). A LC-MS é uma técnica muito atraente em estudos microbiológicos pois possibilita tanto análises-alvo como abordagens globais, realizando, ainda, análises qualitativas e análises quantitativas, fornecendo informações estruturais a partir de dados MS/MS e, simultaneamente, quantificações, sem que haja a necessidade de altas resoluções cromatográficas (BELINATO *et al.*, 2019).

Embora muito utilizada em estudos metabolômicos microbianos, a LC-MS pode apresentar inconvenientes, como a alta concentração de sal produzida a partir do meio de cultura, a qual pode suprimir a eficiência do ESI (Ionização por Electrospray) e bloquear o fluxo suave da bomba, o que leva a uma quantificação pobre e compromete a reprodutibilidade da análise LC-MS (MALVIYA *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2014).

3.6 Ressonância Nuclear Magnética (NMR)

A ressonância magnética nuclear (*nuclear magnetic resonance* – NMR) é uma das técnicas analíticas mais utilizadas em estudos da metabolômica que permite a identificação de rotina de novos compostos por ser abrangente, robusta, pouca ou nenhuma manipulação das amostras, podendo ser analisadas amostras biológicas intactas sólidas ou semissólidas, uso de pouca quantidade de amostra. Além disso, não destroem a amostra após a análise, mesmo quando contaminadas com solventes deuterados (BELINATO *et al.*, 2019). Por ser uma técnica facilmente quantificável, requer pouca ou nenhuma separação cromatográfica ou derivatização

química, torna os estudos de metabolômica em larga escala de alto rendimento muito mais viáveis com espectroscopia de NMR do que com LC-MS ou GC-MS (KLUGER; LEHNER; SCHUHMACHER, 2015). A NMR baseia-se nos núcleos com número ímpar de prótons, nêutrons ou em ambos, possuindo um spin nuclear próprio. Assim, quando um núcleo com um spin nuclear diferente de zero é colocado no campo magnético, o spin nuclear pode alinhar-se na mesma direção ou em direção oposta ao campo, ou seja, é um fenômeno que ocorre quando os núcleos de certos átomos estão imersos em um campo magnético estático e expostos a um segundo campo magnético oscilante e é uma boa técnica analítica para estudo de propriedades físicas, químicas e biológicas da matéria (ABDUL-HAMID *et al.*, 2019; CANUTO *et al.*, 2018; IZQUIERDO-GARCÍA *et al.*, 2011). A espectroscopia de NMR usa técnicas unidimensionais simples quando se quer estudar a estrutura química, já as técnicas bidimensionais são usadas para determinar a estrutura de moléculas mais complicadas (KUEHNBAUM; BRITZ-MCKIBBIN, 2013). Embora apresente muitas vantagens, a espectroscopia de NMR de ¹H apresenta algumas limitações como a baixa sensibilidade e seletividade, apresentando regiões espectrais com sobreposição de sinais, o que leva ao comprometimento da interpretação dos resultados, necessitando, ainda, de equipamentos de alta resolução. Em estudos com micro-organismos, observam-se variações moleculares que vão de pico mol a milimol e a baixa sensibilidade da técnica de NMR leva a muitas preocupações, o que vem a limitar, muitas vezes, a utilização da técnica. No entanto, ainda há muito interesse na aplicação de técnicas de NMR para metabolômica microbiana (CANUTTO *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2014).

3.7 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy* – FT-IR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier é uma técnica usada na obtenção de espectros na absorção no infravermelho ou emissão de sólido, líquido ou gás, coletando, simultaneamente, dados espectrais de alta resolução em uma ampla faixa espectral (BRIELLE; ARKIN, 2018). Técnica menos utilizada em metabolômica mas com potencial aplicação na elucidação estrutural de baixo custo, simples e não destrutiva (IZQUIERDO-GARCÍA *et al.*, 2011).

4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS

Na transformação, dados obtidos das análises de GC-MS e LC-MS e NMR precisam ser convertidos, de modo que possam ser utilizados em outras etapas de análise, pois os dados gerados são abundantes e muito complexos, necessitando de ferramentas adequadas e, com isso, minimizando erros na interpretação dos resultados e conservando a integridade das oscilações biológicas observadas (BELINATO *et al.*, 2019; CANUTO *et al.*, 2018). A associação do conhecimento gerado pela metabolômica com outras “ômicas” possibilita a determinação de genes e rotas metabólicas envolvidas na produção de metabólitos secundários em destaque e essa integração é conhecida como biologia de sistemas (ROCHA, 2006). As alterações metabólicas de vários sistemas biológicos ou ambientais são objeto de estudo da metabolômica global, tendo como principal representante técnica, a LC-MS. Para os dados brutos oriundos dessa técnica, foi desenvolvida uma ampla gama de ferramentas de bioinformática (PANG *et al.*, 2020). O MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>) é um site de análises estatísticas, funcional e integrativo de dados metabolômicos e, nele, estão inseridos um conjunto de

ferramentas de fácil utilização para uma abrangência de dados metabólicos. Desde 2009, ano de sua criação, vem evoluindo para atendimento de demandas cada vez maiores, fornecendo suporte para análises estatísticas, como PCA (análise de componente principal), PLS-DA (análise discriminante de mínimos quadrados parciais), análise e visualização de agrupamento, MSEA (análise de enriquecimento de conjunto de metabólitos), MetPA (análise de via metabólica), seleção de biomarcador via ROC (características de operação do receptor) entre outros. A versão atual do MetaboAnalyst (4.0) possui revisão completa da interface do usuário e bases de conhecimento expandidas, como banco de dados de compostos, bibliotecas de caminhos e conjuntos de metabólitos (CHONG; XIA, 2018; CHONG; WISHART; XIA, 2019). O XCMS é um *software* largamente utilizado para análise de dados em metabolômica, estando disponível de forma aberta on-line, permitindo aos usuários realizar *upload* de dados, executar processamento de dados e navegar pelos resultados em uma interface baseada na web (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012).

REFERÊNCIAS

- ABDUL-HAMID, E.; ROY, R.; MCKAY, R. T.; TENORI, L.; SACCENTI, E.; GOWDA, G. A. N.; RAFTERY, D.; ALAHMARI, F.; JAREMKO, L.; JAREMKO, M.; WISHART, D. S. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. **Metabolites**, v. 9, n. 7, p. 1-39, 2019.
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Metabolomics analysis I. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 11-119, 2010a.
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 120-127, 2010b.
- ARDREY, R. E. **Liquid chromatography – Mass spectrometry: An introduction**. [s.l.]: John Wiley, 2003.

ASLAM, B.; BASIT, M.; NISAR, M. A.; KHURSHID, M.; RASOOL, M. H. Proteomics: technologies and their applications. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 2, p. 182-196, 2017.

BADER, J.; MAST-GERLACH, E.; POPOVIĆ, M.K.; BAJPAI, R.; STAHL, U. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. **Journal Applied Microbiology**, v. 109. p. 371-87, 2010.

BELINATO, J. R.; BAZIOLI, J. M.; SUSSULINI, A.; AUGUSTO, F.; FILL, T. P. Metabolômica microbiana: inovações e aplicações. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 546-559, 2019.

BODE, H. B.; BETHE, B.; HÖFS, R.; ZEECK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBioChem**, v. 3, p. 619-627, 2002.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 21-32, 2013.

BRIELLE, E. S.; ARKIN, I. T. Site-specific hydrogen exchange in a membrane environment analyzed by infrared spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 9, n. 14, p. 4059-4065, 2018.

CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L.; CRUZ, P. L. R.; SOUZA, A.R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n.1, p. 75-91, 2018.

CARON, E.; IANNI, A. M. Z.; LEFEVRE, F. A saúde como ciência e o corpo biológico como artefato: o caso do Jornal Nacional. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 4, p. 1333-1342, 2018.

CHAGAS, M. B. O.; DOS SANTOS, I. P.; DA SILVA, L. C. N.; CORREIA, M. T. S.; ARAÚJO, J. M.; CAVALCANTI, M. S.; LIMA, V. L. M. Antimicrobial activity of cultivable endophytic fungi associated with *Hancornia Speciosa* Gomes bark. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, p. 179-188, 2017.

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 68, n. 1. e86, 2019.

CHONG, J.; XIA, J. MetaboAnalystR: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data. **Bioinformatics**, v. 34, n. 24, p. 4313-4314, 2018.

COLLEMARE, J.; BILLARD, A.; BÖHNERT, H. U.; LEBRUN, MARC-HENRI. Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity. **Mycological Research**, v. 112, p. 207-215, 2008.

CRANEY, A.; AHMED, S.; NODWELL, J. Towards a new science of secondary metabolism. **The Journal of Antibiotics**, v. 66, p. 387-400, 2013.

DEMAIN AL. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 4, p. 455-463, 1999.

DEMAIN, A.L.; ADRIO, J.L. Strain improvement for production of pharmaceuticals and other microbial metabolites by fermentation. In: PETERSEN, F.; AMSTUTZ, R. (Eds.). **Natural Compounds as Drugs**. Volume I. Progress in Drug Research, vol 65. New Delhi, India: CBS Publishers, 2008. p. 251-289. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8117-2_7 2008. Acesso em: 17 fev. 2021.

DUETZ, W. A.; RÜEDI, L.; HERMANN, R.; O'CONNOR, K.; BÜCHS, J.; WITHOLT, B. Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2641-2646, 2000.

DUNN, W. B.; ERBAN, A.; WEBER, R. J. M.; CREEK, D. J.; BROWN, M.; BREITLING, R.; HANKEMEIER, T.; GOODACRE, R.; NEUMANN, S.; KOPKA, J.; VIANI, M. R. Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. **Metabolomics**, v. 9, n. 1, p. 44-66, 2013.

FENG, C.; WEI, Q.; HU, C.; ZOU, Y. Biosynthesis of diphenyl ethers in fungi. **Organic Letters**, v. 21, n. 9, p. 3114-3118, 2019.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and functional genomics**, v. 2, n. 3, p. 155-68, 2001.

FIEHN, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p.155-171, 2002.

GARCIA, A.; BARBAS, C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. **Methods in Molecular Biology**, v. 708, p. 191-204, 2011.

GOBATO, E. A. A. F.; LANÇAS, E F. M. Comparação entre injeção na coluna (“on-column”) e headspace dinâmico na determinação de benzeno, tolueno e xilenos (btx) em amostras de água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 176-179, 2001.

GONG, ZHI-GANG; HU, J.; WU, X.; XU, YONG-JIANG. The Recent developments in sample preparation for mass spectrometry-based metabolomics. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 325-331, 2017.

GONZÁLEZ-MENÉNDEZ, V.; MARTÍNEZ, G.; SERRANO, R.; MUÑOZ, F.; MARTÍN, J.; GENILLOU, O.; TORMO, J. R. Ultraviolet (IUV) and mass spectrometry (IMS) imaging for the deconvolution of microbial interactions. **BMC Systems Biology**, v. 12, n. 99, p. 91-97, 2018.

GREEF, J. V. D. Field desorption mass spectrometry in bioanalysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 5, n. 9, p. 241-246, 1986.

GUMMER, J. P. A.; KRILL, C.; DU FALL, L.; WATERS, O.D. C.; TRENGOVE, R. D.; OLIVER, R. P.; SOLOMON, P. S. Metabolomics protocols for filamentous fungi. *In*: BOLTON, M. D, THOMMA, B. P. H. J. (Eds). **Plant fungal pathogens--Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press, 2012. v. 835. p. 237-254.

HALKET, J. M.; WATERMAN, D.; PRZYBOROWSKA, A. M.; PATEL, R. K. P.; FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 219-243, 2005.

IZQUIERDO-GARCÍA, J. L.; VILLA, P.; KYRIAZIS, A.; DEL PUERTO-NEVADO, L.; PÉREZ-RIAL, S.; RODRIGUEZ, I.; HERNANDEZ, N.; RUIZ-CABELLO, J. Descriptive review of current NMR-based metabolomic data analysis packages. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 59, p. 263-270, 2011.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal Secondary Metabolism -from Biochemistry to Genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 937-946, 2005.

KLUGER, B.; LEHNER, S.; SCHUHMACHER, R. Metabolomics and secondary metabolite profiling of filamentous fungi. *In*: ZEILINGER, S.; MARTÍN, JUAN-FRANCISCO; GARCÍA-ESTRADA, C. (Eds.). **Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites**, Volume 2, Fungal Biology. New York: Springer, 2015. p. 81-101.

KOEK, M.M; MUILWIJK, B; VANDER WERF, M.J; HANKEMEIER, T. Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 1272-1281, 2006.

KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. New Advances in separation science for metabolomics: resolving chemical diversity in a post-genomic era. **Chemical Review**, v. 113, n. 4, p. 2437-2468, 2013.

MALVIYA, R.; BANSAL, V.; PAL, O. P.; SHARMA, P. K. High performance liquid chromatography: a short review. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 2, n. 5, p. 2226. 2010.

MCINTOSH, J. A.; DONIA, M. S.; NAIR, S. K.; SCHMIDT, E. W. Enzymatic basis of ribosomal peptide prenylation in cyanobacteria. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 34, p. 13698-13705, 2011.

O'CONNOR, S. E. Alkaloids. *In*: MANDER, L.; LUI, H. W. (Eds.). **Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology**. Oxford: Elsevier, 2010. v. 1. p. 977-1007.

OSBOURN, A. Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. **Trends in Genetics**, v. 26, n. 10, p. 449-457, 2010.

- PANG, Z.; CHONG, J.; LI, S.; XIA, J. MetaboAnalystR 3.0: Toward an optimized workflow for global metabolomics. **Metabolites**, v. 10, n. 5, p. 1-14, 2020.
- PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: The apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 263-269, 2012.
- PENG, J.; ELIAS, J. E.; THOREEN, C. C.; LICKLIDER, L. J.; GYGI, S. P. Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LCMS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 2, n. 1, p. 43-50, 2003.
- PETTIT, R.K. Small-Molecule elicitation of microbial secondary metabolites. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 471-478, 2011.
- RANK, C.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C. Functional systems biology of *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. (Eds.). **Aspergillus: Molecular biology and genomics**. [s.l.]: Caister Academic Press, 2010. p. 173-198.
- RIGALI, S.; TITGEMEYER, F.; BARENDT, S.; MULDER, S.; W THOMAE, A.; HOPWOOD, D. A.; VAN WEZEL, G. P. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. **EMBO Reports**, v. 9, n. 7, p. 670-675, 2008.
- RISDIAN, C.; MOZEF, T.; WINK, J. Biosynthesis of polyketides in *Streptomyces*. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 124, 2019.
- ROCHA, T. L. **Metabolômica: Aplicações e perspectivas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006.
- SANTOS, S. S. C; LUNARDI, V. L; ERDMANN, A. L.; CALLONI, H. Interdisciplinaridade: a pesquisa como eixo de formação/profissionalização na saúde/enfermagem. **Revista Didática Sistêmica**, v. 5, p. 1-10, 2007.
- SCHERLACH, K.; GRAUPNER, K.; HERTWECK, C. Molecular Bacteria-Fungi interactions: Effects on environment food and medicine. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 375-97, 2013.
- SOLTANI, J. Secondary Metabolite Diversity of the Genus *Aspergillus*. In: GUPTA, V. (Ed.). **Recent Advances in New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. [s.l.]: Elsevier, 2016. p. 275-292.
- TCHOUKOUA, A.; HASEGAWA, R.; HENDRACIPTA, K.A.; SATO, S.; KOSEKI, T.; SHIONO, Y. Structure elucidation of new fusarielins from *Fusarium* sp. and their antimicrobial activity. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 56, p. 32-36, 2018.
- THIRUMURUGAN, D.; CHOLARAJAN, A.; RAJA, S. S.S.; VIJAYAKUMAR R. An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. In: VIJAYAKUMAR R.; RAJA, S. S. S. (Eds.) **Secondary Metabolites: Sources and Applications**. London: IntechOpen, 2018. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/>

secondary-metabolites-sources-and-applications/an-introductory-chapter-secondary-metabolites. Acesso em: 17 fev. 2021.

TISCH, D.; SCHMOLL, M. Light regulation of metabolic pathways in Fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1259-1277, 2010.

TIWARI, R.; RANA, C. S. Plant secondary metabolites: a review. **International Journal of Engineering Research and General Science**, v. 3, n. 5, p. 661-670, 2015.

TRIPATHI, A.; VÁZQUEZ-BAEZA, Y.; GAUGLITZ, J. M.; WANG, M.; DÜHRKOP, K.; NOTHIAS-ESPOSITO, M.; ACHARYA, D. D.; ERNST, M.; VAN DER HOOFT, J. J. J.; ZHU, Q.; MCDONALD, D.; BREJNROD, A. D.; GONZALEZ, A.; HANDELSMAN, J.; FLEISCHAUER, M.; LUDWIG, M.; BÖCKER, S.; NOTHIAS, LOUIS-FÉLIX; KNIGHT, R.; DORRESTEIN, P. C. Chemically informed analyses of metabolomics mass spectrometry data with Qemistree. **Nature Chemical Biology**, v. 17, p. 146-151, 2021.

VAISHNAV, P.; DEMAINE, A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p. 223-229, 2010.

VESSECCI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.

XU, YONG-JIANG; WANG, C.; HO, W. E.; ONG, C. N. Review Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 37-48, 2014.

YIN, W.; KELLER, N. P. Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. **Journal Microbiology**, v. 49, p. 329-339, 2011.

YU, J. H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Review of phytopathology**, v. 43, p. 437-58, 2005.

ZIEGLER, S. PRIES, V. HEDBERG, C. WALDMANN, H. ANGEWANDTE. Target identification for small bioactive molecules: finding the needle in the haystack. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 10, p. 2744-2792, 2013.

ZINI, C. A. Extração sortiva em barra de agitação (SBSE): Fundamentos teóricos e fases seletivas. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 1, p. 22-29, 2009.



Capítulo 9

ESTRATÉGIAS PARA O ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA

AMANDA DOS REIS CORREIA
ROBERTA SIGNINI
PLÍNIO LÁZARO FALEIRO NAVES

1 INTRODUÇÃO

Polímeros são definidos como macromoléculas de origem natural ou sintética que possuem elevada massa molar obtida pela repetição de monômeros unidos por ligações covalentes (NUNES; LOPES, 2014). Os biopolímeros são biomateriais naturais degradáveis, de baixo custo, produzidos por monômeros, oriundos de organismos vivos e que correspondem a cerca de 75% de todo o material orgânico da Terra (MORGANTI; COLTELLI, 2019).

Do ponto de vista ambiental, os biomateriais são atrativos, pois podem ser obtidos a partir de diferentes recursos renováveis, como milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina, dentre outros. Além disso, os polímeros derivados do petróleo apresentam limitações quanto aos impactos ambientais e socioeconômicos, especificamente, quanto ao processo de extração e refino, além do elevado custo (BRITO *et al.*, 2011).

Os biopolímeros estão entre os materiais com maior potencial tecnológico, pois apresentam benefícios em sua utilização, como a facilidade de fabricação de formas variadas (partículas, filmes, fios,

dentre outros), o processamento secundário, preço razoável e disponibilidade em encontrar materiais que tenham características físicas e mecânicas para aplicações específicas (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Neste contexto, a quitina é um biopolímero promissor que pode ser obtido de fontes marinhas (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010) e de rejeitos da indústria pesqueira (HE *et al.*, 2019). É bastante abundante na natureza, com produção estimada em cerca de um trilhão de toneladas por ano (MOEINI *et al.*, 2020; MONTER-MIRANDA *et al.*, 2016). Constitui-se como principal material estrutural do exoesqueleto de vários invertebrados, (MORGANTI; COLTELLI, 2019) como moluscos, crustáceos, insetos, algas, fungos, nematoides e outros organismos relacionados (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015).

Quitina é um polissacarídeo de cadeia linear constituído por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, (SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 1998). Sua estrutura semicristalina e as suas ligações intermoleculares de hidrogênio a tornam insolúvel em água, solventes orgânicos comuns e solventes aquosos diluídos (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015).

A quitosana é o principal derivado da quitina e pode ser obtido pelo processo de desacetilação, além de ser encontrado em alguns fungos como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (BRASSELET *et al.*, 2019; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). Semelhante à quitina, a quitosana (Figura 1), também um polissacarídeo linear, pode ser definida como um copolímero de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose, unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, de composição variável, em função do grau residual de acetilação (SIGNINI; CAMPANA FILHO, 1998).

Capítulo 9

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA

Figura 1 – Processo de preparação da quitina e quitosana



Fonte: Adaptado de Moeini *et al.* (2020).

A quitosana é um polímero versátil que pode ser utilizado em diversas áreas, tais como agricultura (ARNAUD *et al.*, 2017; MUJTABA *et al.*, 2020), medicina (VARLAMOV; MYSYAKINA, 2018), medicina veterinária (SENEL; MCCLURE, 2004), biologia (VARLAMOV; MYSYAKINA, 2018), odontologia (ALIASGHARI *et al.*, 2016), cosmética (ARANAZ *et al.*, 2018), indústria biomédica (WU; XU, 2018), indústria alimentícia (ARNAUD *et al.*, 2017), indústria têxtil (SHARIATINIA, 2019), farmácia (AHMED; ALJAEID, 2016) dentre outras (PENICHE; ARGUELLES-MONAL; GOYCOOLEA, 2008).

A investigação de métodos para o aprimoramento da obtenção, diluição e funcionalização da quitosana é importante para aplicações biotecnológicas. Considerando esse contexto, neste capítulo, são descritas estratégias para o estudo da atividade antimicrobiana da quitosana e os últimos avanços dos estudos sobre as propriedades antimicrobianas da quitosana, englobando a descrição, caracterização, mecanismos de ação contra patógenos e perspectivas de desenvolvimento e aplicações.

2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA

As diferentes formas de utilização dos biopolímeros apresentam papel relevante nos avanços científicos e tecnológicos. O potencial de aplicação da quitosana é multidimensional (AZEVEDO *et al.*, 2007). Em virtude disso, ela se tornou um produto atrativo por suas atividades biológicas, dentre as quais, a antimicrobiana (NO *et al.*, 2002).

A atividade antimicrobiana da quitosana foi descrita contra uma variedade de micro-organismos, tais como bactérias, fungos filamentosos, leveduras, vírus, algas, oomicetos, ou mesmo no combate a pragas no setor agrícola. Está relacionada com diferenças na massa molecular e no grau de acetilação (EL HADRAMI *et al.*, 2010; MATICA; MENGHIU; OSTAFE, 2017).

Nos últimos 20 anos, foram executados diversos estudos para avaliar a atividade antimicrobiana da quitosana contra diversos micro-organismos. No período avaliado (2000 a 2019), 8 trabalhos foram publicados com a avaliação da atividade contra 20 bactérias, 9 fungos, 3 oomicetos e 1 larva de inseto. A quitosana foi capaz de inibir todas as bactérias, fungos e oomicetos testados, entretanto, não apresentou atividade contra a larva do inseto *Spodoptera littoralis* (AFFES *et al.*, 2019; BARBOSA *et al.*, 2017; EL BADAWY, 2008; KAYA *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2018; TIN *et al.*, 2010; VASYUKOVA *et al.*, 2010).

Alguns mecanismos foram propostos para se determinar a ação antimicrobiana da quitosana (ALIASGHARI *et al.*, 2016; BECK *et al.*, 2019; DRAGOSTIN *et al.*, 2016; POLYUDOVA *et al.*, 2019; ZARAYNEH *et al.*, 2018), sendo considerado o mecanismo mais aceito a interação eletrostática da molécula de quitosana carregada positivamente contra as proteínas da membrana celular microbiana carregadas negativamente. Esta interação provoca alterações na sua superfície microbiana, podendo destruir a estrutura celular, aumentar a permeabilidade da membrana, levando ao vazamento de substâncias intracelulares e comprometendo as atividades vitais do

patógeno (GOY; MORAIS; ASSIS, 2016; LOGITHKUMAR *et al.*, 2016; MORATTI; CABRAL, 2017; XING *et al.*, 2015).

3 CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO MICROBIOLÓGICO COM QUITOSANA

A atividade antimicrobiana sofre interferências de fatores como o tipo da quitosana, grau de polimerização, massa molecular, grau de acetilação, solubilidade, pH, o micro-organismo a ser testado, a composição química nutricional do meio de cultivo e condições ambientais do ensaio (EL HADRAMI *et al.*, 2010; KIM, 2018). A dissolução da quitosana é geralmente realizada em ácido acético, dissolvendo-o em 1% ou 0,1 M de ácido acético de modo que a quantidade de ácido necessária depende da quantidade de quitosana a ser dissolvida (RINAUDO, 2006).

Os testes de sensibilidade a antimicrobianos são indicados quando a sensibilidade de um micro-organismo que está envolvido em um processo infeccioso não possa ser predita a partir de sua identificação (CLSI, 2003).

A normatização internacionalmente conhecida do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) normalmente é empregada para antimicrobianos conhecidos e há poucos estudos comparativos que relatam qual o melhor método a ser utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de bioprodutos. A despadronização das metodologias limita as pesquisas sobre atividade antimicrobiana de bioprodutos e dificulta a comparação de resultados obtidos por diferentes pesquisadores que avaliam o mesmo tipo de amostra (BONA *et al.*, 2014).

3.1 Aquisição

A quitosana comercializada pode ser produzida de forma artificial, no entanto, na maioria das vezes, é extraída do exoes-

queleto de crustáceos a partir da desacetilação da quitina (ARNAUD *et al.*, 2017).

Nos ensaios microbiológicos realizados por nosso grupo, a quitosana foi adquirida da empresa *Sigma Aldrich*. Outros pesquisadores também optaram por comprar a quitosana de baixo e médio peso molecular de empresas que vendem materiais de biotecnologia (BARBOSA *et al.*, 2017; EL BADAWY, 2008; KAYA *et al.*, 2014; TIN *et al.*, 2010). Outros grupos optaram por quitosana adquirida de outras empresas, como a *Funakoshi Co.* (Japão) (LI *et al.*, 2000), *Qingdao Yun Zhou Biochemistry Co.* (China) (LIU *et al.*, 2018).

Outros grupos obtiveram o composto por diversas vias, Vasyukova *et al.* (2010) por via enzimática e hidrólise ácida, Kaya *et al.* (2014) a partir da quitina extraída de ovos de *Daphnia longispina* (crustacea) para produzir quitosana e O-carboximetilquitosana e também utilizou a quitosana da *Sigma Aldrich*. Affes *et al.* (2019) obtiveram a quitina e a quitosanase de forma natural, a partir da pesca de siri-azul e de camarões adquiridos no mercado de pesca localizado em Sfax (Tunísia) e a quitina foi processada para obtenção da quitosana e dos compostos derivados.

Mathur e Narang (1990) relatam que a quitina comercial possui viscosidade e peso molecular mais baixos, que são 10-50% do polímero nativo. Já Battisti e Campana-Filho (2008) relatam que o tratamento de desmineralização da biomassa para a extração da quitina, a temperatura e o tempo de desacetilação afetam a viscosidade da quitosana.

Campana-Filho *et al.* (2007) relatam que não é incomum encontrar problemas de reprodutibilidade das características da quitina e quitosana comerciais, mesmo quando a matéria-prima advém do mesmo fabricante, mas de diferentes lotes da produção. Esses problemas podem estar associados às características intrínsecas da matéria-prima utilizada e podem ocorrer quando partes distintas dos exoesqueletos são processadas conjuntamente, ou

quando os exoesqueletos provêm de uma indústria pesqueira que apenas coleta os animais e não faz a separação por espécie, idade ou por fase de desenvolvimento.

Battisti e Campana-Filho (2008) relatam que, embora os fornecedores de quitina comercial descrevam de maneira abrangente a fonte natural usada para extrair o polissacarídeo, não mencionam se utilizaram apenas uma ou mais partes do exoesqueleto dos crustáceos. Além disso, relatam que há pouca informação sobre as etapas de processamento das matérias-primas. Dessa forma, existe uma variação nas características e na reatividade da quitina comercial e, mesmo que seja produzida da mesma matéria-prima, é comum encontrar resultados não reprodutíveis, mesmo quando gerados a partir da mesma matéria-prima. O mesmo ocorre com a quitosana.

Esses problemas foram relatados em congressos internacionais e artigos científicos e, para contorná-los, algumas alternativas podem se dar através do controle rígido de qualidade e pureza da quitina, através de análises espectrais, investimento em pesquisas e desenvolvimento de protocolos que visam à extração do polímero sob condições controladas em laboratório de pesquisa de modo a superar as dificuldades encontradas para realizar o potencial de aplicações da quitosana (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

3.2 Pesagem e dissolução

A determinação da massa a ser pesada para a concentração da solução estoque de 5 mg/mL se deu pelo emprego da fórmula de concentração ($c=m/v$) em mg/mL. A partir dessa fórmula, o valor da massa foi convertido em g/mL e a quantidade pesada em balança analítica foi calculada com os valores da concentração e volume já definidos. O volume do diluente (ácido acético 1%) foi medido em proveta e colocado em um béquer ou Erlenmeyer devidamente esterilizado; logo após, colocou-se uma barra magnética dentro do béquer ou erlenmeyer, que foi levado para um agitador magnético;

Em seguida, ligou-se o agitador e despejou-se a massa pesada do composto dentro do vidro com ácido acético, que ficou em agitação em um período de 16 a 24 horas. Após a completa dissolução da quitosana em ácido acético, ainda com o agitador magnético ligado, a solução de quitosana foi neutralizada com solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) na concentração 1 mol/L até que o pH atingiu um valor de 6,0. O pH foi aferido por pHmetro. Depois disso, a solução permaneceu em agitação por mais 15 minutos.

A solução estoque de quitosana empregada por Kaya *et al.* (2014) foi dissolvida em ácido acético 0,5% em uma concentração de 5 mg/mL para realização dos ensaios antimicrobianos e antioxidante. A solução foi esterilizada a 121 °C por 20 minutos em autoclave. Em seguida, foi armazenada a 4 °C até o seu uso, porém, os autores não informaram por quantos dias a solução de quitosana ficou armazenada.

Liu *et al.* (2018) dissolveram a quitosana e seus derivados em ácido acético a 0,5% (v/v), a uma concentração original de 8% (p/v). Tin *et al.* (2010) utilizaram uma solução tampão de acetato de pH 4,65 como solvente para o preparo da solução estoque de quitosana.

A solução estoque de El Badawy (2008) foi preparada pela dissolução da quitosana em 1% (v/v) de ácido acético aquoso, o pH foi ajustado para 5,5–6,0 com NaOH 1 mol/L e a de Affes *et al.* (2019) foi dissolvida em ácido acético a 0,1%.

Os demais trabalhos analisados não explicitaram como a dissolução da solução estoque de quitosana foi realizada.

3.3 Esquema de diluição

Após a esterilização em autoclave dos tubos vazios, a diluição da quitosana foi realizada em capela de fluxo laminar devidamente limpa e desinfetada. O ensaio realizado foi o de microdiluição em caldo para a determinação da concentração mínima inibitória dos

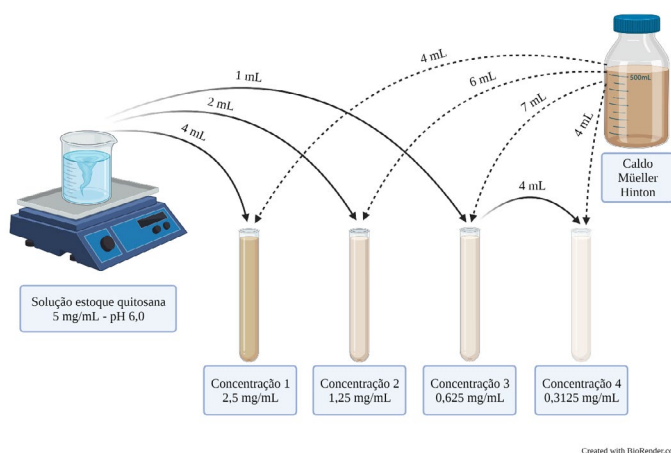
Capítulo 9 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA

compostos. O caldo utilizado foi o preconizado pelo CLSI, 2016: Mueller Hinton (MH). A quitosana foi diluída para a obtenção das concentrações 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg/mL. Os tubos foram agitados até a completa homogeneização da solução e os controles com ácido acético neutralizado seguiram a mesma sequência de diluição. A realização da diluição (Figura 2) foi calculada com a fórmula (Equação 1):

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo que: C_1 = concentração inicial; V_1 = volume inicial; C_2 = concentração final; V_2 = volume final.

Figura 2 – Esquema da diluição da quitosana em caldo Mueller Hinton



Fonte: Próprios autores (2021), criado com Biorender.com.

3.4 Tipos de ensaios antimicrobianos

Um total de 13 *Pseudomonas aeruginosa* foram testadas, 11 isolados clínicos, e as cepas padrão de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC 9027 foram reativadas em ágar MH, pela técnica do esgota-

mento. As placas foram semeadas com auxílio de alças de platina e, em seguida, incubadas a 35° C por 24 horas. A concentração mínima inibitória (CMI) da quitosana foi determinada conforme o protocolo estabelecido pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016). Os inóculos bacterianos foram preparados, suspensos em tubo com 4,5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) até obtenção de uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, foram transferidos 100 µL do inóculo para tubo com 9,9 mL de caldo Mueller Hinton, obtendo-se, assim, a concentração de células de 1×10^7 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. Após isso, foram transferidos 50 µL desse caldo para os poços da microplaca de poliestireno contendo a quitosana nas concentrações previamente descritas. Após incubação das microplacas a 35 °C durante 24 horas, a CMI foi determinada de forma visível como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano da amostra em mg/mL. Os testes foram acompanhados de controle de viabilidade dos micro-organismos na ausência dos compostos testados, controle de esterilidade e controle de técnica com um antimicrobiano (gentamicina) comercial adquirido pela *Sigma Aldrich* e que é preconizado pelo CLSI. Para confirmação da CMI, foi realizado o teste de concentração mínima bactericida (CMB) em todas as concentrações cuja CMI foi determinada. Todos os testes foram realizados em triplicata.

A atividade antimicrobiana da quitosana e da O-carboximetilquitosana foi determinada pela impregnação de discos com 50 µL (250 µg / disco) de solução de quitosana. O diâmetro das zonas de inibição foi utilizado como medida da atividade antimicrobiana. Discos antibióticos convencionais foram utilizados como controles de técnica. Discos com ácido acético a 0,5% foram utilizados como controle do solvente dos compostos. A concentração mínima bactericida (CMB) e a concentração mínima fungicida (CMF) foram determinadas pela adição de uma solução de 5 mg/mL de quitosana em caldo nutriente e tripticase soja e

posterior diluição em série para que fossem obtidas as concentrações de 2,50; 1,25; 0,63; 0,32; 0,16 e 0,08 mg/mL. Após a incubação, alíquotas dos caldos foram plaqueadas em ágar nutriente, TSA e YPD para confirmar ausência de crescimento microbiano nas concentrações inibitórias e as CMB e CMF. Os testes foram realizados em duplicata (KAYA *et al.*, 2014).

A atividade fungicida da quitosana e de derivados foi avaliada através da técnica de crescimento de micélio radial de fungos patogênicos do solo. As placas foram incubadas no escuro, a 28 °C, para *Fusarium oxysporum* e *Pythium debaryanum*, e a 30 °C, para *Pyricularia grisea*. As medidas de crescimento radial da colônia foram determinadas quando os micélios no controle cresceram até a borda da placa e os valores de EC_{50} (redução de 50% no crescimento radial de micélio) com limites de confiança de 95% correspondentes foram estimados usando análise probit (EL BADAWY, 2008).

A atividade antifúngica dos complexos metálicos de quitosana foi avaliada contra *Phytophthora capsici*, *Verticillium albo-atrum*, *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani*. Foi utilizado quitosana e cuproxat como grupo-controle, este um fungicida de cobre disponível comercialmente amplamente utilizado (LIU *et al.*, 2018).

O teste denominado tabuleiro de damas consistiu na utilização de uma placa de 96 poços, onde as quatro primeiras colunas de poços serviram como controles de viabilidade dos micro-organismos e controle de esterilidade. Foram realizadas oito diluições duplas de antibióticos com caldo *sensitest* na placa de oito linhas por oito colunas. O antibiótico foi colocado nos poços de oito fileiras em concentrações, começando duas vezes a CMI e terminando em zero. A quitosana foi igualmente distribuída. Assim, os 64 poços possuíam uma combinação única das concentrações da quitosana com o antibiótico. Em seguida, foram transferidos inóculos de 50 µL de *S. aureus* por poço (5×10^5 UFC/mL). As placas foram incubadas e a CMI foi obtida (TIN *et al.*, 2010).

O ensaio de atividade antibacteriana foi realizado de acordo com o método de difusão em ágar. A atividade antibacteriana foi avaliada com aferição do diâmetro da zona de inibição de crescimento ao redor dos poços. O controle negativo consistiu em 0,1% de ácido acético, usado para dissolver a amostra de quitosana. Gentamicina foi usada como controle positivo para determinar a sensibilidade de cada cepa bacteriana. A CMI e CMB de quitosana foi determinada pelo teste de inibição do crescimento líquido em um sistema estéril em microplaca de 96 poços. Os valores de CMI e CMB foram expressos em porcentagem (ou em g/100 mL). A atividade antifúngica da quitosana foi avaliada usando a técnica de difusão em meio de Agar extrato de malte, na concentração de 50 mg/mL. Estimou-se a atividade antifúngica medindo os diâmetros da zona de inibição do crescimento (em milímetros) ao redor dos poços (incluindo o diâmetro de 6 mm). Cicloheximida foi usada como parâmetro de comparação de atividade antimicrobiana (AFFES *et al.*, 2019).

O Quadro 1 resume as principais características metodológicas dos ensaios antimicrobianos realizados com quitosana nos 8 trabalhos avaliados.

Quadro 1 – Principais características metodológicas dos ensaios antimicrobianos com a quitosana nos trabalhos avaliados entre os anos 2000 a 2019

Referências	Compostos	Concentrações (mg/mL)	Ensaios
(LI <i>et al.</i> , 2000)	quitosana híbrido de quitosana-L-Fuc híbrido de quitosana-D-Fuc híbrido de quitosana-D-GlcNAc	0,5 1,0 5 10	teste difusão em disco
(EL BADAWY, 2008)	quitosana N ⁻ (furan-2-ilmetil) quitosana N ⁻ [(5-metilfuran-2-il) metil] quitosana N ⁻ (piridin-3-ilmetil) quitosana N-(benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetil) quitosana N ⁻ (metil- 4H -cromen-4-ona) quitosana	0,1 0,25 0,5 1 2 3	crescimento de micélio radial atividade inseticida
(TIN <i>et al.</i> , 2010)	Quitosana quitosana e antibióticos oligosacarídeos de quitosana e antibióticos	dobro da CMI dos antibióticos testados e terminando em CMI zero	CMI CMB

Referências	Compostos	Concentrações (mg/mL)	Ensaio
(VASYUKOVA <i>et al.</i> , 2010)	Quitosana		atividade imunomoduladora em discos de tubérculos de batata
	Ia- Salicilato de quitosana		
	Ib- N (2 hidroxibenzoil) quitosano	0,1	
	Ic- N (2 hidroxibenzil) quitosano	0,001	
	Id- N piridoxquitosano	0,0001	
	Ila- N (2 hidroxibenzil) N piridox quitosana	0,00001	
(KAYA <i>et al.</i> , 2014)	Ilb- N (2 hidroxibenzil) quitosana		teste difusão em disco CMB CMF
	Ilc- N (2 hidroxibenzil) quitosana		
	N piridoxquitosano		
	quitosana	2,50	
	O-carboximetilquitosana	1,25	
		0,63	
(BARBOSA <i>et al.</i> , 2017)		0,32	CMI IC ₅₀
		0,16	
		0,08	
	base de Schiff de quitosana CH H-Ch MeO-Ch	0,02	
	NO2-Ch	0,03	
	complexos Pd-H-Ch Pd-MeO-Ch Pd-NO2-Ch	0,04	
Pt-H-Ch Pt-MeO-Ch Pt-NO2-Ch	0,05		
		0,06	

Capítulo 9
ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA

Referências	Compostos	Concentrações (mg/mL)	Ensaio
(LIU <i>et al.</i> , 2018)	Quitosana		
	O-CSP1-Cu		
	O-CSP2-Cu		
	O-CSP3-Cu		
	O-CSP4-Cu		
	O-CSP1-Zn		
	O-CSP2-Zn		
	O-CSP3-Zn		
	O-CSP4-Zn		
	O-CSP1-Ni		
O-CSP2-Ni			
O-CSP3-Ni			
O-CSP4-Ni			
		0,1	
		0,2	
		0,4	
			ensaio antifúngico: método da taxa de crescimento de placas
(AFFES <i>et al.</i> , 2019)	Quitosana		
	derivados de quitosana obtidos através da despolimerização, variando em massa molecular (alta massa molecular: C _{1h} C _{5h} C _{15h} C _{24h}) (baixa massa molecular: H _{1h} H _{5h} H _{15h} H _{24h})	50	técnica de difusão em ágar CMI CMB atividade antifúngica – técnica de difusão em meio ágar extrato de malte
(CORREIA <i>et al.</i> , 2020)	Quitosana	2,5	
		1,25	
		0,625	
		0,3125	
			CMI CMB

3.5 Interpretação dos resultados

No estudo de nosso grupo, foi possível determinar que a CMI da quitosana variou de 1,25 a 2,5 mg/mL e que a CMB foi > 2,5 mg/mL contra as cepas testadas de *P. aeruginosa*.

Kaya *et al.* (2014) observaram que, através do ensaio de difusão de disco, a quitosana (com 70 ~ 75% de desacetilação) apresentou vários graus de inibição em todos os micro-organismos testados e teve melhor resultado do que a O-carboximetilquitosana.

No estudo de El Badawy (2008), a ação da quitosana não apresentou atividade contra a larva de inseto *Spodoptera littoralis*, entretanto, contra os fungos *Pyricularia grisea*, *Fusarium oxysporum* e para o oomiceto *Pythium debaryanum*, a quitosana foi eficaz em concentração > 3 mg/mL. Os autores observaram que os derivados sintetizados foram mais ativos que a quitosana e exibiram atividade fungicida contra os fungos testados.

O efeito antifúngico de todos os complexos metálicos foi melhor que o da quitosana, principalmente contra *P. capsici* e *B. cinerea*. O complexo O-CSPX-Cu foi melhor que os outros derivados e seu efeito inibitório foi muito melhor que o cuproxat em baixas concentrações. Mesmo com o complexo de zinco apresentando atividade antifúngica mais fraca em relação a outros complexos, o índice antifúngico ainda era maior do que a quitosana altamente desacetilada. Isso mostra que a atividade antifúngica da quitosana pode ser aprimorada com íons metálicos (LIU *et al.*, 2018).

A combinação de 10 antibióticos (claritromicina, cloranfenicol, ceftriaxona, ofloxacina, polimicina B, sulfametaxazol, estreptomicina, tobramicina, tetraciclina e trimetoprim) com quitosana e oligossacarídeos de quitosana mostraram níveis diferentes de CMI em *Staphylococcus aureus*. Quatro preparações de quitosana e oligossacarídeos de quitosana mostraram-se eficazes contra *Staphylococcus aureus*, sendo a quitosana mais eficaz do que o derivado de quitosana (TIN *et al.*, 2010).

O híbrido quitosana-L-Fuc mostrou ser mais eficaz do que os outros derivados e do que a quitosana ao inibir o crescimento de *P. aeruginosa* (LI *et al.*, 2000). Já Barbosa *et al.* (2017) observaram que a quitosana modificada apresentou efeitos contra a *Pseudomonas syringea*, entretanto, obteve menor efeito contra *Fusarium graminearum*. Com a quitosana, ocorreu o inverso.

O resultado do método de difusão em ágar revelou que os produtos derivados de quitosana despolimerizada testados foram mais eficazes que a quitosana em todas as bactérias testadas. Entretanto, houve melhor resultado contra as cepas Gram-negativas. Esses resultados estão relacionados com o peso molecular, grau de acetilação, concentração e estirpe alvo. Os resultados dos testes de difusão em ágar, CMI e CMB são dependentes das características da quitosana, especialmente da massa molecular e do tipo de bactéria. Em todos os casos, o derivado sintetizado de alto de peso molecular exibiu efeitos antibacterianos mais elevados do que o derivado sintetizado de baixo peso molecular e a quitosana. Com relação à atividade antifúngica, foi constatado que os compostos sintetizados foram mais ativos do que a quitosana (AFFES *et al.*, 2019).

4 CONCLUSÃO

A análise dos estudos publicados permitiu constatar que a maioria dos trabalhos versou sobre a síntese de derivados da quitosana e comparou sua eficácia antimicrobiana com a quitosana e os respectivos controles de técnica. Foram encontrados resultados promissores na atividade antimicrobiana com o novo derivado sintetizado, comparado com a quitosana. Isso evidencia que a quitosana é um produto promissor e que, quando aperfeiçoada, pode trazer resultados melhores do que em seu estado original.

Algumas diferenças que podem ser citadas no nosso estudo, comparado aos outros trabalhos, é que 33,3% das pesquisas apre-

sentadas não dedicaram atenção ao demonstrar como foi preparada a solução estoque utilizada no ensaio microbiológico.

Um dos fatores que pode interferir no resultado do teste microbiológico é a ausência de padronização na dissolução da solução estoque de quitosana. Por se tratar de um produto natural e por não existir uma padronização na forma de dissolução, tempo e temperatura de armazenamento, pode ser que fatores como luz, temperatura, umidade propiciem a degradação do produto.

REFERÊNCIAS

AFFES, S.; ARANAZ, I.; HAMDI, M.; ACOSTA, N.; GHORBEL-BELLAAJ, O.; HERAS, A.; NASRI, M.; MAALEJ, H. Preparation of a crude chitosanase from blue crab viscera as well as its application in the production of biologically active chito-oligosaccharides from shrimp shells chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 558-569, 2019.

AHMED, T. A.; ALJAEID, B. M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 483-507, 2016.

ALIASGHARI, A.; KHORASGANI, M. R.; VAEZIFAR, S.; RAHIMI, F.; YOUNESI, H.; KHOROUSHI, M. Evaluation of antibacterial efficiency of chitosan and chitosan nanoparticles on cariogenic *streptococci*: An in vitro study. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 93-100, 2016.

ARANAZ, I.; ACOSTA, N.; CIVERA, C.; ELORZA, B.; MINGO, J.; CASTRO, C.; GANDÍA, M. de los L.; CABALLERO, A. H. Cosmetics and cosmeceutical applications of chitin, chitosan and their derivatives. **Polymers**, v. 10, n. 2, p. 1-25, 2018.

ARNAUD, T. M. S.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P. Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e em alimentos. In: RESENDE, R. R. (Org.). **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria: Fundamentos e aplicações** – Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017. p. 503-528.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007. Disponível em: https://www2.ibb.unesp.br/Museu_Escola/4_diversidade/alimentacao/Textos/Quitina_Quitosana.pdf. Acesso em: 06 abr.2020.

Capítulo 9

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA

BARBOSA, H. F. G. A.; ATTJIOUI, M.; FERREIRA, A. P. G.; DOCKAL, E. R.; GUEDDARI, N. E. E.; MOERSCHBACHER, B. M.; CAVALHEIRO, É. T. G. Synthesis, characterization and biological activities of biopolymeric schiff bases prepared with chitosan and salicylaldehydes and their Pd(II) and Pt(II) complexes. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1-19, 2017.

BATTISTI, M. V.; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2014-2019, 2008.

BECK, B. H. YILDIRIM-AKSOY, M.; SHOEMAKER, C. A.; FULLER, S. A.; PEATMAN, E. Antimicrobial activity of the biopolymer chitosan against *Streptococcus iniae*. **Journal of Fish Diseases**, v. 42, n. 3, p. 371-377, 2019.

BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572014000300218&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 20 abr.2020.

BRASSELET, C.; PIERRE, G.; DUBESSAY, P.; DOLS-LAFARGUE, M.; COULON, J.; MAUPEU, J.; VALLET-COURBIN, A.; BAYNAST, H. de.; DOCO, T.; MICHAUD, P.; DELATTRE, C. Modification of Chitosan for the Generation of Functional Derivatives. **Applied Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1-33, 2019.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J.A. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011. Disponível em: <http://www2.ufcg.edu.br/revista-remap/index.php/REMAP/article/viewFile/222/204>. Acesso em: 06 abr.2020.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITO, D. de.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 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.

CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 26th ed. CLSI supplement M100S [ISBN 1-56238-923-8 [Print]; ISBN 1-56238- 924-6 [Electronic]]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2016.

CORREIA, A. R.; ANDRADE, C. C.; CARVALHO, E. G. B.; COSTA, M. B.; SIGNINI, R.; NAVES, P. L. F. Atividade antimicrobiana de compostos quitosânico-guanilados contra isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. In: CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS (CEPE): TRANSPONDO DESAFIOS NA EDUCAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EM TEMPOS DE PANDEMIA, 7., 2020, Anápolis.

DRAGOSTIN, O. M. SAMAL, S. K.; DASH, M.; LUPASCU, F.; PÂNZARIU, A.; TUCHILUS, C.; GHETU, N.; DANCIU, M.; DUBRUEL, P.; PIEPTU, D.; VASILE, C.; TATIA, R.; PROFIRE, L. New antimicrobial chitosan derivatives for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 141, p. 28-40, 2016.

EL BADAWY, M. Chemical modification of chitosan: Synthesis and biological activity of new heterocyclic chitosan derivatives. **Polymer International**, v. 57, n. 2, p. 254-261, 2008.

EL HADRAMI, A.; ADAM, L. R.; EL HADRAMI, I. DAAYF, F. Chitosan in plant protection. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 968-987, 2010.

GOY, R. C.; MORAIS, S. T. B.; ASSIS, O. B. G. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. Coli* and *S. aureus* growth. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 1, p. 122-127, 2016.

HE, X.; XING, R.; LIU, S.; QIN, Y.; LI, K.; YU, H.; LI, P. The improved antiviral activities of amino-modified chitosan derivatives on Newcastle virus. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 1, p. 1-6, 2019.

KAYA, M.; CAKMAK, Y. S.; BARAN, T.; ASAN-OZUSAGLAM, M.; MENTES, A.; TOZAK, K. O. New chitin, chitosan, and O-carboxymethyl chitosan sources from resting eggs of *Daphnia longispina* (Crustacea); with physicochemical characterization, and antimicrobial and antioxidant activities. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 1, p. 58-69, 2014.

KHOUSHAB, F.; YAMABHAI, M. Chitin research revisited. **Marine Drugs**, v. 8, n. 7, p. 1988-2012, 2010.

KIM, S. Competitive Biological Activities of Chitosan and Its Derivatives: Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer, and Anti-Inflammatory Activities. **International Journal of Polymer Science**, v. 2018, p. 1-13, 2018.

LI, X.; TUSHIMA, Y.; MORIMOTO, M.; SAIMOTO, H.; OKAMOTO, Y.; MINAMI, S.; SHIGEMASA, Y. Biological Activity of Chitosan-Sugar Hybrids: Specific Interaction with Lectin. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 11, n. 4, p. 176-179, 2000.

LIU, W.; QIN, Y.; LIU, S.; XING, R.; YU, H.; CHEN, X.; LI, K.; LI, P. Synthesis of C-coordinated O-carboxymethyl chitosan metal complexes and evaluation of their antifungal activity. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-10, 2018.

Capítulo 9

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA

LOGITHKUMAR, R. KESHAVNARAYAN, A.; DHIVYA, S.; CHAWLA, A.; SARAVANAN, S. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 172-188, 2016.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, v. 67, n. 11, p. 938-942, 1990.

MATICA, A.; MENGHIU, G.; OSTAFE, V. Antibacterial Properties of Chitin and Chitosans. **New Frontiers in Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 39-54, 2017.

MOEINI, A.; PEDRAM, P.; MAKVANDI, P.; MALINCONICO, M.; D'AYALA, G. G. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 233, n. 1, p. 1-16, 2020.

MONTER-MIRANDA, J. G.; TIRADO-GALLEGOS, J. M.; ZAMUDIO-FLORES, P. B.; RIOS-VELASCO, C.; ORNELAS-PAZ, J de J.; SALGADO- DELGADO, R.; ESPINOSA- SOLIS, V.; HERNÁNDEZ-CENTENO, F. Extracción y caracterización de propiedades fisicoquímicas, morfológicas y estructurales de quitina y quitosano de *Brachystola magna* (Girard). **Revista Mexicana de Ingeniera Quimica**, v. 15, n. 3, p. 749-761, 2016.

MORATTI, S. C.; CABRAL, J. D. Antibacterial properties of chitosan. In: JENNINGS, J. A.; BUMGARDNER, J. D. (Ed.). **Chitosan Based Biomaterials Volume 1: Fundamentals**. Duxford (UK): Woodhead Publishing, 2017. p. 31-44. v. 1.

MORGANTI, P.; COLTELLI, M-B. A new carrier for advanced cosmeceuticals. **Cosmetics**, v. 6, n. 10, p. 1-18, 2019.

MUJTABA, M.; KHAWAR, K. M.; CAMARA, M. C.; CARVALHO, L. B.; FRACETO, L. F.; MORSI, R. E.; ELSABEE, M. Z.; KAYA, M.; LABIDI, J.; ULLAH, H.; WANG, D. Chitosan-based delivery systems for plants: A brief overview of recent advances and future directions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 683-697, 2020.

NO, H. K.; PARK, N. Y.; LEE, S. H.; WHANG, H. J.; MEYERS, S. P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights on Spoilage Bacteria Isolated from Tofu. **International Journal of Food Microbiology and Safety**, v. 67, n. 4, p. 1511-1514, 2002.

NUNES, E. C. D.; LOPES, F. R. S. **Polímeros: conceitos, estrutura molecular, classificação e propriedades**. São Paulo: Érica, 2014.

PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL, W.; GOYCOOLEA, F. M. Chitin and chitosan: Major sources, properties and applications. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Ed.). **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. Amsterdam: Elsevier Science, 2008. p. 517-542. v. 1.

- PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.
- POLYUDOVA, T. V.; SHAGDAROVA, B. Ts.; KOROBV, V. P.; VARLAMOV, V. P. Bacterial Adhesion and Biofilm Formation in the Presence of Chitosan and Its Derivatives. **Microbiology (Russian Federation)**, v. 88, n. 2, p. 125-131, 2019.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.
- SENEL, S.; MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 10, p. 1467-1480, 2004.
- SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 263, p. 131-194, 2019.
- SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros**, v. 8, n. 4, p. 63-68, 1998.
- SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R. dos.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.
- TIN, S.; LIM, C. S.; SAKHARKAR, M. K.; SAKHARKAR, K. R. Synergistic combinations of chitosans and antibiotics in *Staphylococcus aureus*. **Letters in Drug Design and Discovery**, v. 7, n. 1, p. 31-35, 2010.
- VARLAMOV, V. P.; MYSYAKINA, I. S. Chitosan in Biology, Microbiology, Medicine, and Agriculture. **Microbiology (Russian Federation)**, v. 87, n. 5, p. 712-715, 2018.
- VASYUKOVA, N. I.; OZERETSKOVSKAYA, O.L.; CHALENKO, G.I.; GERASIMOVA, N. G.; L'VOVA, A. A.; IL'INA, A. V.; LEVOV, A. N.; VARLAMOV, V. P.; TARCHEVSKY, I. A. Immunomodulating activity of chitosan derivatives with salicylic acid and its fragments. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 346-351, 2010.
- WU, D.; XU, X. Exploring cutting-edge hydrogel technologies and their biomedical applications. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 4, p. 446-447, 2018.
- XING, K.; ZHU, X.; PENG, X.; QIN, S. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 2, p. 569-588, 2015.
- ZARAYNEH, S.; SEPAHI, A. A.; JONOBI, M.; RASOULI, H. Comparative antibacterial effects of cellulose nanofiber, chitosan nanofiber, chitosan/cellulose combination and chitosan alone against bacterial contamination of Iranian banknotes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1045-1054, 2018.
- ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, n. 3, p. 204-226, 2015.

Capítulo 10

NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS) E BIOINFORMÁTICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDAS PRESENTES NO PROBIÓTICO DE KOMBUCHA

KARINA FREIRE D'EÇA NOGUEIRA SANTOS
ALLINY DAS GRAÇAS AMARAL
CLAUDIA CRISTINA GARCIA MARTIN-DIDONET

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sequenciamento de primeira geração e Sequenciamento de nova geração – *Next generation sequencing* (NGS)

Os métodos pioneiros de sequenciamento de DNA, como os métodos de Sanger e Coulson (1975) e de Maxam e Gilbert (1977), impulsionaram um rápido avanço nas técnicas de detecção das sequências nucleotídicas. Essas primeiras técnicas foram denominadas de sequenciamento de primeira geração.

De maneira geral, para o sequenciamento de Sanger, é necessário clonar o fragmento de interesse em um vetor *in vivo* e realizar o método de terminação da cadeia para determinar a sequência de DNA. Esse método consiste em utilizar os quatro desoxinucleotídeos trifosfato marcados com fluorescência (denominados de ddNTPs). Os ddNTPs não têm o grupo 3'OH, o que impede o alongamento da cadeia. Desse modo, o fragmento de DNA é decodificado através da incorporação de ddNTPs marcados em posições aleatórias, esse método gera diferentes fragmentos que podem ser

separados e identificados em géis por eletroforese (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Já o sequenciamento de Maxam e Gilbert utiliza a marcação do DNA alvo com fósforo radioativo (P^{32}) que se liga a extremidade do DNA após a separação da dupla fita. O DNA marcado é colocado em quatro tubos contendo compostos químicos diferentes que irá clivar o DNA gerando fragmentos de tamanhos diferentes de acordo com a composição nucleotídica da sequência. Depois, esses fragmentos são separados em géis e identificados por eletroforese (MAXAM; GILBERT, 1977).

Com o surgimento da reação em cadeia da polimerase ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR), a clonagem do fragmento de DNA de interesse passou a ser *in vitro* e a etapa de amplificação, realizada por PCR (SAIKI *et al.*, 1988). Uma das principais limitações dessas técnicas de primeira geração é o baixo rendimento (uma reação por sequenciamento) e o alto custo (MOREY *et al.*, 2013).

Com o desenvolvimento do NGS, em 2004, o processo passou a ser automatizado e de alta produtividade (*high throughput*), sendo capaz de amplificar e ler várias reações ao mesmo tempo a um baixo custo (MOREY *et al.*, 2013). Isso viabilizou o sequenciamento de genomas completo. Os primeiros NGS são chamados de segunda geração e o sequenciamento utiliza um novo método de síntese luminescente mediado por enzimas, diferente dos ddNTPs ou P^{32} utilizados na primeira geração (HEATHER; CHAIN, 2016). Além disso, utilizam a técnica de *shotgunm*, que pode fragmentar aleatoriamente longas sequências de DNA, a partir de métodos químicos ou físicos, produzindo sequências curtas.

Essas sequências curtas são ligadas a adaptadores universais em suas extremidades. Os fragmentos de DNA (ou sequencias) associados aos adaptadores são denominados de bibliotecas (MOREY *et al.*, 2013). Um exemplo de plataforma de sequenciamento de segunda geração é o Illumina MiSeq, que é comumente

utilizado para o sequenciamento do gene 16S rRNA para estudos taxonômicos de comunidades microbianas (EARL *et al.*, 2018).

Outra estratégia utilizada pela NGS para sequenciar várias amostras (*multiplex*) por corrida é o uso de *barcode*. O *barcode* é uma sequência específica de DNA utilizada para marcar um fragmento, como uma etiqueta de identificação. O *barcode* se liga a um dos adaptadores da biblioteca de DNA. Após a preparação das bibliotecas, com o *barcode* ou apenas com os adaptadores, o sequenciamento pode ocorrer em uma única direção (*single tag sequencing*) ou em ambas as direções (*pair-end sequencing*) (MOREY *et al.*, 2013).

Para regiões do DNA com sequências repetitivas ou regiões mais longínquas do genoma, é indicado o sequenciamento da biblioteca do tipo *mate-pair*, que pode utilizar adaptadores internos ou um suporte, como uma placa de vidro (em inglês, chamada de *flowcell*) ao qual o DNA será ligado, de acordo com a plataforma de sequenciamento escolhida (FELDMAN *et al.*, 2010).

O NGS de terceira geração também utiliza a estratégia de *shot-gun*, porém, o grande avanço nessa geração é a habilidade de sequenciar moléculas únicas de DNA e sem a necessidade da etapa de amplificação da sequência, evitando a introdução de artefatos e, conseqüentemente, diminuindo a manipulação na amostra (HEATHER; CHAIN, 2016; PETTERSSON; LUNDEBERG, 2009).

Diferentes plataformas utilizam o NGS de terceira geração, como a *Pacific Biosciences* (PacBio), com a tecnologia de sequenciamento em tempo real de uma única molécula ou do inglês *single-molecule real-time sequencing chip* (SMRT *sequencing*). Nessa técnica, uma molécula de DNA polimerase é fixada no fundo de uma câmara de visualização nanofotônica (chip) que contém milhares de *zero-mode waveguides* (ZMW). Em cada chip de ZMW, há aproximadamente 75 mil ZMWs que se ligarão a 75 mil diferentes sequências de DNA, ou seja, em um único chip, correm, em

paralelo, 75 mil reações de sequenciamento. Várias sequências são lidas em minutos ou horas, ao invés de dias (EID *et al.*, 2009).

1.2 Ferramenta BLAST para determinação de espécies bacterianas

A bioinformática é uma área interdisciplinar que envolve a aplicação de ferramentas computacionais na resolução de problemas da área da biologia molecular.

Um exemplo de aplicação da bioinformática em dados de biologia molecular é a classificação taxonômica das espécies a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA ribossomal, que é um gene conservado entre as espécies de bactérias. Essa técnica tem sido utilizada há anos para identificar bactérias, sendo encontrados diversos trabalhos na literatura (EARL *et al.*, 2018; LANE *et al.*, 1985; ROOS; VUYST, 2018; WEISBURG *et al.*, 1991).

O site NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) é de livre acesso e bastante utilizado para a classificação taxonômica a partir de dados de sequenciamento. Nesse site, existe um amplo banco de dados, denominado GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), o qual é utilizado para realizar a identificação de espécies através de um programa chamado Blast – *Basic Local Alignment Search Tool* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

O princípio básico desse programa é comparar as sequências de interesse contra as sequências contidas no GenBank. Após a comparação, é gerado um quadro com a porcentagem de similaridade entre as sequências. Para a classificação de espécies bacterianas, são considerados, geralmente, valores de similaridade acima de 97,9% (KÄMPFER; FALSEN; BUSSE, 2008; SINGH *et al.*, 2015).

A ferramenta BLAST utiliza um algoritmo básico, simples e robusto, por isso, se tornou bastante popular, podendo ser utilizada a partir de sequências nucleotídicas (DNA ou RNA), ou a partir de

sequências de aminoácidos (ALTSCHUL *et al.*, 1990; ALTSCHUL *et al.*, 1997). Assim, além da identificação das espécies, o BLAST pode ter várias aplicações como: realizar a anotação gênica para entender as funções biológicas das sequências nucleotídicas, identificar as regiões promotoras, as sequências repetitivas, os RNAs estáveis e os RNAs não codificantes (tRNA, rRNA, snRNA), como exemplo.

Com essa tecnologia de fácil acesso para identificação de nucleotídeos, novos produtos, como o probiótico de Kombucha, poderão ser estudados, com a possibilidade de identificar o grupo de bactérias ácidas que compõem essa bebida utilizada pela população. Desse modo, há um rol de grandes possibilidades do desenvolvimento tecnológico de produtos derivados de Kombucha com indicações mais assertivas e precisas.

1.3 Probiótico de Kombucha

O Kombucha é uma bebida fermentada, devido à adição de açúcar e um chá de ervas desidratadas como o chá verde. O Kombucha é formado pelo consórcio de bactérias e leveduras. Esse consórcio forma um biofilme celulolítico, denominado de SCOBY (*Symbiotic Community of Bacteria and Yeast*) que transforma o açúcar e os componentes do chá em compostos bioativos com efeito terapêutico (KAPP; SUMNER, 2019; ROOS; VUYST, 2018).

O chá é preparado por infusão em água quente, sendo os mais utilizados o chá preto ou o verde. No entanto, tem sido reportado o preparo do Kombucha a partir de diferentes plantas medicinais. Após esfriar o chá, essa solução é transferida para recipientes de vidro contendo o SCOBY. A fermentação ocorre na presença de uma fonte de carbono (geralmente sacarose) e nitrogênio (de acordo com as diferentes composições do chá). O Kombucha deve ser protegido da luz direta e crescido em temperatura ambiente sob condição estática (VITAS *et al.*, 2018).

Após a fermentação, estão presentes no Kombucha: aminoácidos, vitaminas solúveis em água como vitamina C e várias vitaminas do complexo B, polifenóis oriundos do chá, ácidos orgânicos, açúcar, fibra, etanol, elementos essenciais como Cu, Fe, Mn, Ni e Zn, dióxido de carbono, substâncias de ação antibiótica e enzimas hidrolíticas (JAYABALAN *et al.*, 2014). O uso do Kombucha pode ser tópico ou oral e, além disso, a ingestão do Kombucha ajuda a repor a flora microbiana, que pode competir com possíveis bactérias patogênicas e contribuir para a saúde humana.

Entre os efeitos benéficos à saúde humana pela administração do Kombucha, incluem-se: ação anti-inflamatória e atividade antioxidante (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018), redução dos níveis de colesterol, da pressão sanguínea, na propagação do câncer, além do melhoramento do funcionamento do fígado, sistema imunológico e funções gastrointestinais (LEAL *et al.*, 2018). Por outro lado, alguns autores alertam ao risco do consumo indiscriminado do Kombucha (ERNST, 2003; GREENWALT; STEINKRAUS; LEDFORD, 2000).

Na composição microbiológica presente no biofilme SCOBY podem-se encontrar os principais gêneros de leveduras, como: *Candida*, *Lachancea*, *Ermothecium*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Dekkera*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

A principal classe de bactérias presentes no Kombucha são as ácidas acéticas (BAA), sendo os principais gêneros: *Acetobacter* (*Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter nitrogenifigens*), *Gluconacetobacter* (*Gluconacetobacter* sp A4, *Gluconacetobacter sacchari*, *Gluconacetobacter oxydans*) e *Komagataeibacter* (*Komagataeibacter xylinus*, *Komagataeibacter kombuchae*) (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018). Dentre as BAA já observadas em Kombucha, há um predomínio dos gêneros *Acetobacter* e *Gluconacetobacter* (GOMES *et al.*, 2018). As BAA são aeróbicas, capazes de crescer em pH baixo

e oxidar etanol para formar ácido acético (LEY *et al.*, 1984; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Outra propriedade das BAA é a capacidade de sintetizar polímeros extracelulares, como a celulose bacteriana, produzida principalmente pelos gêneros *Gluconacetobacter* e *Komagataeibacter*. A celulose é altamente versátil e possui características como: alta capacidade de retenção de água, capacidade em formar uma estrutura de rede ultrafina, biocompatibilidade e alta cristalinidade. Essas características têm diversas aplicações comerciais, podendo ser utilizadas na produção de curativos, na preparação de comprimidos e como suplemento alimentar (CACICEDO *et al.*, 2016).

As bactérias ácido lácticas (BAL) também estão presente e geralmente pertencem ao gênero *Lactobacillus sp* e incluem as espécies *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus nagelli* e *Lactobacillus satsumensis*. Outro gênero de BAL também comumente encontrado é a *Lactococcus sp* (MARSH *et al.*, 2014). Algumas espécies do gênero *Propionibacterium* e *Enterococcus* são menos frequentes, mas também já foram isoladas em Kombucha (MARSH *et al.*, 2014).

A biodiversidade microbiana presente no Kombucha irá variar de acordo com as condições de crescimento, ou seja, composição do chá e temperatura de armazenamento, que poderão favorecer o crescimento de determinada espécie de bactéria e levedura. Por exemplo, altas temperaturas favorecem o crescimento dos gêneros *Propionibacterium*, *Lactobacillus* e *Lactococcus* (FILIPPIS *et al.*, 2018).

Nesse sentido investigativo, o NGS tem auxiliado bastante o avanço do conhecimento a respeito da microbiota presente no Kombucha. Essa técnica possibilita identificar os microrganismos presentes no Kombucha, com maior precisão, alta eficiência e rendimento (MARSH *et al.*, 2014).

Assim, o objetivo deste trabalho é apresentar métodos básicos de isolamento de bactérias ácidas em Kombucha, extração de DNA, reação de PCR para o gene 16S rRNA e reação de sequenciamento.

Também serão delineadas as etapas necessárias para realizar a análise das sequências através das ferramentas de bioinformática (BLAST local e *GenBank*) disponíveis na plataforma NCBI.

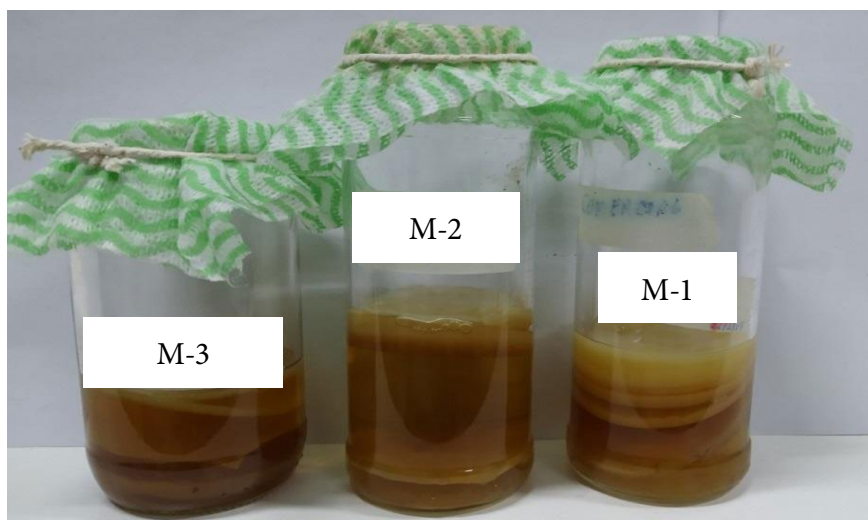
2 ETAPAS PARA A INVESTIGAÇÃO DA MICROBIOTA DE KOMBUCHA

2.1 Preparo do chá para Kombucha

Para o preparo do chá para Kombucha, é necessário ferver 1 litro de água por 15 minutos, a 121 °C e, por infusão, aguardar em torno de 15 minutos. Após isso, deve-se adicionar 5 g/L de chá preto. Em seguida, deve-se coar as folhas do chá, adicionar 50 g/L de sacarose e agitar a solução até dissolver todo o soluto. É preciso esperar a solução esfriar em temperatura ambiente e adicionar o SCOBY, também denominada matriz de Kombucha. Também se deve incubar por 7 dias para a fermentação do chá à temperatura ambiente (em torno de 30 °C), sob condição estática, em frascos de vidro de boca larga, cobertos com gaze fixada com um barbante, para evitar a entrada de insetos (Figura 1). Para a manutenção da Kombucha, a cada 7 dias, a solução de chá é trocada por uma nova, contendo cerca de 1/5 do volume de chá já fermentado.

As matrizes de Kombucha podem ser obtidas comercialmente, como as matrizes denominadas neste trabalho de M1, M2 e M3 (Figura 1). O SCOBY pode ser adquirido em sites como: <https://daynaturallab.lojavirtualnuvem.com.br/> ou <https://fermentaholics.com/>.

Figura 1 – Frascos de Kombucha fermentados por 7 dias, contendo chá preto e 3 diferentes matrizes de Kombucha (SCOBY) comerciais denominados nesse trabalho de M1, M2 e M3



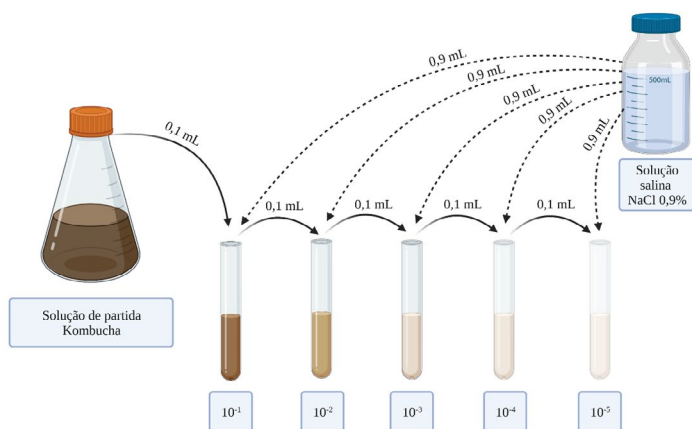
Fonte: Acervo dos autores (2019).

2.2 Isolamento das bactérias ácidas acéticas (BAA) presentes no Kombucha

O Kombucha é composto principalmente por BAA, assim, para o isolamento dessa classe de bactérias, é preciso utilizar 1 mL do líquido fermentado por no mínimo 7 dias. A partir deste 1 mL (solução de partida), é realizada a diluição sequencial, que essa consiste em adicionar 0,9 mL de solução salina (NaCl 0,9%) em diferentes microtubos (enumerados de 1 a 5) (Figura 2) Em seguida, é adicionado 0,1 mL da solução de partida ao microtubo 1 (referente à diluição 10^{-1} , o que significa que a solução de partida foi diluída 10x). Esse microtubo 1 é agitado e é coletado 0,1 mL da solução 10^{-1} para ser adicionada ao microtubo 2 (diluição 10^{-2} ou 100x diluída) e, assim, sucessivamente, até chegar à última diluição no microtubo 5 (10^{-5} ou solução de partida 100.000x diluída), como exemplificado na Figura 2.

As diluições sequenciais podem ser feitas de acordo com a concentração de microrganismos presentes em uma amostra, sendo, às vezes, necessários realizar mais diluições como até 10^{-6} , 10^{-7} e outras.

Figura 2 – Técnica de diluição sequencial do líquido de Kombucha fermentado por 7 dias



Fonte: Próprios autores (2021). Criado com BioRender.com.

Após realizar a diluição sequencial do líquido fermentado do Kombucha, a última diluição (a menos concentrada) é utilizada para o isolamento das colônias nos meios sólidos.

Os meios semisseletivos são utilizados para uma triagem inicial de bactérias de interesse. Como as BAA são dominantes no Kombucha, utilizar meios seletivos para essa classe de bactérias é uma estratégia plausível. Por isso, um dos métodos utilizados para o estudo de microrganismos presentes no Kombucha é o isolamento em meios semisseletivos para BAA (Tabela 1).

A escolha do meio semisseletivo pode indicar algumas características exclusivas de alguns gêneros, como, por exemplo, utilizar o meio DSM (Tabela 1) para distinguir o gênero *Acetobacter* (oxida lactato a CO_2 e H_2O) do gênero *Gluconobacter* (incapaz de oxidar

lactato). O meio DSM contém lactato de cálcio e o indicador de pH bromocresol roxo. Quando a *Acetobacter* cresce, o meio muda da cor amarela (pH ácido) para roxa (pH básico) devido à oxidação do lactato. A *Gluconobacter* é incapaz de utilizar lactato, logo, o meio permanece amarelo (pH ácido) (CIRIGLIANO, 1982).

Os métodos tradicionais de classificação dos gêneros BAA são baseados na morfologia da célula, no flagelo e em algumas propriedades fisiológicas e bioquímicas. Porém, esses métodos não são suficientes para a determinação taxonômica exata, sendo necessário o sequenciamento do gene 16S rRNA (GOMES *et al.*, 2018).

Tabela 1 – Meios semisseletivos utilizados para a seleção de bactérias ácido acéticas (BAA)

Meio	Composição (g/Lou *mL/L)	Referência
AE	Glicose 5, extrato de levedura 3, peptona 4, ácido acético 30*, etanol 30* e ágar 9	(GULLO <i>et al.</i> , 2006)
BME	Extrato de levedura 0,5, casaminoácidos livres de vitaminas 3, etanol 3* e ágar 15	(CLEENWERCK <i>et al.</i> , 2007)
Carr	Extrato de levedura 30, etanol 20*, verde de bromocresol 0,022 e ágar 20	(CARR, 1968)
Meio teste de calcário-etanol	Glicose 0,5, extrato de levedura 5, peptona 3, carbonato de cálcio 15, etanol 15* e ágar 12	(SIEVERS; SWINGS, 2005)
DSM	Glicose 1, sorbitol 1, manitol 2, extrato de levedura 3,3, proteose-peptona 10, lactato de cálcio 15, KH_2PO_4 1, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,02, cicloheximida 0,004, bromocresol roxo 0,03, verde brilhante 0,0295 e ágar 15	(CIRIGLIANO, 1982)
GY	Glicose 50, extrato de levedura 10 e ágar 15	(CLEENWERCK <i>et al.</i> , 2009)

Meio	Composição (g/L ou *mL/L)	Referência
GYAE	Glicose 50, extrato de levedura 10, ácido acético 10*, etanol 20*e ágar 15	(CLEENWERCK <i>et al.</i> , 2009)
GYC	Glicose 100, extrato de levedura 10, carbonato de cálcio 20 e ágar 15	(GULLO <i>et al.</i> , 2006)
GYEC	Glicose 10, extrato de levedura 10, carbonato de cálcio 20, etanol 30*e ágar 10	(WU <i>et al.</i> , 2012)
GYP	Glicose 30, extrato de levedura 5, peptona 2 e ágar 15	(ENTANI <i>et al.</i> , 1985)
HS	Glicose 20, extrato de levedura 5, peptona 5, Na ₂ HPO ₄ 2,7 e ácido cítrico 1,15	(HESTRIN; SCHRAMM, 1954)
MYA	Extrato de malte 15, extrato de levedura 5, etanol 60*e ágar 15	(HESTRIN; SCHRAMM, 1954)
MYP	Manitol 25, extrato de levedura 5, peptona 3 e ágar 12	(GULLO; GIUDICI, 2008)
RAE	Glicose 40, extrato de levedura 10, peptona 10, Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 3,38, ácido cítrico 1,5, ácido acético 10*, etanol 20*e ágar 10	(SIEVERS; SWINGS, 2005)
SYP	Sorbitol 50, extrato de levedura 5, peptona 3 e ágar 12	(SIEVERS; SWINGS, 2005)
YG	Glicose 20, extrato de levedura 5, (NH ₄) ₂ HPO ₄ 0,26 e MgSO ₄ 7H ₂ O 0,05	(OHMORI <i>et al.</i> , 1980)
YGM	Glicose 20, manitol 20, extrato de levedura 10, ácido acético 5* e etanol 20*	(OHMORI <i>et al.</i> , 1980)
YPE	Extrato de levedura 10, peptona 5, etanol 20* e ágar 15	(FUGELSANG; EDWARDS, 2007)

Fonte: Adaptado de Gomes *et al.* (2018).

2.3 Extração do DNA bacteriano e reação de PCR

Após o isolamento das BAA, como descrito no item 2.2, as bactérias isoladas são crescidas em meio líquido (sem ágar) por um período entre 24-48 horas a 30 °C. A Tabela 1 resume os principais meios utilizados para seleção e crescimento dos isolados.

Após o período de incubação, 3 mL da cultura crescida é centrifugada e as células são lisadas com a adição de 600 µL de solução de lise estéril (50 mM de tris pH 7,5, 25 mM de EDTA, 400 mM de NaCl e 1% de SDS), incubadas por 10 minutos a 80 °C e, após esfriar, são tratadas com RNase (25 µg/mL) por 1 hora, a 37 °C. Em seguida, são adicionados 200 µL de NaCl 5M e incubadas no gelo por 5 minutos. As amostras são centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante é transferido para microtubo limpo e estéril contendo 600 µL isopropanol P.A. gelados e mantidos no gelo por 10 minutos. Os microtubos são centrifugados e o sobrenadante é descartado.

Para a segunda etapa de precipitação, são adicionados 600 µL de etanol 70% gelado, as amostras são centrifugadas e o sobrenadante é descartado. O *pellet* de DNA passa por um período de secagem à temperatura ambiente (*overnight*). No dia seguinte, o *pellet* é ressuspenso em água T₁₀E₁ (Tris HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8) ou em água ultrapura, ambas estéreis. Em seguida, o DNA purificado é quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000/2000c (Thermo Scientific). As razões de absorbância consideradas são de A₂₆₀/A₂₈₀ e A₂₆₀/A₂₃₀ com valores superiores a 1,8. Razões inferiores a esse valor podem indicar contaminações por proteínas (A₂₆₀/A₂₈₀), por carboidratos e compostos polifenólicos (A₂₆₀/A₂₃₀). A concentração do DNA é ajustada (Tabela 2) para a reação de PCR. O material utilizado, como microtubos e ponteiras, na etapa de extração do DNA, deverá ser autoclavado por 20 minutos a 121 °C e a 1 atm.

Para a reação de PCR, são utilizados os iniciadores ou primers. Neste trabalho, serão considerados os primers universais para o

domínio Bactéria: iniciador 5' ou *forward* 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') e o iniciador 3' ou *Reverse* 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991; TURNER *et al.*, 1999) que amplificam para o gene 16S rRNA. As concentrações utilizadas para a reação de PCR estão descritas na Tabela 2 e o programa de ciclos utilizado no termociclador está descrito na Tabela 3.

Os fragmentos obtidos após a amplificação do gene 16S rRNA são analisados em eletroforese com gel de agarose (1,7%) a 70 volts por 150 minutos, utilizando tampão TBE 0,5X (44,5 mM de tris base, 44,5 mM de ácido bórico, 25,5 mM de EDTA pH 8) (Figura 3).

O perfil de banda é comparado ao marcador de peso molecular (BioLab 1Kb-DNA-Ladder), de acordo com o tamanho esperado para o produto de amplificação. Os géis são corados segundo Sambrook e colaboradores (1989), com brometo de etídio (1 mg/mL) e depois observados em transiluminador UVP modelo MultiDoc-It Digital Imaging System® e fotografados com câmera digital (Figura 3).

A qualidade do sequenciamento é diretamente proporcional à qualidade do produto de PCR. Para isso, é importante que o DNA amplificado esteja livre de contaminantes, como primers residuais e nucleotídeos não incorporados. Assim, existem alguns protocolos de purificação do produto de PCR, para uma reação com volume total de 20 µL, como este:

1. Adicionar 2 µL de acetato de amônio 7,5M;
2. Adicionar 60 µL de etanol P.A gelado;
3. Homogeneizar e deixar 10 minutos no gelo;
4. Centrifugar a 4 °C por 15 minutos a 13.000 rpm;
5. Descartar o sobrenadante;
6. Adicionar 500 µL de etanol 70%;

7. Centrifugar (mesmas condições acima) por 20 minutos;
8. Descartar o sobrenadante;
9. Secar o DNA *overnight* na bancada em temperatura ambiente ou colocar os microtubos para secar no fluxo laminar entre 20-30 minutos, ou tempo suficiente para eliminar resíduos líquidos.

O etanol P.A associado a uma solução com alta concentração de um sal catiônico, como o acetato de amônio, auxilia a precipitação do DNA. O etanol induz à transição estrutural nas moléculas ácidas, fazendo-as agregarem e consequentemente precipitarem, assim ocorre com o DNA.

Após a purificação da reação de PCR, é aconselhado quantificar o DNA novamente por espectrofotometria, considerando os mesmos parâmetros das razões de absorbância citados acima, antes de realizar a reação de sequenciamento (Figura 3).

Tabela 2 – Reagentes utilizados para a montagem da reação de PCR para amplificação do gene conservado 16S rRNA

Reação de PCR	Volume pipetado
Tampão 10x com $MgCl_2$ *	2,0 μL
dNTP 10 mM*	0,4 μL
Primer 27F 10 mM	0,4 μL
Primer 1479R 10 mM	0,4 μL
Taq DNA polimerase 5 u/ μL *	0,2 μL
DNA 50-100 ng/ μL	2,0 μL
H ₂ O ultrapura estéril	14,6 μL
Volume total da reação	20 μL

* Os reagentes são da marca GeneDireX®

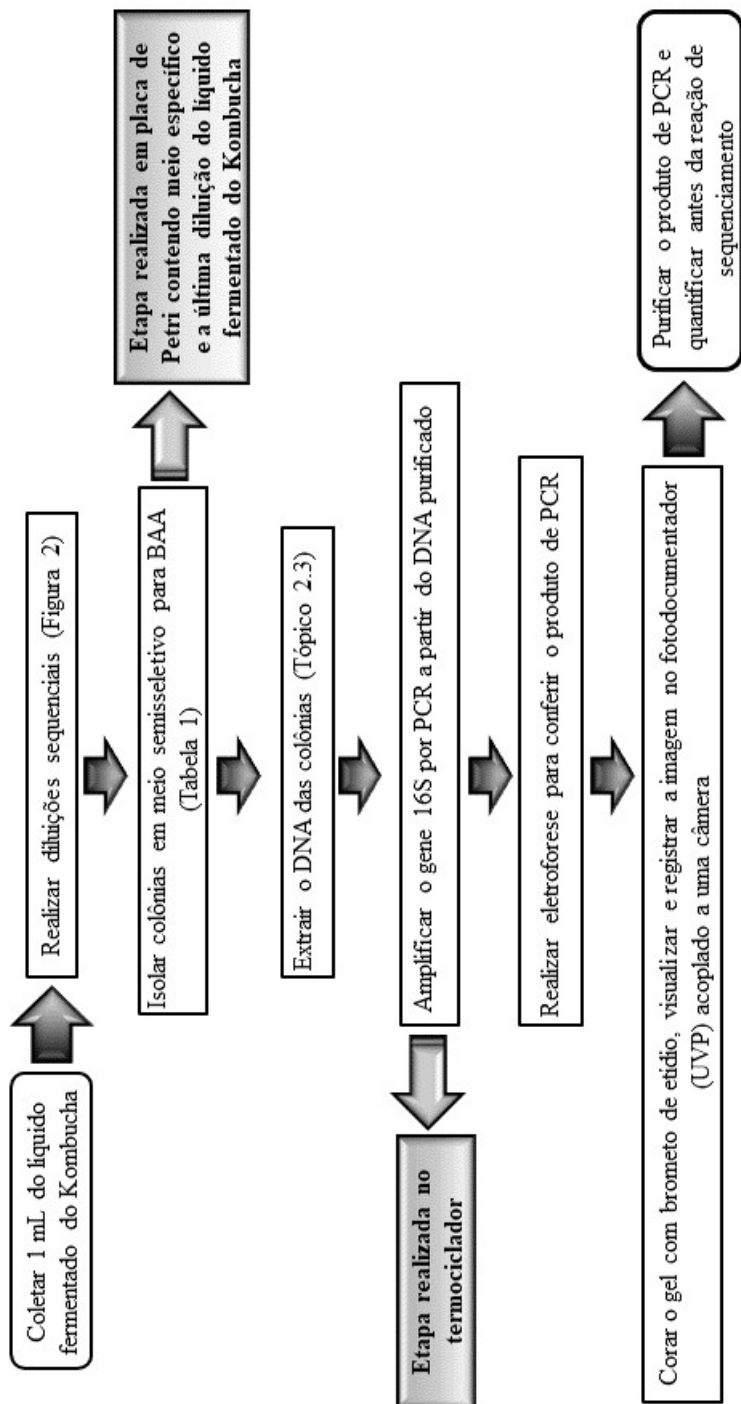
Fonte: Acervo dos autores (2020).

Tabela 3 – Programa de ciclos do termociclador para amplificar o gene 16S rRNA utilizando os primers 27F e 1492R

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
93 °C	2 minutos	1
93 °C	45 segundos	30
62 °C	30 segundos	30
72 °C	2 minutos	30
72 °C	5 minutos	1
4 °C	60 minutos	1

Fonte: Acervo dos autores (2020).

Figura 3 – Estratégia de isolamento de bactérias ácido acéticas (BAA) a partir do líquido fermentado do Kombucha por 7 dias, etapa de extração do DNA, amplificação do gene 16S rRNA, eletroforese e documentação do gel.



Fonte: Próprios autores (2021).

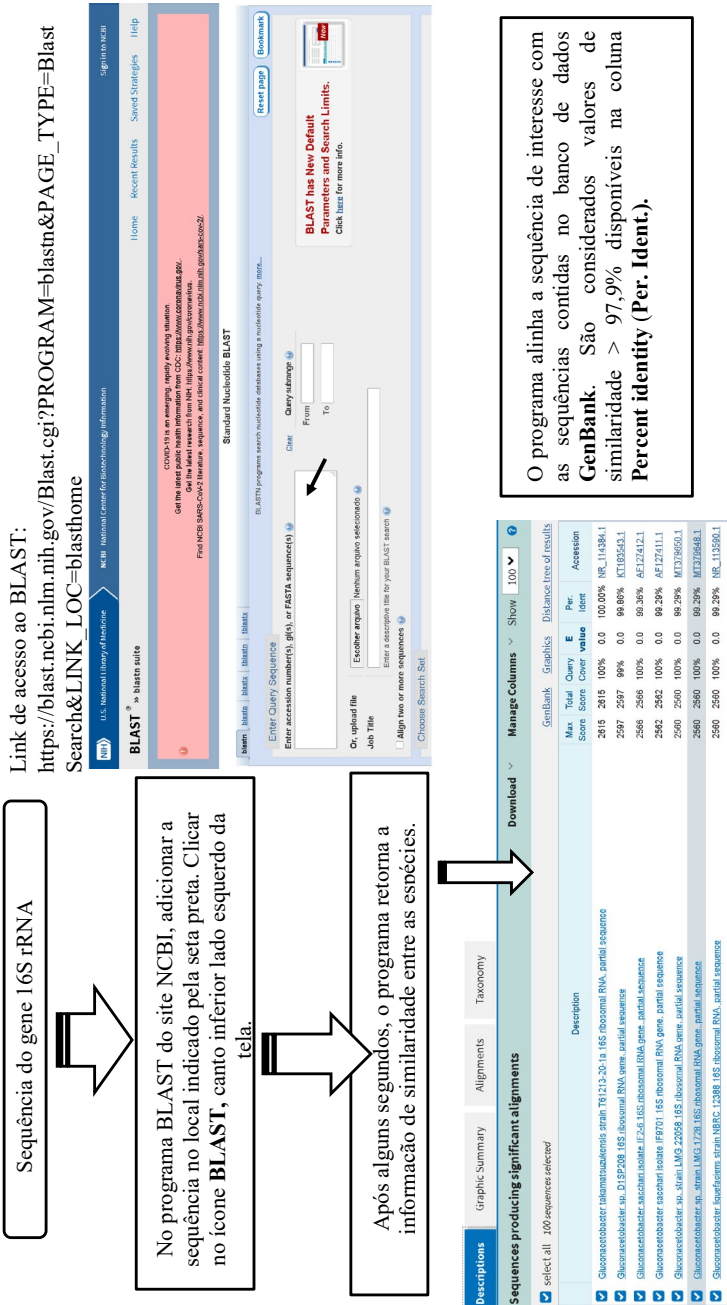
2.4 Sequenciamento por NGS de amostras de Kombucha

As reações de sequenciamento devem ser conduzidas de acordo com as instruções do fabricante. No mercado, existem diferentes marcas como o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix da Applied Biosystems™, o Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit da Perkin–Elmer, entre outros. De maneira geral, em uma reação de sequenciamento, são utilizados: tampão, primer, DNA alvo amplificado pela reação de PCR, corante fluorescente e água ultrapura para completar o volume final da reação, geralmente com volume final de 10 µL. Em seguida, a reação de sequenciamento é colocada em um sequenciador NGS, como, por exemplo, o MiSeq (Illumina, EUA) (Figura 4), executando, assim, a etapa de sequenciamento em questão.

Após o sequenciamento, para a identificação dos isolados, as sequências obtidas podem ser comparadas (alinhadas) quanto à similaridade com as sequências de nucleotídeos disponíveis na plataforma NCBI no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) através da ferramenta de bioinformática BLAST também disponível na plataforma NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Figura 4).

Por meio dessa ferramenta de bioinformática, há a complementação prática do trabalho experimental realizado em bancada com a possibilidade de explorar um grande rol da diversidade de microrganismos presentes no Kombucha. Sabe-se que o SCOBY pode ter diversas origens, propiciando uma grande diversidade de bactérias e leveduras. Essa característica pode permitir a produção de uma bebida com maior exatidão de sua microbiota e possíveis utilizações para a saúde humana e animal com o auxílio das técnicas da biologia molecular associadas à bioinformática.

Figura 4 – Etapas para identificação da espécie a partir das sequências de DNA obtidas através do sequenciamento do gene 16S rRNA



Fonte: Próprios autores (2021). Criado a partir do *print screen* do site NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- CACICEDO, M. L.; CASTRO, M. C.; SERVETAS, I.; BOSNEA, L.; BOURA, K.; TSAFRAKIDOU, P.; DIMA, A.; TERPOU, A.; KOUTINAS, A.; CASTRO, G. R. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 172-180, 2016.
- CARR, J. G. Methods for identification acetic acid bacteria. In: GIBBS, B.; SHAPTON, D. (Eds.). **Identification Methods for Microbiologists**. London: Academic Press, 1968. p. 1-8.
- CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; GACHHUI, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 63-72, 2016.
- CIRIGLIANO, M. A selective medium for the isolation and differentiation of *Gluconobacter* and *Acetobacter*. **Journal Food Science**, v. 47, p. 1038-1039, 1982.
- CLEENWERCK, I.; CAMU, N.; ENGELBEEN, K.; WINTER, T.; VANDEMEULEBROECKE, K.; VOS, P.; VUYST, L. *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of ghanaian cocoa beans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1647-1652, 2007.
- CLEENWERCK, I.; WACHTER, M.; GONZÁLEZ, A.; VUYST, L.; VOS, P. Differentiation of species of the family Acetobacteraceae by AFLP DNA fingerprinting: *Gluconacetobacter kombuchae* is a later heterotypic synonym of *Gluconacetobacter hansenii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 7, p. 1771-1786, 2009.
- DAY NATURAL LAB, 2020. Disponível em: <https://daynaturallab.lojavirtualnuvem.com.br/>. Acesso em: 1 out. 2020.
- EARL, J. P.; KROL, J.; BHAT, S. A.; BALASHOV, S.; EHRLICH, R.L.; SEN, B.; HAMMOND, J.; EHRLICH, G. D.; MELL, J. C. Species-level bacterial community profiling of the healthy sinonasal microbiome using Pacific Biosciences sequencing of full-length 16S rRNA genes. **Biological Sciences** 0604 Genetics 06 Biological Sciences 0605 Microbiology. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1-26, 2018.

EID, J.; FEHR, A.; GRAY, J.; LUONG, K.; LYLE, J.; OTTO, G.; PELUSO, P.; RANK D.; BAYBAYAN, P.; BETTMAN, B.; BIBILLO, A.; BJORNSEN, K.; CHAUDHURI, B.; CHRISTIANS, F.; CICERO, R.; CLARK, S.; DALAL, R.; DEWINTER, A.; DIXON, J.; FOQUET, M.; GAERTNER, A.; HARDENBOL, P.; HEINER, C.; HESTER, K.; HOLDEN, D.; KEARNS, G.; KONG, X.; KUSE, R.; LACROIX, Y.; LIN, S.; LUNDQUIST, P.; CONGCONG, M.A.; MARKS, P.; MAXHAM, M.; MURPHY, D.; PARK, I.; THANG, P. PHILLIPS M.; ROY, J.; SEBRA, R.; SHEN, G.; SORENSON, J.; TOMANEY, A.; TRAVERS, K.; TRULSON, M.; VIECELI, J.; WEGENER, J.; WU, D.; YANG, A.; ZACCARIN, D. ZHAO, P.; ZHONG, F.; KORLACH, J.; TURNER, S. Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules Single Polymerase Molecules. **Science**, v. 323, p. 133-138, 2009.

ENTANI, E.; OHMORI, S.; MASAI, H.; SUZUKI, K. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 475-490, 1985.

ERNST, E. Kombucha: A Systematic Review of the Clinical Evidence. **Research in Complementary and Natural Classical Medicine**, v. 10, p. 85-87, 2003.

FELDMAN, A.L.; DOGAN, A.; SMITH, D. I.; LAW, M. E.; ANSELL, S. M.; JOHNSON, S.H.; PORCHER, J.C.; ÖZSAN, N.; WIEBEN, E.D.; ECKLOFF, B.W.; VASMATZIS, G. Massively Parallel Mate Pair DNA Library Sequencing for Translocation Discovery: Recurrent t (6;7) (p25.3;q32.3) Translocations In ALK-Negative Anaplastic Large Cell Lymphomas. **Blood**, v. 116, p. 633, 2010.

FERMENTAHOLICS, 2020. Disponível em: <https://fermentaholics.com/>. Acesso em: 1 out. 2020.

FILIPPIS de, F.; TROISE, A.D.; VITAGLIONE, P.; ERCOLINI, D. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during kombucha tea fermentation. **Food Microbiology**, v. 73, p. 11-16, 2018.

FUGELANG, K.; EDWARDS, C. G. **Wine microbiology**: Practical applications and procedures. New York, NY, USA: Springer, 2007.

GOMES, R.; BORGES, M.; ROSA, M.; CASTRO-GOMÉZ, R.; SPINOSA, W. Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, p. 151-239, 2018.

GREENWALT, C. J.; STEINKRAUS, K. H.; LEDFORD, R. A. Kombucha, the fermented tea: Microbiology, composition, and claimed health effects. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 7, p. 976-981, 2000.

GULLO, M.; CAGGIA, C.; VERO de, L.; GIUDICI, P. Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 209-212, 2006.

GULLO, M.; GIUDICI, P. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 46-53, 2008.

HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, n. 1, p. 1-8, 2016.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, p. 345-352, 1954.

JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R.V.; LONČAR, E.S.; VITAS, J.S.; SATHISHKUMAR, M. A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 538-550, 2014.

KÄMPFER, P.; FALSÉN, E.; BUSSE, H. J. *Naxibacter varians* sp. nov. and *Naxibacter haematophilus* sp. nov., and emended description of the genus *Naxibacter*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 1680-1684, 2008.

KAPP, J. M.; SUMNER, W. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals of Epidemiology**, v. 30, p. 66-70, 2019.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M.L.; PACE, N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LANE, D.J. 16S/23SrRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Eds.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley and Sons. 1991. p. 115-175.

LEAL, J. M.; SUÁREZ, L. V.; JAYABALAN, R.; OROS, J. H.; ESCALANTE-ABURTO, A. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CYTA Journal Food**, v. 16, p. 390-399, 2018.

LEY de, J.; GOSSELÉ, F.; SWINGS, J. Gênero I *Acetobacter*. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J. G. (Eds.). **Bergey de bacteriologia sistemática**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, p. 268-274.

MARSH, A. J.; O'SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171-178, 2014.

MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Biotechnology (Reading, Mass.)**, v. 24, n. 2, p. 99-103, 1977.

MOREY, M.; FERNÁNDEZ-MARMIESSE, A.; CASTIÑEIRAS, D.; FRAGA, J.M.; COUCE, M.L.; COCHO, J.A. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 110, n. 1-2, p. 3-24, 2013.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI, 2020. Banco de dados GenBank. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>. Acesso em: 1 out. 2020.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 1 out. 2020.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI, 2020. Programa BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 1 out. 2020.

OHMORI, S.; MASAI, H.; ARIMA, K.; BEPPU, T. Isolation and identification of acetic acid bacteria for submerged acetic acid fermentation at high temperature. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 2901-2906, 1980.

PETTERSSON, E.; LUNDEBERG, J. A. A. Generations of sequencing technologies. **Genomics**, v. 93, p. 105-111, 2009.

ROOS de, J.; VUYST de, L. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 115-119, 2018.

SAIKI R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 94, n. 3, p. 441-448, 1975.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SIEVERS, M.; SWINGS, J. The proteobacteria. Part C, the alpha, beta, delta, and epsilon proteobacteria. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R., STALEY, J. R. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York, NY, USA: Springer, 2005. p. 41-95.

SINGH, H.; DU, J.; WON, K.; YANG, J. E.; YIN, C.; KOOK, M.; YI, T.H. *Massilia arvi* sp. nov., isolated from fallow-land soil previously cultivated with *Brassica oleracea*, and emended description of the genus *Massilia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 3690-3696, 2015.

SOKOLLEK, S.; HAMMES, W. Description of a starter culture preparation for vinegar fermentation. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 481-491, 1997.

TURNER, S.; PRYER, K. M.; MIAO, V. P.; PALMER, J. D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, p. 327-338, 1999.

VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J. P.; TAILLANDIER, P. Understanding kombucha tea fermentation: A review. **Journal of Food Science**, v. 83, n.3, p. 580-588, 2018.

VITAS, J. S.; CVETANOVIĆ, A. D.; MAŠKOVIĆ, P. Z.; ŠVARC-GAJIĆ, J. V.; MALBAŠA, R. V. Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 95-102, 2018.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.

WU, J. J.; MA, Y. K.; ZHANG, F. F.; CHEN, F. S. Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of 'Shanxi aged vinegar', a traditional Chinese vinegar. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 289-297, 2012.



Capítulo 11

SISTEMATIZAÇÃO E NOÇÕES SOBRE COLETA, PREPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS ÚTEIS À SAÚDE

JOSIEL ARAUJO LEMES
ARISTÔNIO MAGALHÃES TELES
JOSANA DE CASTRO PEIXOTO

1 INTRODUÇÃO

O Brasil detém a maior cobertura de florestas tropicais do mundo, especialmente concentrada na Região Amazônica. Por sua extensão territorial, diversidade geográfica, climática e biológica, constitui-se no principal país detentor de megadiversidade do Planeta, possuindo entre 15% a 20% das 1,5 milhão de espécies descritas na Terra (BRASIL, 2002). Segundo Lewinsohn e Prado (2006), a flora mais rica do mundo encontra-se no território brasileiro (Tabela 1), sendo cerca de 55 mil espécies de plantas superiores (aproximadamente 22% do total mundial).

O interesse pelas espécies de plantas nativas da América do Sul vem crescendo devido aos benefícios para a saúde com finalidade profilática, curativa, paliativa (OLIVEIRA *et al.*, 2012), especialmente as espécies de ocorrência no Brasil, o qual possui uma das floras mais interessantes, importantes e diversificadas do mundo, que se distribuem por seis domínios fitogeográficos: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. Alguns deles são reconhecidos como *hotspots* globais de biodiversidade, como é o caso do Cerrado (BRASIL, 2017; LIMA *et al.*, 2015; PAESE *et al.*, 2010; SILVA; LACHER, 2020).

Para Ferreira (1998), apesar da riqueza da flora brasileira e da ampla utilização de plantas medicinais pela população, existe o consenso da insuficiência de estudos científicos acerca da temática. Portanto, torna-se necessário estimular a realização desses estudos, tendo em vista a relevância dos seus resultados na contribuição aos objetivos propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Ministério da Saúde (MS), com a Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Decreto nº 5.813 – Portaria Interministerial nº 2.960/2008) (BRASIL, 2006, 2009).

Durante os primeiros anos de implementação dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) das Nações Unidas, que foram adotados em 2015 (UNITED NATIONS, 2015), vários esforços internacionais buscaram empreender um progresso mais rápido em direção aos ousados objetivos. Um exemplo recente inclui o 13º Programa Geral de Trabalho (GPW13) para 2019–23 (UNITED NATIONS, 2015), que envolve uma agenda ambiciosa de metas mensuráveis e estratégias interconectadas para garantir vidas saudáveis e bem-estar para pessoas de todas as idades.

Tabela 1 – Número de espécies de plantas superiores nos países mais diversos

País	Plantas superiores		Total
	Espécies	Endemismo	
Brasil	56.000	18.500	74.500
Colômbia	51.000	17.000	68.000
Indonésia	37.000	18.500	55.500
México	30.000	15.000	45.000
China	30.000	10.000	40.000
África do Sul	23.420	16.500	39.920
Papua-Nova Guiné	21.000	16.000	37.000

Capítulo 11

COLETA, PREPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS

País	Plantas superiores		Total
	Espécies	Endemismo	
Austrália	15.638	14.458	30.096
Venezuela	21.070	8.000	29.070
Equador	21.100	5.000	26.100
Rússia	20.000	5.356	25.356
Índia	17.000	7.875	24.875
Estados Unidos	18.966	4.036	23.002
Malásia	15.000	8.000	23.000
Madagascar	12.000	9.600	21.600
Filipinas	12.000	6.000	18.000
Congo	11.000	3.200	14.200

Fonte: Adaptado de IPEA (2010).

Bioprodutos de origem vegetal, tais como, plantas medicinais e as preparações fitofarmacêuticas representam um mercado que movimenta bilhões de dólares, tanto em países industrializados e em desenvolvimento (LIMA-SARAIVA, 2015).

Novo estudo sobre mercado global de medicamentos à base de plantas para o período de 2019 a 2025, realizado pela *Wise Guy Reports Database* (WGRD, 2019), estima que o mercado mundial de medicamentos à base de plantas foi avaliado em US\$ 120.700 milhões no ano de 2018 e deverá atingir US\$ 203.400 milhões até o final de 2025, crescendo a uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 6,7% durante o período de 2019 a 2025.

Estima-se que, embora estruturas de 200.000 produtos naturais sejam conhecidas, apenas 15% das 350.000 espécies de plantas foram investigadas quanto aos seus constituintes químicos (WURTZEL; KUTCHAN, 2016). Para se ter uma ideia, estudos realizados por Zhao *et al.* (2020) indicam que mais de 700 produtos

bioativos diferentes, dentre eles, os metabólitos secundários, acumularam-se simultaneamente nas folhas de chá em níveis significativos, incluindo polifenóis, como catequinas, flavonoides e antocianinas, metilxantinas como a cafeína, aminoácido não proteico teanina, compostos voláteis e saponinas triterpenoides (YUE *et al.*, 2014).

A identificação botânica é fundamental na Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação (PD&I) dos bioprodutos de origem vegetal, já que é o primeiro passo para o acesso às informações a determinado táxon (espécie, gênero ou família). Ela constitui etapa obrigatória no conjunto orquestrado de ações que visam à qualidade do bioproduto. Deve ser realizada de forma técnica e interdisciplinar, a partir do diálogo entre cientistas das diferentes áreas do conhecimento e das diferentes regiões do mundo.

A obtenção da identidade científica de um táxon requer a utilização de diferentes métodos e ferramentas, incluindo coleta, uso de chaves de identificação, comparação com espécimes previamente identificados por especialistas, consulta a bibliografias especializadas, às coleções virtuais de herbários e até mesmo a especialistas. Para a identificação, especialmente se o objetivo for identificar até o nível de espécie, devem-se coletar amostras do espécime botânico o mais completas possível e em período fértil, ou seja, com as suas estruturas reprodutivas (micrófilos e frondes esporangiados em se tratando de licófitas e samambaias e sementes, flores e/ou frutos, em se tratando de plantas com sementes).

Diante da importância da identificação botânica na PD&I de bioprodutos vegetais para saúde, objetivamos com este trabalho levar o leitor à compreensão e atualização acerca dos métodos e técnicas de coleta e identificação de plantas; bem como às técnicas de incorporação dos materiais botânicos nos acervos das coleções (herbários). Para melhor compreensão, estruturamos em três partes, sendo a primeira referente à sistematização da coleta, a

segunda, à coleta e preparação, e a terceira, à identificação do material botânico.

2 SISTEMATIZAÇÃO DA COLETA

Para se obter êxito na coleta e garantir a qualidade do material para o desenvolvimento da pesquisa, o primeiro passo é conhecer e definir a área onde será realizada a coleta, de modo a identificar a estrutura e tipo de vegetação, ou seja, a fisionomia da vegetação presente na área, a fim de evitar possíveis contratempos e que permita atender aos objetivos propostos pelo estudo. Com os avanços de *hardwares* e *softwares* dispomos de ferramentas tecnológicas no campo do Sensoriamento Remoto (SR) e Sistemas de Informações Geográficas (SIG) (CLARKE, 1986) que podem auxiliar nesta etapa. É o caso do *Google Earth Pro* (GOOGLE, 2021), um *software* gratuito com versões para *desktop* e *mobile*, que oferece recursos e suporte para um planejamento inicial (GREEN, 1994; WANG *et al.*, 2010), especialmente para os casos em que se tem a implementação de pontos de amostragem em determinada área de estudo.

Após o planejamento inicial da área de coleta, o próximo passo é a seleção dos materiais e ferramentas que serão utilizados para a coleta (Figura 1). Esses materiais e ferramentas são necessários para se realizar uma boa coleta e obter amostras de qualidade, tendo em vista que a qualidade e segurança de fitoterápicos estão intimamente ligadas ao quadro regulamentar das preparações, como demonstra Heinrich (2015).

Figura 1 – Materiais e insumos básicos necessários para coleta



Legenda: **A** – Caderneta, caneta de tinta indelével (nanquim) ou lápis e borracha para registro em campo das informações referentes ao material coletado. **B** – Fita métrica e trena, para medir o diâmetro ou circunferência das árvores à altura do peito (1,30 m do solo). **C** – Tesoura de poda e facão, ferramentas utilizadas para cortar ramos. **D** – GPS (*Global Positioning System*), equipamento utilizado para o georreferenciamento (coordenadas geográficas e altitude) dos espécimes coletados. **E** – Binóculos, equipamento utilizado para observar a copa das árvores a fim de localizar ramos com flores ou frutos. **F** – Cordas ou elásticos, para amarrar as prensas. **G** – Folhas de jornais, para se acondicionar as amostras entre elas na prensa. **H** – Folhas de papelão, para intercalar entre as folhas de jornal que contêm as amostras coletadas. **I** – Prensas de madeira, para agregar as pilhas formadas pelos jornais contendo os exemplares intercalados com papelão. **J** – Fita adesiva, para marcar as amostras. **K** – Sacos de plástico, para acondicionar o material botânico coletado. **L** – Álcool 90% (v/v), para borrifar as amostras coletadas e álcool 70% (p/p), para conservar flores ou frutos.

Fonte: Próprios autores (2021).

Com a seleção e organização dos insumos e ferramentas para coleta, o próximo passo é ir a campo ou local para realizar a coleta dos materiais botânicos. Importante salientar que em campo é imprescindível a utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs) e equipamentos de proteção coletiva (EPCs), tais como chapéus ou bonés, camisas de manga longa, calças para proteção solar, botas e perneiras, a fim de evitar possíveis acidentes.

3 COLETA E PREPARAÇÃO¹

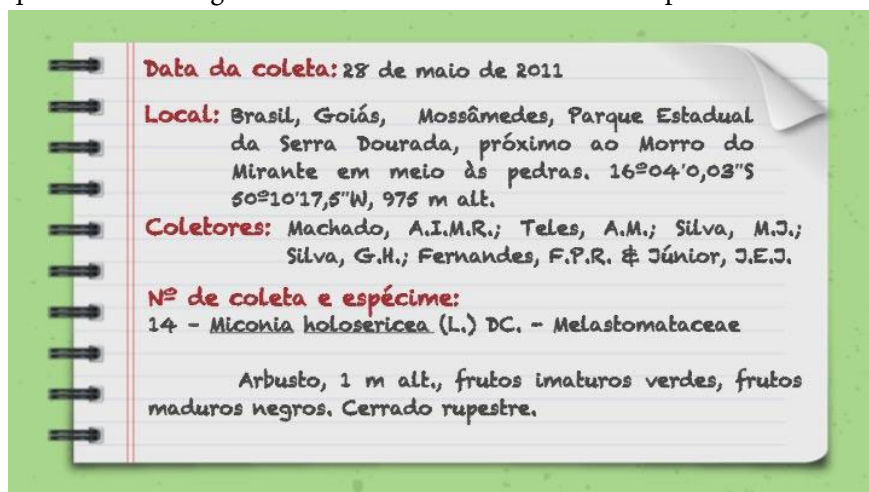
3.1 Anotações

Em campo, a primeira etapa é fazer as anotações na caderneta ou ficha de campo. A primeira informação a ser registrada é a data de coleta e o local de coleta (país, estado, município e localidade específica), acrescida de coordenadas geográficas e altitude do local, que são tomadas com o auxílio do GPS. Cada espécime coletado deverá receber um número de coleta e esse número deverá estar atrelado ao(s) nome(s) do(s) coletor(es). Geralmente, os coletores são identificados por seus sobrenomes seguidos pelas iniciais dos seus prenomes. O número de coleta é sequencial. Ele começa com o espécime 01 (um), que foi o primeiro espécime coletado pelo coletor e esse número vai aumentando à medida que o coletor vai coletando outros espécimes. Cada espécime coletado recebe um número diferente. Quando se tem mais de um coletor, o número de coleta do espécime é atribuído ao nome do primeiro coletor anotado. Após anotado o número de coleta, toma-se nota das características do espécime que virão a ser perdidas depois de a amostra seca (ex.: altura aproximada do indivíduo, cores, texturas e aromas da casca, flores ou frutos) (Figura 2). Além das características do espécime, devem-se registrar também informações sobre o habitat (se aquático, terrestre ou epifítico) e o tipo de vegetação em que o espécime é encontrado. Além de se fazerem essas anotações na caderneta, deve-se também anotar no jornal onde a amostra será prensada (ou na própria amostra por meio de uma fita adesiva) ou, no vidro onde a amostra será acondicionada, o nome do coletor e o número de coleta. É importante que essas anotações sejam feitas a lápis ou com caneta de tinta indelével, a exemplo do nanquim. Desse modo, evita-se que as informações anotadas

1 Alguns trabalhos descrevem de forma minuciosa os procedimentos e técnicas de coleta e processamento para diversos grupos taxonômicos de plantas e fungos, dentre eles podemos citar Lawrence (1951), Fidalgo e Bononi (1984), Forman e Bridson (1991), Mori *et al.* (2011) e Peixoto e Maia (2013).

sejam perdidas caso as páginas da caderneta entrem em contato com algum solvente como água ou álcool. É extremamente importante que essas anotações sejam feitas cuidadosamente e detalhadamente, pois elas serão, posteriormente, transcritas na etiqueta que comporá a exsicata na coleção.

Figura 2 – Modelo de caderneta de campo com as indicações dos dados que devem ser registrados no momento da coleta do espécime



Fonte: Próprios autores (2021).

3.2 Coleta

Os espécimes que serão herborizados para serem incorporados à coleção do herbário deverão ser coletados de acordo com o hábito de crescimento da planta. Em se tratando de plantas herbáceas e de pequeno porte (até 50 cm de comprimento), deve-se coletar a planta inteira (sempre florida ou frutificada) e, se necessário, pode-se dobrá-la antes de prensá-la. Quando se tratar de plantas lenhosas (tais como lianas, arbustos e árvores), devem-se coletar amostras de ramos férteis (com flores ou frutos) com aproximadamente 35 cm de comprimento que devem ser cortados com o auxílio da tesoura de poda ou do podão (em se tratando de espécimes

arbóreos). Sempre que possível, devem-se coletar as amostras em duplicatas, ou seja, mais de uma amostra por espécime e todas as duplicatas dessa amostra deverão receber o mesmo número de coleta. Essas duplicatas serão úteis para a Curadoria do herbário onde o espécime será depositado, pois servirá como material de permuta com outros herbários e até mesmo para o envio como doação para o especialista em troca da identificação do espécime.

Para os espécimes que serão utilizados para extração de compostos, o coletor deve verificar as recomendações presentes nos manuais específicos de cada método de extração, bem como a quantidade de material a ser coletado. Essas amostras, após coletadas, devem ser acondicionadas em sacos ou recipientes plásticos, tendo-se o cuidado de anotar o número da amostra, local de coleta, data, nome e número de coletor para preparação posterior no laboratório.

3.3 Prensagem

As amostras que serão utilizadas para herborização deverão ser prensadas logo após coletadas para evitar, que o material murche antes de ser prensado. Durante o processo de prensagem, as amostras coletadas são colocadas entre duas folhas de jornais dobradas. A amostra deve ser arrumada pacientemente, de modo que o material fique adequadamente acondicionado dentro das dimensões das páginas do jornal dobrado, evitando-se a sobreposição de partes da planta como ramos, folhas e flores. As folhas devem ficar arrumadas de maneira a evidenciar as duas faces (virar algumas folhas para expor o lado inferior), quando forem muitas ou grandes demais, devem-se retirar algumas que serão cortadas no pecíolo, para que seja possível verificar sua filotaxia. A amostra deve ficar acondicionada no jornal, de modo que ela fique com todas as suas partes facilmente visíveis. É importante lembrar que o modo como a planta é prensada determinará como ela se apresentará depois de seca. Após colocar as amostras entre as folhas de jornais, deve-se anotar no jornal de cada amostra, o nome do coletor e o número de coleta (ou afixar estas

informações em cada amostra por meio de fitas adesivas). Feitas as anotações, deve-se colocar cada folha de jornal entre duas folhas de papelão. Todo o conjunto formado pelas folhas de papelão “recheadas” pelas folhas de jornais contendo as amostras devem ficar entre as duas treliças de madeira que são conhecidas como prensas. Essas prensas devem ser pressionadas e firmemente amarradas com o auxílio de cordas, cintas ou elásticos.

Algumas partes carnosas de algumas plantas (como algumas flores e frutos carnosos volumosos) e, em alguns casos, plantas suculentas inteiras ou partes delas (como alguns cactos e orquídeas), devem ser conservados em meio líquido. Nesses casos, utiliza-se, geralmente, como líquido conservante, o álcool 70% (p/p), lembrando-se sempre de afixar na parte externa do recipiente, ou dentro dele, um pedaço de papel vegetal imerso no líquido, utilizando-se lápis ou caneta de tinta indelével, o nome do coletor e o seu número de coleta.

3.4 Secagem

As amostras coletadas para serem incorporadas ao herbário podem passar por dois processos de secagem: secagem física, por meio de calor ou secagem química, com o uso de álcool 70% (p/p). Na secagem física, as amostras são acondicionadas em estufas para secagem de plantas e desidratam a partir da perda água por meio do calor emanado pela fonte de calor da estufa. Essas estufas geram um calor de aproximadamente 60 °C e o tempo de permanência do material na estufa depende da sua natureza. De um modo geral, materiais não carnosos ficam por dois a três dias. Já se o material contiver partes carnosas, pode durar um pouco mais. Ao final de cada dia, a prensa que está na estufa deve ter seus materiais vistoriados e deve ser reapertada, se necessário. A secagem química é feita com o uso de álcool 70% (p/p) e deve ser realizada quando não se tem acesso imediato a uma estufa para a secagem do material. Nesse tipo de secagem, o material prensado (apenas os jornais e

papelões amarrados) é posto em um saco plástico grande e é embebido por completo em álcool. Depois, o saco plástico deve ser bem fechado. A secagem química permite que o material desidrate e permaneça conservado até que seja possível secá-lo em estufa. Esse recurso é utilizado geralmente em expedições de campo quando não se tem acesso à estufa elétrica. Porém, mesmo depois desse processo, as plantas devem passar por um período de secagem no calor. Quando o material é desidratado quimicamente, essa informação deve constar na caderneta de campo que, depois, será transcrita para a ficha da exsicata.

3.5 Confeção de exsicatas

As amostras, após desidratadas, são montadas em cartolinas rígidas (180 g) e, de preferência, na cor branca com tamanho 42 × 28 cm.

A montagem da exsicata na cartolina pode se dar a partir do uso de diferentes técnicas. Tradicionalmente, costura-se a planta com agulha e linha de algodão número zero, dando-se pontos por trás da cartolina. Essa técnica de montagem tem a vantagem de tornar a exsicata esteticamente mais bonita e de também facilitar a sua desmontagem, caso necessária. A desvantagem é a demora em se montar a exsicata, o que pode ser um problema para herbários que demandam incorporar no seu acervo um volume muito grande de plantas continuamente. Outra técnica para montagem de exsicata é a partir de uso de colas. Pode-se utilizar cola branca solúvel em água ou então cola quente em bastão, com o auxílio de uma pistola de aplicação. É uma técnica de montagem rápida, especialmente quando se utiliza cola quente, porém, que exige uma manutenção mais frequente, pois, com o passar do tempo, a cola resseca e o material se desprende da cartolina.

Após a montagem, é colada a etiqueta ou ficha da exsicata (Figura 3). A inserção da etiqueta é essencial e indispensável para

as amostras que serão depositadas no herbário, sendo que constarão informações imprescindíveis a outros pesquisadores no momento da identificação botânica (MADEN, 2004). A melhor posição para a etiqueta principal é, geralmente, no canto inferior direito; isso torna o rótulo mais fácil de ler quando mantido em capas do gênero que se abrem no lado direito (MADEN, 2004). Na etiqueta, são transcritas as informações registradas na caderneta de campo no momento da coleta do material.

Figura 3 – Exemplo de etiqueta ou ficha de exsicata

O diagrama mostra uma etiqueta de exsicata com os seguintes campos e legendas:

- Nome da espécie:** *Miconia holosericea* (L.) DC.
- Nome da família botânica:** MELASTOMATACEAE
- Sigla do herbário e número de tombo da amostra:** UFG 50.844
- Nome popular:**
- Procedência:** Brasil, Goiás, Mossâmedes, Parque Estadual da Serra Dourada, próximo ao Morro do Mirante em meio às pedras. 16°04'0,03"S, 50°10'17,5"W, 975 m.
- Observações:** Arbusto, 1 m alt., frutos imaturos verdes, frutos maduros negros. Cerrado Rupestre.
- Coletor:** A.I.M.R. Machado et al., 14
- Det.:** A.I.M.R. Machado
- Data:** 28/V/2011
- Data:** 16/XII/2011

As legendas apontam para os seguintes campos:

- Nome da espécie** (aponta para *Miconia holosericea*)
- Nome da família botânica** (aponta para MELASTOMATACEAE)
- Sigla do herbário e número de tombo da amostra** (aponta para UFG 50.844)
- Nome do determinador da espécie** (aponta para Det.: A.I.M.R. Machado)
- Coletor(es) e número de coleta** (aponta para Coletor: A.I.M.R. Machado et al., 14)
- Data de coleta** (aponta para Data: 28/V/2011)
- Data de determinação** (aponta para Data: 16/XII/2011)

Fonte: Próprios autores (2021).

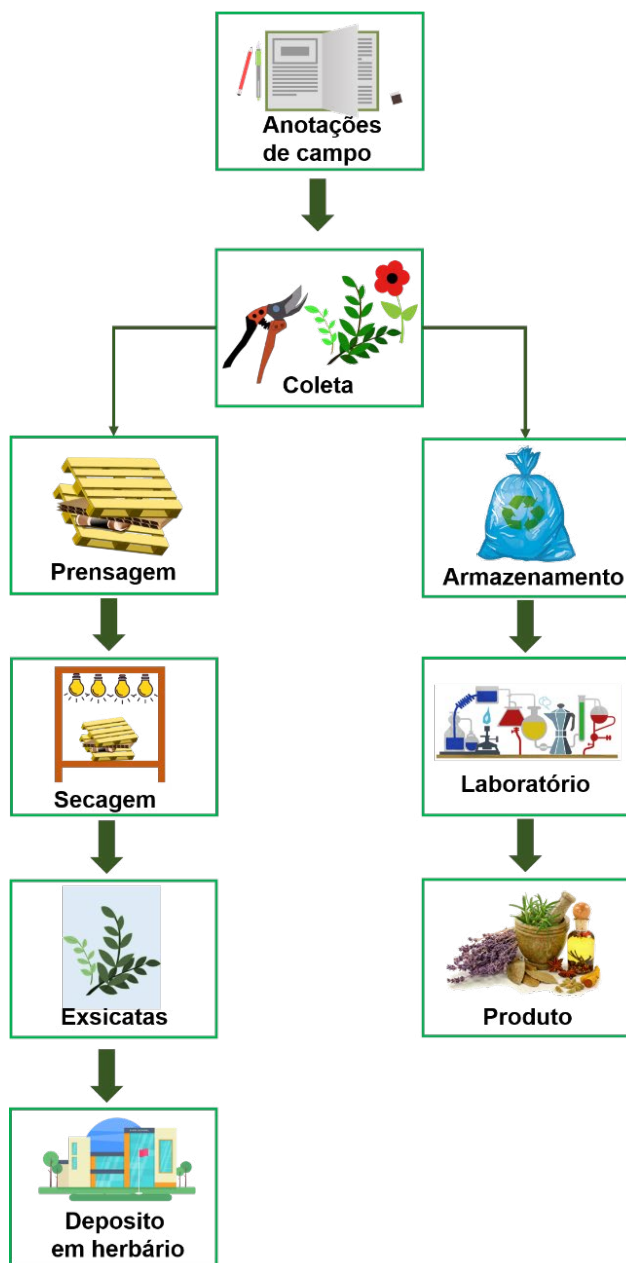
É recomendável também que se cole no canto superior esquerdo um pequeno envelope para o acondicionamento de fragmentos que, porventura, venham a se soltar da exsicata.

Todas as etapas, desde a coleta do material botânico até a incorporação no acervo do herbário e a obtenção do produto de plantas, estão esquematizadas na Figura 4.

Capítulo 11

COLETA, PREPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS

Figura 4 – Etapas desde a coleta, passando pela confecção de exsicatas até a incorporação delas no herbário; processamento no laboratório e obtenção de produto de plantas medicinais



Fonte: Próprios autores (2021).

4 IDENTIFICAÇÃO

Identificação é a determinação de um táxon, como idêntico ou semelhante a outro já existente. Essa etapa deve ser feita por um especialista (taxonomista), sendo necessário, na maioria das vezes, realizar a comparação com materiais de herbário devidamente identificados, imagens de exsicatas disponíveis em herbários virtuais, ou uso de chaves dicotômicas de identificação, bem como o uso de literaturas específicas, tais como monografias e revisões taxonômicas e floras (WIGGERS; STANGE, 2008). Durante o processo de identificação, podem ser encontrados táxons novos para a Ciência (BEBBER *et al.*, 2010), os quais devem ser descritos de acordo com as normas preconizadas pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica (CINB) (TURLAND, 2018).

A identificação taxonômica correta das espécies é essencial para o desenvolvimento das ciências básicas (desenvolvimento de teorias) e aplicadas (aplicação de teorias às necessidades humanas). A nomenclatura científica, expressa em linguagem universal, denomina a mesma planta, com um único nome, em qualquer lugar do planeta, oferecendo, dessa forma, maior segurança para os pesquisadores. Por essa razão, a nomenclatura científica permite o diálogo entre cientistas de diferentes países e regiões, promovendo acesso às informações necessárias para o desenvolvimento de pesquisa, não só na botânica, mas em diversas áreas, (MARTINS-DA-SILVA, 2002), tais como aquelas envolvidas na PD&I de bioprodutos para saúde.

Deve-se ressaltar que a identificação taxonômica segue uma sequência hierárquica. O primeiro passo é identificar-se a família botânica à qual a planta pertence e, posteriormente, identificam-se o gênero e a espécie. Para tal, faz-se o uso de um ou mais métodos ou de combinação dos dois, tais como uso de chaves de identificação, comparação com espécimes ou imagens de espécimes previamente identificados por especialistas ou consulta direta a especialistas. Comentaremos abaixo cada um destes métodos.

4.1 Uso de chaves de identificação

As chaves de identificação taxonômica representam um tipo de literatura taxonômica. Ela é um esquema ou arranjo analítico, pelo qual é proporcionada uma escolha entre duas proposições contraditórias, dela resultando a escolha de uma e a rejeição de outra (LAWRENCE, 1951). Essas proposições são compostas por características morfológicas do táxon que se quer identificar, seja ele uma família, um gênero ou uma espécie. A identificação por chaves é um procedimento complexo e exige o conhecimento de morfologia vegetal e o seu uso é geralmente complementado ou utilizado em conjunto com outros métodos, como a consulta à descrição do táxon a que se chegou ou comparação com ele. As chaves de identificação geralmente são encontradas em bibliografias taxonômicas especializadas, como trabalhos de flora, monografias e revisões taxonômicas. Uma excelente chave para a identificação de famílias de Gimnospermas e Angiospermas do mundo está disponível em Geesink *et al.* (1981). A chave de identificação para famílias de Gimnospermas ocorrentes no Brasil pode ser encontrada em Souza e Lorenzi (2012) e para gêneros em Byng (2015). Para a identificação de famílias de Angiospermas ocorrentes no Brasil, uma chave bastante útil foi publicada por Souza e Lorenzi (2010).

4.2 Comparação com espécimes ou com imagens de espécimes

Um método frequentemente utilizado, sobretudo por aqueles que não estão habituados ao uso de chaves de identificação, é o de comparação. Nesse método, que geralmente é utilizado para identificação de gêneros e, sobretudo, de espécies, o táxon a ser identificado é comparado com outros do mesmo gênero (quando se pretende identificar a espécie) ou com outros da mesma família (quando se pretende identificar o gênero). Utiliza-se como referenciais, espécimes

mes, preferencialmente, identificados por especialistas. Atualmente, muitos herbários disponibilizam acesso virtual ao seu acervo, a exemplo do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JABOT, 2020), do Reflora – Herbário Virtual (2020), do Herbário do Museu de História Natural de Paris (MNHN, 2020) e do Herbário do Jardim Botânico Real de Kew (THE HERBARIUM CATALOGUE, 2020), dentre outros. A partir destes herbários virtuais, é possível ter-se acesso a imagens de exsicatas, muitas delas identificadas por especialistas.

4.3 Consulta direta a especialistas

Denominamos de especialista o botânico taxonomista que se especializou em determinado táxon, geralmente, uma família botânica. Os curadores dos herbários normalmente possuem o contato dos especialistas das famílias botânicas, pois estão em contato direto com eles, seja remetendo exemplares como doação em troca de identificação, ou recebendo visitas deles em suas coleções. Esses especialistas, geralmente por sua *expertise*, a depender do material, conseguem identificar rapidamente o gênero ou a espécie. Apesar de não ser o ideal, em alguns casos, é possível que o espécime seja identificado pelo especialista por meio de uma fotografia que pode ser enviada por e-mail. Porém, na maioria das vezes, é necessário que o especialista receba o material físico, pois ele precisa dissecar as estruturas reprodutoras (flores e frutos) e examiná-las no microscópio estereoscópico. Além disso, muitas vezes, o pesquisador precisa recorrer às chaves de identificação e outras bibliografias especializadas, o que demanda um tempo maior. Apesar de ser, talvez, o método mais confiável de identificação, esse método pode se tornar demorado, pois fica-se à mercê da disponibilidade do pesquisador requisitado para tal.

5 CONCLUSÃO

Após todos os procedimentos, as amostras destinadas à extração em laboratório são preparadas e as amostras para herborização são destinadas a herbários para armazenamento adequado. A coleta, a preparação e a identificação de plantas úteis à saúde contribuem e constituem parte de um processo parcimonioso e ético dos pesquisadores em desenvolverem pesquisas em ciências básicas e aplicadas, bem como para garantir a integridade da manutenção da biodiversidade brasileira e mundial.

Aqui, apresentamos técnicas essenciais dos procedimentos necessários para herborização de material botânico e de maneira breve informações de armazenamento do espécime em campo, caso seja para extração de compostos ou outro tipo de subproduto.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD)/CAPES e ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Territórios e Expressões Culturais no Cerrado, Unidade Universitária de Anápolis, Universidade Estadual de Goiás.

REFERÊNCIAS

BEBBER, D. P.; CARINE, M. A.; WOOD, J. R. I.; WORTLEY, A. H.; HARRIS, D. J.; PRANCE, G. T.; DAVIDSE, G.; PAIGE, J.; PENNINGTON, T. D.; ROBSON, N. K. B. & SCOTLAND, R. W. Herbaria are a major frontier for species discovery. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 51, p. 22169-22171, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1011841108>. Acesso em: 23 nov. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Textos Básicos de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 23 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência. Farmacêutica e Insumos Estratégicos.

Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 13 fev. 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **Biodiversidade brasileira:** avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: MMA/SBF, 2002.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biomas brasileiros.** 2017. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biomas>. Acesso em: 23 nov. 2020.

BYNG, J. W. **The Gymnosperms handbook:** a practical guide to extant families and genera of the world. Hertford, United Kingdom: Plant Gateway, 2015.

CLARKE, K. C. Advances in Geographic Information Systems. **Computers, Environment and Urban Systems**, v. 10, n. 3-4, p. 175-184, 1986. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0198-9715\(86\)90006-2](https://doi.org/10.1016/0198-9715(86)90006-2). Acesso em: 23 nov. 2020.

FERREIRA, S. H. (Org.). **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil.** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FIDALGO, O.; BONONI, V.L.R. (Orgs.). **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico.** São Paulo: Instituto de Botânica, 1984.

FORMAN, L.; BRIDSON, D. **The Herbarium Handbook.** Royal Botanic Gardens Kew, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1991.tb01808.x>. Acesso em: 23 nov. 2020.

GEESINK, R.; LEEUWENBERG, A.J.M.; VELDKAMP, J.E. **Thonner's analytical key to the families of flowering plants.** 2nd. ed. Netherlands: Springer, v. 5, 1981.

GOOGLE EARTH PRO. Disponível em: <https://www.google.com.br/earth/download/gep/agree.html>. Acesso em: 26 jan. 2021.

GREEN, K. The Potential and limitations of remote sensing and GIS in providing ecological information. In: LACHOWSKI, H. M.; WIRTH, T.; MAUS, P.; AVERS, P. **Remote sensing and GIS in ecosystem management.** Washington, DC: Island Press, 1994. p. 1-48.

HEINRICH, M. Quality and safety of herbal medical products: regulation and the need for quality assurance along the value chains. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 80, n. 1, p. 62-66, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bcp.12586>. Acesso em: 23 nov. 2020.

IPEA. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. **Sustentabilidade ambiental no Brasil:** biodiversidade, economia e bem-estar humano. Projeto Perspectivas do Desenvolvimento Brasileiro. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2010.

Capítulo 11

COLETA, PREPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS

JABOT – Sistema de Gerenciamento de Coleções Botânicas. 2020. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://jabot.jbrj.gov.br/v3/consulta.php>. Acesso em: 3 out. 2020.

LAWRENCE, G. H. M. **Taxonomia das plantas vasculares**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1951.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Síntese do conhecimento atual da biodiversidade brasileira. In: LEWINSOHN, T. M. (Org.). **Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006. p. 21-109.

LIMA, R. A. F.; MORI P. D.; PITTA, G.; MELITO, O. M.; BELLO, C.; MAGNAGO F. L.; ZWIENER, P. V.; SARAIVA, D. D.; MARQUES, M. C. M.; OLIVEIRA, A. A.; PRADO, I. P. How much do we know about the endangered Atlantic Forest? Reviewing nearly 70 years of information on tree community surveys. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 9, p. 2135-2148, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0953-1>. Acesso em: 23 nov. 2020.

LIMA-SARAIVA, *et al.* A implantação do programa de plantas medicinais e fitoterápicos no sistema público de saúde no Brasil: uma revisão de literatura, *Revista Interdisciplinar de Pesquisa e Inovação, Pernambuco*, v. 1, n. 1, p. 1-11, set. 2015.

MADEN, K. Plant Collection and Herbarium Techniques. **Our Nature**, v. 2, p. 53-57, 2004. Disponível em: 10.3126/on.v2i1.327. Acesso em: 23 nov. 2020.

MARTINS-DA-SILVA, V. C. R. **Coleta e Identificação de Espécimes Botânicos**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002.

MNHN. Muséum National D'Histoire Naturelle. **Plantes vasculaires (P)**. Disponível em: <https://science.mnhn.fr/institution/mnhn/collection/p/item/search>. Acesso em: 3 out. 2020.

MORI S.A.; BERKOV, A.; GRACIE, C.A.; HECKLAU, E. F. **Tropical plant collecting: from the field to the internet**. Florianópolis: TECC, 2011.

OLIVEIRA, B. V.; YAMADAA, T. L.; FAGGB W. C.; BRANDÃO, G. L. M. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170-179, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.011>. Acesso em: 23 nov. 2020.

PAESE, A.; PAGLIA A.; PINTO, L. P.; FOSTER, M. N.; FONSECA, M.; SPOSITO, R. Fine-scale sites of global conservation importance in the Atlantic forest of Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 19, n. 12, p. 3445-3458, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10531-010-9906-x>. Acesso em: 23 nov. 2020.

PEIXOTO, A. L.; MAIA, L. C. **Manual de Procedimentos para herbários**. INCT-Herbário virtual para a Flora e os Fungos. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

REFLORA. Herbário Virtual. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/>. Acesso em: 23 nov. 2020.

SILVA, J. M. C.; LACHER, T. E. Cerrado: South America. In: GOLDSTEIN, M.; DELLASALA, D. **Encyclopedia of the World's Biomes**. [s. l.]: Elsevier, 2020. p. 546-553. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11983-9>. Acesso em: 23 nov. 2020.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Chave de identificação**: para as principais famílias de Angiospermas nativas e cultivadas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010. Disponível em: <https://www.docsity.com/pt/chave-de-identificacao-para-as-principais-familias-de-angiospermas-nativas-e-cultivadas-no-brasil/4892011/>. Acesso em: 23 nov. 2020.

THC. The Herbarium Catalogue. **Major projects that contribute to digitisation of the collection**. Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <<http://www.kew.org/hercat>>. Acesso em: 23 nov. 2020.

TURLAND, N. J.; WIERSEMA, J. H.; BARRIE, F. R.; GREUTER, W.; HAWKSWORTH, D. L.; HERENDEEN, P. S.; KNAPP, S.; KUSBER, W-H, LI D-Z, MARHOLD, K.; MAY, T. W.; MCNEILL, J.; MONRO, A. M.; PRADO, J.; PRICE, M. J.; SMITH, G. F. (Eds.). **International Code of Botanical Nomenclature (Shenzhen Code)**. Glashütten: Koeltz Botanical Books, 2018.

UNITED NATIONS. Department of Economic and Social Affairs. Sustainable Development. **Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development**. 2015. Disponível em: <https://sdgs.un.org/publications/transforming-our-world-2030-agenda-sustainable-development-17981>. Acesso em: 27 jan. 2021.

WANG, K.; FRANKLIN E. S.; GUO, X.; CATTET, M. Remote Sensing of Ecology, Biodiversity and Conservation: A Review from the Perspective of Remote Sensing Specialists. **Sensors**, v. 10, n. 11, p. 9647-9667, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/s101109647>. Acesso em: 23 nov. 2020.

WGRD. **Wise Guy Reports Database. Mercado Global de Fitoterapia: Tamanho da Indústria, Crescimento, Análise e Previsão de 2025**. iCrowd Newswire, 2019. Disponível em: <https://icrowdpt.com/2019/02/07/mercado-global-de-fitoterapia-tamanho-da-industria-crescimento-analise-e-previsao-de-2025/>. Acesso em: 27 jan. 2021.

Capítulo 11

COLETA, PREPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS

WIGGERS, I.; STANGE, C.E.B. **Manual de Instruções para Coleta, Identificação e Herborização de Material Botânico**. Programa de Desenvolvimento Educacional – SEED. Laranjeiras do Sul: Unicentro, 2008. Disponível em: <http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/733-2.pdf>. Acesso em 27 jan 2021.

WURTZEL, E. T.; KUTCHAN, T. M. Plant metabolism, the diverse chemistry set of the future. **Science**, v. 353, n. 6305, p. 1232-1236, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aad2062>. Acesso em: 23 nov. 2020.

YUE, Y.; CHU, G.-X.; LIU, X.-S.; TANG, X.; WANG, W.; LIU, G.-J.; YANG, T.; LING, T.-J.; WANG, X.-G.; ZHANG, Z.-Z.; XIA, T.; WAN, X.-C.; BAO, G.-H. TMDB: A literature-curated database for small molecular compounds found from tea. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 243, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0243-1>. Acesso em: 23 nov. 2020.

ZHAO, J.; LI, P.; XIA, T.; WAN, X. Exploring plant metabolic genomics: chemical diversity, metabolic complexity in the biosynthesis and transport of specialized metabolites with the tea plant as a model. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 5, p. 667-688, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1752617>. Acesso em: 23 nov. 2020.



Capítulo 12

TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DE ORIGEM VEGETAL

ANTÔNIO CARLOS SEVERO MENEZES
DANIELLE COELHO DA CRUZ
GRACIELLE OLIVEIRA SABBAG CUNHA

1 INTRODUÇÃO

O reino vegetal tem sido, desde muito tempo, uma rica fonte para a obtenção de moléculas com potencial terapêutico, muitas das quais constituem modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos. A busca por novas substâncias bioativas produzidas por plantas é um dos enfoques da Química de Produtos Naturais, uma subárea da Química Orgânica que apresenta caráter interdisciplinar, e que envolve diferentes atividades, tais como a extração, o isolamento e a identificação estrutural de metabólitos secundários de origem natural, bem como o estudo das propriedades e aplicações práticas destes metabólitos.

Uma vez vencida a etapa inicial da descoberta de uma nova substância com potencial terapêutico, ainda há um longo caminho a ser percorrido até que ela chegue à prateleira da farmácia. Será necessário avaliar os efeitos biológicos dessa molécula em animais, na etapa que é denominada de estudo pré-clínico, para que, só então, sejam iniciados os estudos clínicos em seres humanos.

Neste capítulo, objetivamos apresentar as técnicas envolvidas na etapa mais inicial deste longo percurso: trataremos das técnicas empregadas para extração, isolamento e caracterização dos constituintes de origem vegetal. Na seção destinada às técnicas de extração, abordaremos os processos de extração a frio e a quente. Na segunda seção, serão apresentadas técnicas de fracionamento, além dos métodos cromatográficos mais comumente empregados para o isolamento de metabólitos secundários. Por fim, trataremos da caracterização desses metabólitos através da Espectroscopia de Infravermelho, da Ressonância Magnética Nuclear e da Espectrometria de Massas.

2 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

O processo de investigação fitoquímica de um produto natural de origem vegetal se inicia com a escolha da espécie a ser estudada, sendo necessária a realização de levantamentos bibliográficos, etnobotânicos e etnofarmacológicos, a fim de reunir dados sobre as espécies que são utilizadas na medicina popular e apresentam atividade biológica (BORDIGNON; MENTZ, 2017).

Após a escolha da espécie, alguns procedimentos antecedem a etapa de extração do material vegetal, tais como: identificação (realizada por um especialista), preparo e depósito da exsicata em Herbário, coleta, secagem e trituração (BORDIGNON; MENTZ, 2017).

A coleta informa aspectos importantes sobre a espécie *in loco*, como suas dimensões, localização dos exemplares coletados, horário e temperatura, que são fatores que podem influenciar na produção dos metabólitos secundários pela planta. Uma exsicata deve ser depositada em Herbário, sendo necessário coletar partes da planta que contenham estruturas reprodutivas, como flores ou frutos, seguindo normas específicas para o preparo (BORDIGNON; MENTZ, 2017).

De acordo com a finalidade, pode-se utilizar o material vegetal fresco ou seco. Geralmente, opta-se por utilizar material seco em estufa de circulação de ar, em média, por 24 ou 48 h, com tempera-

tura máxima de 40 °C, para secar sem degradar seus constituintes, evitando, também, a proliferação de micro-organismos. Entretanto, há casos em que o processo extrativo deve ocorrer em material vegetal fresco, como, por exemplo, na extração de óleos essenciais (MATOS, 2009).

A trituração pode ocorrer em moinho de facas, discos, bolas ou de martelos e deve seguir granulometria relativa ao perfil de extração de interesse, tendo em vista que esta interfere no percentual dos compostos majoritários obtidos ao final e no processo de identificação, influenciando, assim, a composição química da análise (SOUZA *et al.*, 2010). Geralmente, para extração a frio, utiliza-se granulometria moderadamente grossa, a fim de facilitar o processo de filtração após a maceração com solvente, mas deve ser levada em consideração a parte do material vegetal estudada.

A realização de uma triagem fitoquímica preliminar fornece, qualitativamente, os principais metabólitos presentes na espécie, o que permite direcionar a etapa da extração, com a escolha da técnica a ser utilizada, considerando qual a finalidade do processo, o grau de divisão do material, o solvente (sua seletividade, toxicidade, disponibilidade e custo), a estabilidade das substâncias extraídas e a temperatura (MATOS, 2009).

2.1 Extração a frio

2.1.1 Maceração

A extração por solvente é o método mais utilizado. Ocorre através da penetração do solvente na matriz do sólido, quando o soluto se dissolve no solvente; em seguida, o solvente é difundido para fora da matriz e o sólido extraído é coletado. Apesar do longo período de extração, grandes volumes de solvente gastos e da baixa eficiência, esse método pode ser usado para extração de componentes termolábeis, apresentando bons resultados para extração de

compostos fenólicos. Aumentando a difusividade e a solubilidade, melhora-se o processo extrativo. Nesse processo, deve-se considerar também as propriedades do solvente extrator, o tamanho das partículas, a relação solvente/sólido, a temperatura e o período de extração (ZHANG; LIN; YE, 2018).

Como o processo ocorre em recipiente fechado durante um período prolongado sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator, não há o esgotamento do material vegetal (OLIVEIRA; MAIOR; DRESCH, 2018). Uma alternativa seria realizar a filtração e repetir o processo de maceração por igual período, com o mesmo material vegetal, realizando boa escolha do solvente. No Quadro 1, está representada a relação entre o solvente e o grupo de substâncias extraídas de acordo com a polaridade do solvente.

Quadro 1 – Relação entre a polaridade do solvente e grupos de metabólitos secundários extraídos

Solvente	Grupo de substâncias extraídas
Éter	Alcaloides, cumarinas, terpenoides e ácidos graxos
Diclorometano	Lignanas, cumarinas, flavonoides, lactonas e triterpenos
Acetato de etila	Flavonoides, xantonas, taninos, saponinas e triterpenos
Clorofórmio	Terpenoides e flavonoides
Acetona	Fenol e flavonoides
Hexano	Terpenos, esteroides e acetofenonas
Etanol	Polifenóis, alcaloides, taninos, terpenoides e esteroides
Metanol	Polifenóis, antocianinas, taninos, terpenoides, saponinas, lactonas e flavonas
Água	Antocianinas, taninos, saponinas, terpenoides, polipeptídeos e lecitinas

Fonte: Oliveira, Maior e Dresch (2018).

Pode ser de grande utilidade realizar, preliminarmente, uma extração com hexano para retirar os constituintes lipossolúveis e facilitar o contato do material vegetal com solventes mais polares, como éter ou acetato de etila, seguido de metanol. Realizar mudança de solventes na fase de extração permite o esgotamento do material vegetal (MATOS, 2009).

2.1.2 Percolação

É um método indicado para extrair substâncias termossensíveis, farmacologicamente ativas e presentes em baixas quantidades no vegetal. O arraste dos metabólitos ocorre pela passagem constante do líquido extrator, levando ao esgotamento do material vegetal (REGINATTO, 2017). A percolação é mais eficiente quando comparada à maceração, por se tratar de um processo contínuo. Nesta técnica, o solvente saturado é constantemente substituído por solvente fresco. Embora o volume de solvente possa ser muito grande (boa parte dele pode ser recuperado em evaporador rotativo), consegue-se reduzir o risco de reações provocadas pelo calor, solvente e luz na formação de artefatos (MATOS, 2009).

2.1.3 Turbolização

A turbo-extração é uma técnica simples, rápida e versátil e utiliza um dispersor tipo Ultraturrax. O processo extrativo baseia-se na capacidade de extrair as substâncias de interesse com simultânea redução do tamanho das partículas. Há uma rápida dissolução das substâncias, ocasionada pelo rompimento das estruturas celulares da droga vegetal. Em contrapartida, essa redução pode dificultar a separação delas no decorrer do processo (REGINATTO, 2017). O processo ocorre em temperatura ambiente, mas torna-se necessária a utilização de equipamento específico para realizar a extração. O rendimento do processo dependerá da escolha do solvente, podendo apresentar resultados próximos ao da extração

por maceração ou por decocção, como demonstrado no estudo de Oliveira *et al.* (2016).

2.2 Extração a quente

2.2.1 Infusão

Na infusão, o processo extrativo ocorre ao colocar o material vegetal rasurado ou moído em contato direto com água fervente, em recipiente coberto. Esse método é indicado para as partes do vegetal que apresenta estrutura mole, porém, não possui capacidade de esgotar os metabólitos de interesse presentes no material vegetal estudado (REGINATTO, 2017). Contudo, apresenta boa capacidade extrativa para certos grupos de metabólitos, como compostos fenólicos, que são termossensíveis, com resultados próximos aos de extrações realizadas a frio, cujo rendimento para esses grupos é maior (SCHNEIDER *et al.*, 2015).

2.2.2 Decocção

O extrato obtido por decocção contém grande quantidade de impurezas solúveis em água. Esse método não pode ser usado para extrair componentes termolábeis ou voláteis (ZHANG; LIN; YE, 2018). Nessa técnica, o material vegetal fica em contato com o líquido extrator em ebulição por tempo determinado. Esse método é indicado para materiais duros, como rizomas e raízes, não necessitando de equipamentos ou vidrarias especiais para sua execução, porém, é contraindicado utilizar como líquido extrator solventes voláteis e potencialmente tóxicos (REGINATTO, 2017).

2.2.3 Extração sob refluxo

Esse método é eficiente e requer menos tempo de extração e solvente, mas não pode ser utilizado para extração de produtos naturais termolábeis (ZHANG; LIN; YE, 2018). O líquido extrator

e o material vegetal são colocados em um mesmo recipiente e submetidos a aquecimento, mas o sistema tem acoplados, condensadores, o que permite a utilização de líquidos extratores voláteis, que permanecem dentro do sistema após condensação para novo ciclo extrativo. Apesar de possuir alta capacidade de extração, essa técnica não é exaustiva (REGINATTO, 2017).

2.2.4 Extração por Soxhlet

Esse método integra a extração por percolação e refluxo, que garante a renovação do solvente no sistema para extrair com solvente fresco. Extrai automaticamente, e de maneira contínua, requer menos tempo e solvente, mas devido à alta temperatura e o longo tempo de extração, aumenta a possibilidade de degradação das substâncias (ZHANG; LIN; YE, 2018). A principal diferença entre a extração em aparelho de Soxhlet e a extração por refluxo é que o material extraído e o líquido extrator ficam em compartimentos distintos. Essa técnica possibilita uma extração eficiente, mas requer vidraria específica, não sendo indicada para compostos termolábeis (REGINATTO, 2017). Geralmente, para detectar o fim do processo extrativo na obtenção do extrato bruto, deve-se observar a limpidez do solvente extrator, caracterizando o esgotamento do material vegetal (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

3 ISOLAMENTO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS

3.1 Fracionamento

A preparação dos extratos é considerada a primeira etapa para o isolamento dos metabólitos e, após essa etapa, uma investigação farmacológica *in vitro* ou *in vivo* ou cromatografia preliminar permite constatar a presença de grupos de metabólitos de interesse. Os principais objetivos do fracionamento de extratos vegetais são o isolamento e a identificação de constituintes da

planta, que ocorrem por meio de processos cromatográficos e espectroscópicos, visando obter frações enriquecidas com compostos bioativos ou reduzir o teor de compostos com potencial toxicidade (REGINATTO, 2017).

3.1.1 Extração líquido-líquido

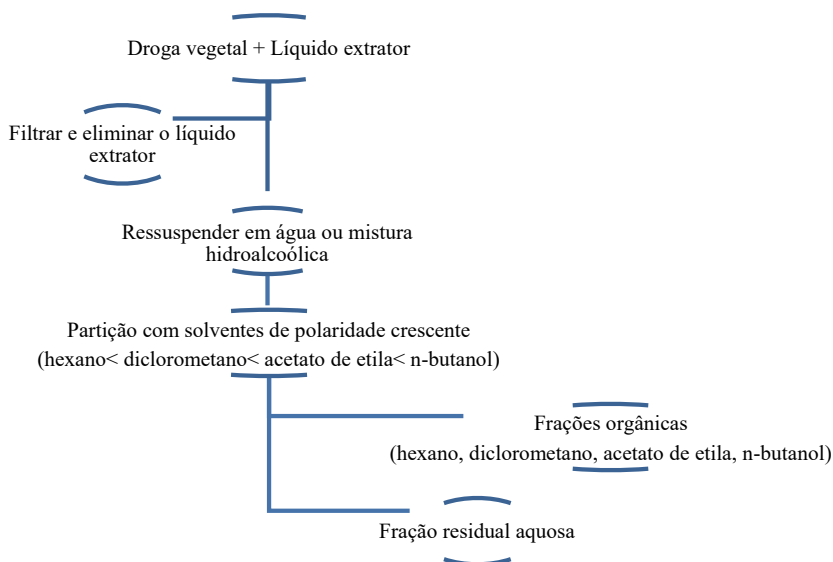
Na extração líquido-líquido (ELL), a amostra sofre uma partição entre duas fases imiscíveis, uma orgânica e a outra aquosa. Fatores como afinidade do soluto pelo solvente de extração, razão das fases e o número de extrações determinam a eficiência da extração. Para o procedimento de partição com solventes, é preciso, necessariamente, que eles sejam imiscíveis. A escolha ocorre com base no grau de polaridade crescente entre eles. Na Figura 1, está representado um esquema para realização da partição líquido-líquido adaptado de Reginatto (2017).

Essa é uma técnica simples e geralmente realizada em funil de separação ou em tubos de centrifuga. Pode-se utilizar uma vasta quantidade de solventes puros disponíveis. Uma outra vantagem está na desnaturação das proteínas o que elimina a contaminação da coluna cromatográfica. Porém, a ELL apresenta uma série de desvantagens, como a dissolução parcial de amostras com alta afinidade pela água no solvente orgânico, causando perda do analito. Ademais, a amostra é concentrada com impurezas, sendo necessário utilizar solventes ultrapuros. Quando ocorre formação de emulsões, gasta-se mais tempo no procedimento. Também há problemas com o descarte devido aos volumes grandes de amostras e de solventes. Além disso, o analito pode adsorver-se na vidraria e pode haver suscetibilidade a erros (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Há sistemas em que o valor da constante de distribuição (K_D) entre as fases pode ser aumentado pelo ajuste do pH, pois previne a ionização de ácidos e bases, diminuindo a solubilidade de compostos orgânicos na fase aquosa, pela formação de par iônico com solutos

ionizáveis, pela formação de complexos lipofílicos com íons metálicos ou pela adição de sais neutros (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Figura 1 – Esquema de realização do processo de partição líquido-líquido



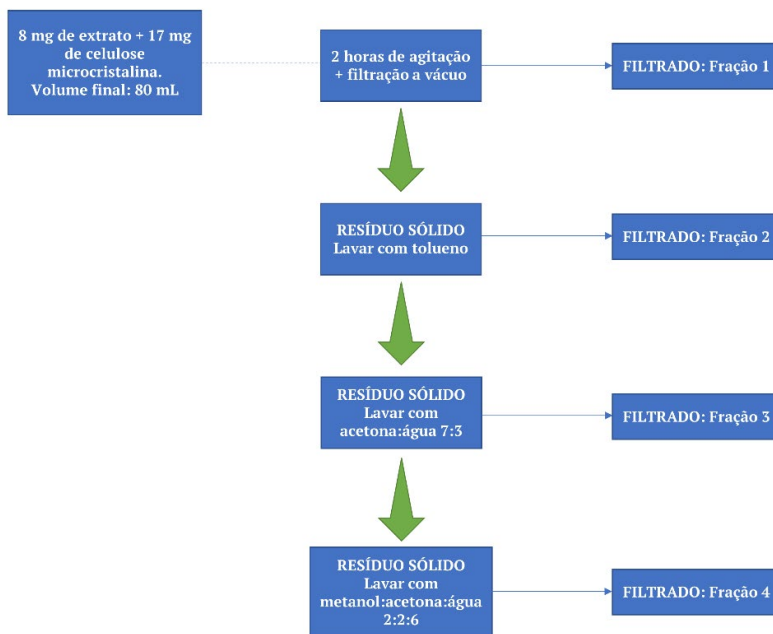
Fonte: Adaptado de Reginatto (2017).

3.1.2 Celulose microcristalina

A celulose microcristalina pode ser empregada no fracionamento de extratos brutos, atuando como suporte da fase estacionária líquida na cromatografia de partição. A Figura 2 apresenta uma estratégia de partição utilizando celulose microcristalina. Nesse processo, a seleção do solvente e do gradiente de eluição deve levar em consideração a disponibilidade e a capacidade de separação dos compostos.

As frações originadas, após realização de filtração a vácuo, seguem no processo de isolamento para elucidação de seus constituintes. Um aspecto importante é que a celulose é um biopolímero amplamente disponível, de preço acessível, e fornece uma base sustentável para implementação dessa metodologia (FÉLIX, 2017).

Figura 2 – Estratégia para uma partição por adsorção com celulose microcristalina



Fonte: Adaptado de Félix (2017).

3.1.3 Partição ácido-base

Na extração quimicamente ativa ou ácido-base, sabe-se que parte dos compostos orgânicos são mais solúveis em solventes orgânicos do que em água, apresentando um coeficiente de partição (K_D) maior que 4. Algumas classes específicas de compostos orgânicos podem ter alteradas suas propriedades para se tornarem mais solúveis em água. Ácidos e bases orgânicos, como aminas (base orgânica), ácidos carboxílicos (ácidos fortes), fenóis (ácidos fracos) e compostos neutros podem sofrer reações e ter alterada sua solubilidade. A separação é realizada em funil de decantação, uma técnica acessível (ENGEL *et al.*, 2012).

Para ácidos carboxílicos e fenóis, pode-se adicionar solução aquosa a 5% de hidróxido de sódio (NaOH) ou solução saturada de

bicarbonato de sódio (NaHCO_3), ocorrendo formação de sais. Já as aminas, que também podem ser convertidas em sais, podem ser tratadas com solução aquosa de ácido inorgânico, como o ácido clorídrico (HCl). Geralmente, os sais formados nesses processos são solúveis em água (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Para concluir o experimento, é necessário recuperar cada composto, etapa denominada de isolamento ou recuperação. Aumentando-se o pH, basificando o meio com NaOH concentrado até atingir pH 10, espera-se recuperar a amina. Para os ácidos, acidifica-se a solução com HCl concentrado. Dessa forma, as substâncias de interesse deixam de ser solúveis em água. Esse procedimento deve ser feito com cautela por ser exotérmico. Um aspecto negativo do método está no fato de ocorrer degradação de alguns constituintes e não apresentar separação satisfatória em matéria orgânica (BARREIROS; MACHADO, 2010).

3.2 Métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos são os procedimentos de separação e isolamento mais amplamente utilizados pelos químicos de produtos naturais. Eles servem tanto para fins de identificação e análise de misturas e substâncias, sendo chamados, nesse caso, de cromatografia analítica, quanto para o isolamento de substâncias, situação na qual recebe o nome de cromatografia preparativa (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003).

3.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica amplamente utilizada para fins de análise, tanto de extratos vegetais brutos quanto para avaliar o resultado de um processo de separação. Trata-se de uma técnica versátil, de fácil compreensão e execução e que possibilita separações em curto espaço de tempo,

além de apresentar grande repetitividade e ser de custo relativamente baixo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O processo de separação na CCD é fundamentado, principalmente, no fenômeno de adsorção. Entretanto, usando-se fases estacionárias tratadas, pode ocorrer também por partição ou troca iônica, o que permite seu emprego tanto na separação de substâncias hidrofóbicas quanto hidrofílicas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

As placas de CCD podem ser confeccionadas nos próprios laboratórios, através do espalhamento uniforme da suspensão aquosa do adsorvente sobre placas de vidro, ou, então, preparadas industrialmente, o que garante condições de padronização quanto ao tamanho das partículas do adsorvente e à espessura da camada, possibilitando resultados mais reprodutíveis do que com as placas preparadas manualmente. Os adsorventes podem conter indicadores fluorescentes em 254 nm, com a especificação F_{254} , geralmente sobre base de vidro ou alumínio. A base de alumínio, além de inquebrável, possibilita que a placa seja recortada em tamanho menor, caso seja de interesse do usuário (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003).

Entre os adsorventes mais utilizados em CCD, estão a sílica (SiO_2), a alumina (Al_2O_3), a celulose e a poliamida. A sílica apresenta caráter fracamente ácido e é empregada na separação de compostos lipofílicos como ácidos graxos, terpenoides, esteroides, alcaloides etc. A alumina é, depois da sílica, o adsorvente mais utilizado na CCD. Ela apresenta características alcalinas, embora possa ser preparada para apresentar características neutra ou ácida. Geralmente, é empregada na separação de compostos lipofílicos e, pelo fato de poder ser preparada com características alcalina, neutra ou ácida, é bastante útil na separação de substâncias que apresentam variações dessas características. Ela separa bem hidrocarbonetos policíclicos, alcaloides, aminas e vitaminas lipossolúveis. Já a poliamida tem sido empregada, com maior frequência, na

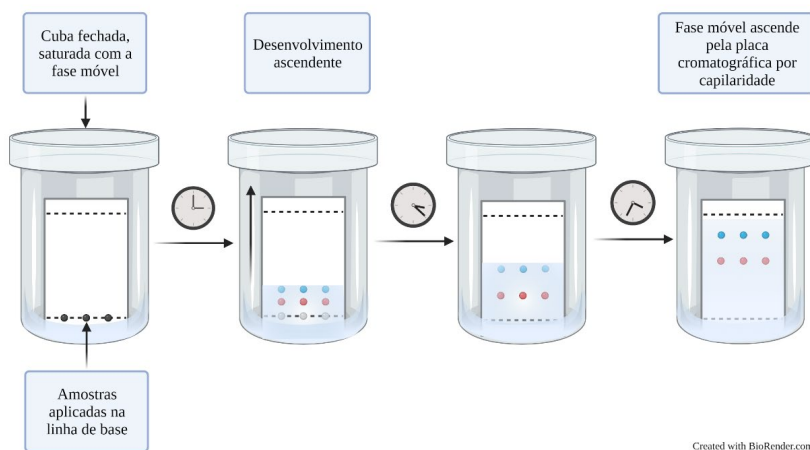
separação de fenóis e de ácidos carboxílicos, embora seu uso seja comprometido em função de sua baixa aderência ao vidro, no caso das cromatoplasmas preparadas em laboratório. Podemos citar também a celulose, que pode ser empregada na separação de ácidos carboxílicos, aminoácidos, carboidratos, entre outros (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O desenvolvimento da CCD ocorre em uma cuba fechada, previamente saturada com a fase móvel. A aplicação das amostras nas cromatoplasmas é feita a partir de soluções relativamente concentradas, as quais são aplicadas com capilares a distâncias adequadas das bordas e das demais amostras.

Quanto ao desenvolvimento, a cromatografia ascendente é o método mais utilizado. Nele, a placa é colocada na cuba, quase na posição vertical, apoiada no seu fundo. A cuba deve estar perfeitamente vedada para evitar a evaporação do solvente, e, dessa maneira, permitir que o meio fique saturado com a fase móvel, o que se consegue colocando papel de filtro molhado com a fase móvel nas paredes da cuba, antes do desenvolvimento do cromatograma (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). A fase móvel sobe através da placa por capilaridade, conforme pode ser observado na Figura 3.

Após o desenvolvimento da CCD, evapora-se o solvente e as placas são reveladas, a fim de tornar visíveis as substâncias incolores presentes na amostra. A visualização pode ser feita por meio de métodos físicos, como, por exemplo, luz ultravioleta (em geral, nos comprimentos de onda 254 e 365 nm); por meio de métodos biológicos, onde são utilizadas reações enzimáticas ou bacterianas para tornar a mancha visível ou, ainda, por meio de métodos químicos. Este último consiste em usar reveladores químicos (vanilina sulfúrica, vapor de iodo, FeCl_3 , reagente de Dragendorff, por exemplo) que, em contato com as substâncias da amostra, as tornam coloridas e visíveis (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Figura 3 – Esquema de separação dos componentes de uma mistura através de cromatografia em camada delgada



Fonte: Adaptado de *Chemistry Dictionary* (2017). Criado com BioRender.com.

3.2.2 Cromatografia em coluna

A cromatografia líquida em coluna clássica é uma técnica bastante utilizada para o isolamento de produtos naturais e para purificação de produtos de reações. Nessa técnica, o sólido utilizado na fase estacionária deve ser um material insolúvel na fase móvel, sendo que os mais empregados são a sílica gel e a alumina, geralmente na forma de pó finamente dividido (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

No caso da eluição gradiente, a mistura a ser separada é colocada na coluna com um eluente (fase móvel) pouco polar. Na sequência, a polaridade do eluente é aumentada gradativamente, o que aumenta, também, o seu poder de arraste de substâncias mais polares. Já na eluição do tipo isocrática, o mesmo eluente é utilizado durante toda a corrida cromatográfica, não havendo, portanto, variação de polaridade da fase móvel (SEIDEL-MORGENSTERN, 2020).

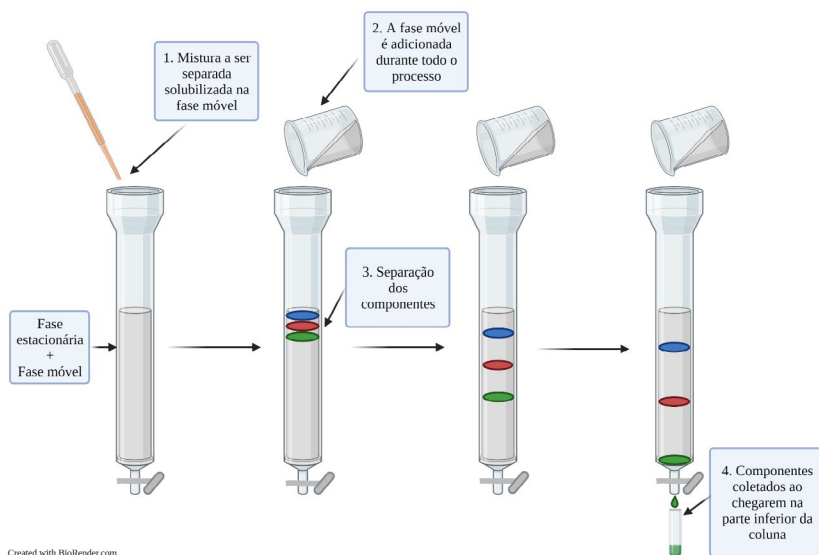
Durante o desenvolvimento da coluna, o fluxo de eluente deve ser contínuo, de modo a não permitir que a coluna seque, isto é,

fique sem fase móvel. Caso ocorra de a coluna secar, podem ocorrer rachaduras na fase estacionária, as quais poderão promover uma migração diferencial dos componentes da mistura, comprometendo o resultado da separação (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Uma vez aplicada a amostra na coluna, os diferentes componentes da mistura irão se mover com velocidades distintas, dependendo de sua afinidade relativa pela fase móvel e pela fase estacionária. À medida que os compostos da mistura são separados, as bandas cromatográficas começam a ser formadas, conforme pode ser observado no esquema da Figura 4.

De um modo geral, numa cromatografia em coluna de fase normal, que é aquela onde a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel, os compostos apolares atravessam a coluna com uma velocidade maior do que os compostos polares, uma vez que os primeiros têm menor afinidade com a fase estacionária. Se o adsorvente escolhido interagir fortemente com todos os compostos da mistura, ela não se moverá. Por outro lado, se for escolhido um eluente muito polar, é possível que todos os componentes sejam eluídos ao mesmo tempo, não havendo a separação desejada (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Figura 4 – Esquema de separação dos componentes de uma mistura através de cromatografia em coluna



Fonte: Adaptado de *Chemistry Dictionary* (2017). Criado com BioRender.com.

3.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é um importante membro de toda a família de técnicas de separação, uma vez que consegue separar misturas que contêm muitos compostos similares (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). A CLAE utiliza colunas contendo o suporte/fase estacionária formado por partículas extremamente finas, esféricas ou irregulares, homogêneas e densamente compactadas, que oferecem grande resistência ao fluxo da fase móvel, razão pela qual requer uma pressão alta e fluxo livre de pulsação, o que torna a CLAE uma técnica mais cara em comparação com as anteriores (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003).

Entre os suportes mais comumente empregados, encontram-se a sílica gel e a alumina, geralmente utilizadas para separar compostos lipofílicos. Para a separação de substâncias hidrofílicas, podem ser utilizados materiais orgânicos, como a celulose, a poliamida e

géis de dextrano. Outra alternativa utilizada são os materiais modificados quimicamente, como a celulose acetilada ou o gel de sílica substituído por cadeias orgânicas alifáticas de C8 e C18 (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003).

3.2.4 Cromatografia gasosa (CG)

A cromatografia gasosa (CG) serve para separar componentes a partir de misturas de compostos voláteis. A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa).

A amostra, por meio de um sistema de injeção, é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas convenientes no local de injeção da amostra e na coluna possibilita a vaporização dessas substâncias que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferentes. O uso de um detector adequado na saída da coluna torna possível a detecção e a quantificação dessas substâncias (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (EM) constituem uma poderosa combinação para a determinação estrutural dos constituintes de origem vegetal. Essas duas técnicas, combinadas com a espectroscopia de infravermelho (IV), compreendem o conjunto típico de ferramentas espectroscópicas utilizadas pelos químicos de produtos naturais, uma vez que a interpretação dos espectros obtidos através de cada um destes experimentos pode fornecer diferentes informações a respeito da estrutura da substância analisada.

4.1 Espectroscopia de infravermelho (IV)

A espectroscopia de IV mede a excitação vibracional dos átomos em torno de suas ligações, permitindo determinar ligações características de muitos grupos funcionais por meio da absorção da luz infravermelha. As posições das linhas de absorção associadas a essa excitação dependem do tipo de grupo funcional, de modo que o espectro de IV como um todo exibe um padrão único para cada substância (VOLLHARDT; SCHORE, 2013).

Como cada tipo de ligação tem sua própria frequência natural de vibração, e como dois tipos idênticos de ligações em dois compostos diferentes estão em ambientes levemente diferentes, o espectro de IV em duas moléculas de estruturas diferentes nunca são exatamente idênticos. Desse modo, o espectro de IV pode servir para moléculas da mesma forma que impressões digitais servem para seres humanos (PAVIA *et al.*, 2015). Se o espectro de IV de uma substância desconhecida é superponível com o espectro de IV de uma amostra conhecida, isso pode servir como uma prova de identidade (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003).

4.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN é uma das técnicas mais poderosas para a obtenção de informações estruturais detalhadas sobre moléculas orgânicas. Essas informações podem auxiliar tanto na identificação de um composto conhecido quanto na elucidação estrutural de um composto desconhecido.

Para a obtenção de um espectro de RMN, submete-se amostra a um campo magnético muito forte, ao mesmo tempo que ela é irradiada com energia eletromagnética de frequência apropriada. Desse modo, os núcleos de determinados elementos, como ^1H e ^{13}C , absorvem energia através do processo chamado de ressonância

magnética. Essa absorção de energia é quantizada e produz um espectro característico para o composto da amostra, denominado espectro de RMN (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C são muito importantes para a determinação estrutural dos metabólitos secundários, uma vez que sua interpretação permite caracterizar o número e o tipo de átomos de hidrogênio e carbono presentes na molécula em função da localização e do desdobramento dos sinais correspondentes à absorção de energia eletromagnética (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003).

Em se tratando de moléculas de estrutura complexa, os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C podem ser obtidos simultaneamente de modo correlacionado, dando origem à categoria de RMN em duas dimensões (RMN 2D). Quando o RMN 2D é aplicado ao RMN de ^1H , ele é chamado de espectroscopia de correlação homonuclear COSY (do inglês, *Correlation Spectroscopy*). O experimento COSY é um experimento de duas dimensões que indica quais átomos de hidrogênio estão acoplados entre si (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

Podem também ser obtidos espectros de RMN 2D que indicam acoplamentos entre os hidrogênios e os carbonos aos quais eles estão ligados. O experimento HSQC (do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Correlation*) é um experimento 2D que apresenta as correlações entre os núcleos envolvidos que estão distantes por uma ligação química. Assim, um experimento HSQC ^1H - ^{13}C indica a qual carbono está ligado cada um dos hidrogênios da molécula orgânica. Já o experimento HMBC (do inglês, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) apresenta as correlações entre os núcleos envolvidos que estão distantes por mais de uma ligação química, isto é, fornece correlações entre carbonos e prótons separados por duas, três e, às vezes, até quatro ligações (DIEHL, 2008).

4.3 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (EM), por sua vez, não é uma forma de espectroscopia no sentido convencional, já que não envolve absorção de radiação. A EM envolve a formação de íons em um espectrômetro de massas seguida pela separação e detecção dos íons de acordo com a massa e a carga. Um espectro de massas pode ser entendido como um gráfico que representa, no eixo x , as massas moleculares dos íons detectados e, no eixo y , a abundância de cada íon detectado. O eixo x é rotulado m/z , onde m = massa e z = carga, enquanto o eixo y expressa a abundância relativa de íons, geralmente, como uma porcentagem do pico mais alto, o qual é denominado pico base (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

O espectro de massas de uma substância pode fornecer informações importantes relacionadas com sua estrutura, como a massa molecular e padrões de fragmentação. Os espectrômetros de massas de alta resolução são capazes de medir valores de m/z até três ou quatro casas decimais, consistindo, desse modo, em um método extremamente exato para determinar as massas moleculares e, conseqüentemente, as fórmulas moleculares das substâncias em análise (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

O padrão de fragmentação, por sua vez, pode ajudar a caracterizar a presença, bem como a localização de certos grupos funcionais e cadeias laterais na molécula. Adicionalmente, o espectrômetro de massas pode ser acoplado a um aparelho de cromatografia gasosa (CG/EM), permitindo tanto a identificação quanto a quantificação de componentes de baixo peso molecular, ainda que estejam em misturas complexas (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003).

REFERÊNCIAS

- BARREIROS, A. L. B. S.; MACHADO, S. M. F. **Química Orgânica Experimental**. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, CESAD, 2010.
- BORDIGNON, S. A. L.; MENTZ, L. A. Introdução à análise fitoquímica. *In*: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 11-19.
- CHEMISTRY DICTIONARY. **Column Chromatography**. 14 nov. 2017. Disponível em: <https://chemdictionary.org/column-chromatography/>. Acesso em: 25 jan. 2021.
- CHEMISTRY DICTIONARY. **Thin Layer Chromatography**. 14 nov. 2017. Disponível em: <https://chemdictionary.org/thin-layer-chromatography/>. Acesso em: 25 jan. 2021.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.
- DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.
- DIEHL, B. Principles in NMR Spectroscopy. *In*: HOLZGRABE, U., WAWER, I., DIEHL, B. (Eds.). **NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2008.
- ENGEL, R. G.; KRIZ, G. S.; LAMPMAN, G. M.; PAVIA, D. L. **Química Orgânica Experimental**. 3. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.
- FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. *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**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, 2003. p. 229-245.
- FÉLIX, R. A. F. C. **Processamento e caracterização de extratos fenólicos de macroalgas: uma abordagem sistemática**. 2017. 189 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Molecular) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 2017.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.
- OLIVEIRA, L. F.; MAIOR, J. F. A. S.; DRESCH, R. R. **Farmacognosia Pura**. Porto Alegre: SAGAH, 2018.
- OLIVEIRA, V.B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C.F.; PAULA, C.S.; DUARTE, A.F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Efeito de diferentes técnicas extrativas

no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, Dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, supl. I, p. 230-239, 2016.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 2. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F. Métodos de Extração e/ou Concentração de Compostos Encontrados em Fluidos Biológicos para Posterior Determinação Cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

REGINATTO, F.H. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 69-82.

SCHNEIDER, A.L.S.; BERTELLI, P.R.; BARRETO, M.L.; ABREU, N.V.; AGOSTINI, F.; SCHWAMBACH, J. Caracterização química e atividade biológica de extratos aquosos de *Brunfelsia cuneifolia* J.A. Schmidt (Solanaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, supl. III, p. 1103-1111, 2015.

SEIDEL-MORGENSTERN, A. Fundamentals and General Terminology. In: SCHMIDT-TRAUB, H.; SCHULTE, M.; SEIDEL-MORGENSTERN, A. (eds.). **Preparative Chromatography**. 3. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2020. p. 9-48.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica – Volume 1**. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

SOUZA, A. P. T. B.; BARNI, S. T.; FERREIRA, R. A.; COUTO, A. G. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas hidroetanólicas das flores de *Calendula officinalis* L. empregando planejamento fatorial. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 29, n. 1, p. 13-21, 2010.

VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. **Química Orgânica: estrutura e função**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2013.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. **Chinese Medicine**, v. 13, p. 1-26, 2018.

Capítulo 13

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE BIOPRODUTOS PARA SAÚDE

JOELMA ABADIA MARCIANO DE PAULA
PABLINE SILVA GASPAROTI
MARIA TERESA FREITAS BARA

1 INTRODUÇÃO

Bioprodutos abrangem uma diversidade de *bio-based products*, incluindo aqueles voltados para cuidados, recuperação e manutenção da saúde. Um dos pilares para sua obtenção é a sustentabilidade. Nesse sentido, para este capítulo, o termo bioproduto é definido como matéria-prima, substância e/ou energia derivadas de biomassa, ou seja, derivadas de recursos biológicos renováveis (HONG; HOW; LAM, 2016; THIMMANAGARI; McDONALD; TODD, 2010).

Em Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação (PD&I) de bioprodutos, são integrados os saberes das mais diversas áreas do conhecimento, englobando as Ciências Ambientais, Biológicas, da Saúde, Exatas, Humanas, Sociais, Econômicas, entre outras. Portanto, a interdisciplinaridade não é apenas uma estratégia inteligente na obtenção desses produtos, mas uma necessidade.

Dentre os bioprodutos, destacam-se os fitoterápicos, considerando que são obtidos a partir de fontes renováveis (plantas medicinais). Nessa perspectiva, alinha-se, inclusive, com a Política Nacional

de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006) que visa, dentre outros objetivos, promover o uso sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde.

Dados divulgados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) indicam 2,8% da participação dos fitoterápicos no mercado total de medicamentos em 2014 (BRASIL, 2016). Trata-se de um mercado incipiente no Brasil, no entanto, as projeções mundiais apontam um crescimento para o setor de 5,88% até 2023 (MARKET RESEARCH FUTURE, 2019).

Segundo o *WHO Global Report on Traditional and Complementary Medicine* (WHO, 2019), o Brasil tem implantado políticas nacionais de regulação para plantas medicinais e fitoterápicos, sob a responsabilidade da ANVISA, cujos esforços iniciaram em 1988. A ANVISA é o órgão vinculado ao Ministério da Saúde que estabelece critérios para o registro e/ou notificação de medicamentos fitoterápicos (MF) e produtos tradicionais fitoterápicos (PTF) no Brasil (BRASIL, 2014a,c; BRASIL, 2018). Além disso, há exigências das agências reguladoras nacional e internacionais quanto aos aspectos de segurança, eficácia e qualidade desses bioprodutos, para a sua disponibilização à população (BRASIL, 2014a; WHO, 2007, 2009, 2011, 2017, 2019).

Em termos regulatórios, MF é entendido como aquele “obtido com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade”, e PTF é “aquele obtido com emprego exclusivo de matérias-primas vegetais, cuja segurança e efetividade seja alicerçada no longo histórico de utilização demonstrado em documentação técnico-científica, [...] e que seja caracterizado pela constância de sua qualidade”. Todavia, para serem disponibilizados ao consumo, tanto o MF quanto o PTF terão que apresentar requisitos semelhantes de qualidade, embora possam apresentar diferenças quanto aos critérios de comprovação de eficácia e segurança (BRASIL, 2014a).

Os critérios para a garantia da qualidade de MF e PTF são amplos e envolvem as etapas de obtenção, processamento, manutenção da integridade e estabilidade do material de partida, da droga vegetal, dos derivados vegetais (extratos, óleos voláteis e fixos, ceras e exsudatos) e dos produtos finais. Dentre esses critérios, destacam-se o perfil químico e analítico dos bioprodutos, que inclui a identificação e a quantificação de compostos bioativos (marcadores e outras substâncias presentes). Para tanto, são necessários métodos analíticos validados. De acordo com a RDC nº 26/2014, caso não haja métodos analíticos de identificação e quantificação de marcadores, descritos em farmacopeias ou formulários oficiais reconhecidos pela ANVISA, tais métodos devem ser **desenvolvidos e validados** (BRASIL, 2014a, 2018).

Na identificação e quantificação de marcadores em bioprodutos para saúde, podem ser utilizadas diversas técnicas analíticas, tais como espectrofotométricas e cromatográficas. O desenvolvimento e a validação de tais métodos devem atender parâmetros nacionais preconizados pela ANVISA (BRASIL, 2017a) e internacionais (ICH, 2005; USP, 2008) e suas atualizações têm o intuito de garantir a confiabilidade dos resultados e sua credibilidade durante o uso cotidiano. Ressalta-se que também os equipamentos, instrumentos e as vidrarias utilizados na validação do sistema de medição devem ser certificados, devidamente calibrados e o analista deve ser qualificado.

Neste capítulo, abordaremos as principais etapas para o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para controle de qualidade de bioprodutos para saúde, com ênfase nos fitoterápicos.

2 GARANTIA DA QUALIDADE EM BIOPRODUTOS PARA SAÚDE

A qualidade dos bioprodutos para saúde é definida por um conjunto orquestrado de ações que devem incluir a garantia da autenticidade do material vegetal (sobre esse assunto, consultar Capítulo

11), ausência de impurezas, presença de compostos bioativos ou perfis desses constituintes e conteúdo do marcador desejável (BRASIL, 2014a,b,c; BRASIL, 2018; WHO, 2017). Os procedimentos e parâmetros de qualidade do bioproduto devem ser bem definidos em todas as suas etapas, tendo em vista a complexidade do material vegetal, já que a qualidade do produto final irá depender da qualidade dos seus insumos. Neste sentido, além de métodos analíticos validados para o monitoramento da qualidade química do material, um amplo sistema de garantia da qualidade deve ser implementado em todas as etapas de produção. Deve-se atentar também para a aplicação das Boas Práticas de Fabricação, cujos critérios gerais podem ser encontrados no *WHO guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines* (WHO, 2007). No Brasil, são adotados os critérios estabelecidos nas RDCs nº 17/2010 e nº 13/2013 para MF e PTF, respectivamente (BRASIL, 2010; 2013).

Nos próximos tópicos, trataremos do desenvolvimento e da validação de métodos analíticos quantitativos (Figura 1).

Capítulo 13 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Figura 1 – Esquema das principais etapas do desenvolvimento e validação de métodos analíticos quantitativos para o controle de qualidade de bioprodutos para saúde



Fonte: Próprios autores (2021).

Embora, para fins didáticos, esses assuntos sejam tratados aqui em tópicos distintos, é necessário ressaltar que, na prática, essas etapas estão entrelaçadas e, por vezes, caminham de forma indissociável.

3 CONTRIBUIÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE BIOPRODUTOS PARA SAÚDE

Na avaliação da qualidade de um fitoterápico (MF ou PTF), um processo analítico é desenvolvido com o intuito de testar uma ou mais características definidas (qualitativas ou quantitativas) de substâncias ou classes de substâncias, de acordo com critérios de aceitação estabelecidos (BRASIL, 2014a,c; WHO, 2007; 2011).

Durante o desenvolvimento de um método analítico quantitativo, é necessário atentar-se para algumas etapas importantes, descritas a seguir.

3.1 Escolha dos marcadores do material vegetal

Visto que as plantas medicinais e seus derivados são matrizes complexas, tornam-se fundamentais a identificação e a quantificação de compostos químicos específicos – marcadores – uma estratégia importante para o estabelecimento do padrão de qualidade de matérias-primas e produtos finais, como os fitoterápicos (BRASIL, 2014a; EMA, 2011; WHO, 2017).

Os marcadores são constituintes ou grupos de constituintes quimicamente definidos presentes na matéria-prima vegetal, empregados como referência no controle de qualidade e que tenham, preferencialmente, correlação com o efeito terapêutico (BRASIL, 2014c; EMA, 2011; HEALTH CANADA, 2015). Podem ser divididos em duas classes, conforme as referências já citadas:

a) Marcador ativo: constituinte ou um grupo de constituintes que contribuem para a atividade terapêutica do material vegetal. O produto pode ser ajustado por padronização a um nível de marcador ativo que seja reprodutível, seja para um nível que é encontrado naturalmente na planta ou para um nível mais concentrado em um extrato.

b) Marcador analítico: constituinte ou grupo de constituintes que possuem apenas finalidade analítica, não contribuem para a atividade terapêutica. O produto é ajustado para obter uma composição reprodutível do referido marcador.

A seleção de marcadores, de acordo com o Guia de Orientação para Registro de Medicamento Fitoterápico e Registro e Notificação de Produto Tradicional Fitoterápico (BRASIL, 2014c) e Guia da *European Medicines Agency* (EMA, 2011), deve atender aos seguintes princípios: sua escolha deve ser justificada; devem ser adequa-

dos para a finalidade pretendida (qualitativa, quantitativa, estabilidade); devem atrelar etapas da produção e do controle de qualidade; podem ser utilizados para fins qualitativos e quantitativos; seu teor deve se manter dentro de uma faixa estável.

Vale ressaltar que as especificações sobre o teor de marcadores não são de livre escolha. Elas são estabelecidas a partir da comprovação clínica (MF) ou de uso tradicional (PTF). Por isso, a importância de se realizar um amplo estudo acerca do material vegetal antes de selecionar qual será o marcador e, conseqüentemente, qual padrão analítico será utilizado no desenvolvimento do método (DESAI; TATKE, 2019). Para tanto, o estado da arte do material vegetal deve ser levantado na literatura técnico-científica, a fim de reunir o máximo de informações farmacológicas, toxicológicas e químicas.

Se houver monografia que contemple o método analítico de identificação e quantificação de marcadores para a droga vegetal, esse método pode ser adaptado para o produto intermediário (derivado vegetal) e produto final. No entanto, por causa da mudança na matriz, deve ser feita uma validação integral do método, como veremos no decorrer deste capítulo (BRASIL, 2017a; WHO, 2017).

Os marcadores propostos fornecem uma importante ferramenta para correlacionar as drogas ou derivados vegetais no produto acabado, independentemente do fato de esse marcador ter atividade terapêutica ou não. No entanto, somente a presença dos marcadores dentro dos limites estabelecidos não assegura por si só a uniformidade lote a lote de um fitoterápico/bioproduto, sendo necessário apresentar outros testes, como o perfil cromatográfico dentre outros (BRASIL, 2014a).

3.2 Definição das substâncias químicas de referência

Ao definir os constituintes da matéria-prima vegetal que serão empregados como referência no controle de qualidade (marcadores), conseqüentemente, são definidas as substâncias químicas de

referência (SQR) que deverão ser empregadas nas etapas de validação do método analítico. As SQR são substâncias ou misturas de substâncias químicas de elevado grau de pureza, de modo que sua identidade, sua qualidade, seu teor e sua potência tenham sido criteriosamente caracterizados e assegurados. Para fins de validação do método analítico, a SQR deve, preferencialmente, ser farmacopeica, ou seja, ser estabelecida e distribuída por publicações oficiais reconhecidas pela agência reguladora (BRASIL, 2017a).

Mas, no caso de não disponibilização de SQR farmacopeica para o método pretendido, o que ocorre com muita frequência com os fitoterápicos, é admitida a utilização de substância química de referência caracterizada (SQC), obtida de fornecedor qualificado ou isolada da própria droga vegetal, desde que apresentado um relatório conclusivo de caracterização, conforme orientações e critérios da agência reguladora (BRASIL, 2018).

A agência reguladora brasileira (BRASIL, 2018) permite também que extratos padrões oficializados possam ser utilizados como referências em métodos analíticos para fitoterápicos. Nesse caso, devem ser acompanhados do cromatograma que expõe o perfil químico de seus constituintes, bem como do certificado de análise, ambos fornecidos pelo fabricante (por exemplo, aqueles disponibilizados pela *United States Pharmacopeia*).

O chamado padrão secundário ou padrão de trabalho pode ser utilizado na rotina laboratorial para análises de fitoterápicos. Nesse caso, o valor do padrão de trabalho deve ser estabelecido por comparação a uma substância química de referência (SQR). Por exemplo, um lote de um extrato vegetal pode ser qualificado (caracterizado) em relação a uma SQR e, após sua qualificação, passar a ser usado como padrão de trabalho. É necessário rigor na apresentação de todos os dados de qualificação do extrato, como padrão de trabalho, bem como dos dados do lote da SQR utilizada (BRASIL, 2018).

3.3 Preparo das amostras

O preparo das amostras é uma etapa crítica para a confiabilidade e a exatidão dos resultados obtidos em um método analítico quantitativo, especialmente quando as amostras se originam de matrizes complexas, como os produtos de origem vegetal. Nesse sentido, nem sempre serão aplicados os mesmos processos extrativos para a droga vegetal, o derivado vegetal ou o produto final. Portanto, o processo extrativo do marcador, adequado a cada material vegetal, deve ser determinado experimentalmente e deve proporcionar uma relação quantitativa confiável entre o teor do marcador determinado na análise e o teor real no material de partida, bem como atender às exigências da instrumentação e da técnica analítica escolhidas. Procedimentos como extração, concentração e diluição ou procedimentos de dessalinização, mistura por agitação, sonicação podem ser adotados para preparação de amostras individuais (FDA, 2015). É importante lembrar que as preparações das amostras devem ser replicadas (no mínimo, triplicatas) para análises quantitativas, devem seguir unidades de concentrações apropriadas (g/mL, mg/mL ou µg/mL), além de considerar a estabilidade das soluções e condições de armazenamento (FDA, 2015).

A seguir, são descritas algumas etapas importantes e comuns a serem consideradas no preparo de amostras:

3.3.1 Extração quantitativa e eficiente do marcador no material de origem

Nessa etapa, a escolha do líquido extrator, do processo de extração e da proporção entre material de partida (amostra) e líquido extrator devem proporcionar eficiência extrativa e manutenção da integridade dos constituintes da amostra (principalmente dos marcadores). Para drogas vegetais pulverizadas, por exemplo, diversos processos extrativos podem ser utilizados e a escolha dependerá dos marcadores que se pretende extrair. Por exemplo, para materiais vegetais ricos em óleos essenciais, a Farmacopeia Brasileira reco-

menda a extração por arraste de vapor, em aparato tipo Clevenger; para materiais ricos em alcaloides, podem ser utilizadas extrações ácido-base; para diversas classes de compostos, são úteis as técnicas a quente, como a extração sob refluxo e a extração em Soxhlet (BRASIL, 2019). Os processos extrativos a quente, além de uma certa complexidade na execução, podem ocasionar perdas e degradações de compostos, envolver solventes orgânicos tóxicos, proporcionar elevado gasto energético. Por isso, atualmente, diversas pesquisas têm buscado desenvolver e otimizar métodos extrativos *eco-friendly*, rápidos, simples e de baixo custo para materiais vegetais, tais como, extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração com fluido supercrítico, entre outras (ASSUNÇÃO *et al.*, 2017; BRASIL, 2019; FERREIRA *et al.*, 2019; LIMA; CONCEIÇÃO; PAULA, 2019; LIMA *et al.*, 2020).

Os processos extrativos mencionados acima, para drogas vegetais, podem ser adaptados para outros bioprodutos intermediários ou finais, considerando as características das matrizes em que se apresentam. Por exemplo, óleos essenciais microencapsulados foram extraídos de suas matrizes utilizando hidrodestilação em aparato de Clevenger (ALVES *et al.*, 2014). Em outros casos, a extração propriamente dita não é necessária, bastando a simples solubilização e diluição do material em solvente adequado, homogeneização com auxílio de um ultrassom, seguido de filtração, caso necessário. A título de exemplo, podem ser citados os preparos de amostras para as análises de teores de marcadores nas diversas tinturas e extratos fluidos descritos na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019).

3.3.2 Concentração do extrato

No caso de amostras de drogas vegetais que passaram pelos processos extrativos descritos no item anterior, pode ser necessária a concentração do extrato obtido, com a retirada total/parcial do solvente. Isso é importante para se determinar o rendimento da extração, bem como para evitar que os solventes utilizados interfi-

ram nas análises quantitativas, espectrofotométricas ou cromatográficas e para concentrar o mesmo. As concentrações podem ser realizadas com auxílio de evaporador rotativo a vácuo em temperaturas não superiores a 40 °C, e, no caso de extratos aquosos, a liofilização deve ser utilizada.

3.3.3 Diluição

A diluição da amostra, seja o extrato concentrado mencionado anteriormente ou o próprio bioproduto (tintura, extrato fluido, extrato seco) deve garantir a total e perfeita solubilização dos marcadores de interesse em uma concentração conhecida. No caso de análises de óleos essenciais em Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), utilizam-se solventes apolares de baixo ponto de ebulição, tais como hexano. No caso de análises em Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE), as amostras devem ser diluídas, preferencialmente, na própria fase móvel do método cromatográfico, seguida de filtração em membranas com poros de 0,45 µm ou 0,22 µm, de forma a garantir que partículas maiores que as da fase estacionária não estejam na amostra. No caso de análises espectrofotométricas de absorção UV-Vis, as amostras devem ser diluídas na solução que será utilizada como branco na análise e também não podem conter partículas suspensas, por isso, é recomendada a centrifugação da amostra diluída antes da análise.

3.4 Estabelecimento das condições analíticas

Durante o desenvolvimento de um método analítico quantitativo, todas as condições analíticas devem ser voltadas ao atendimento de parâmetros que possam ser validados, com o intuito de garantir a adequabilidade do método à finalidade pretendida (FDA, 2015). Tais parâmetros devem incluir: adequabilidade do sistema (*system suitability*), seletividade, linearidade, efeito matriz, intervalo (faixa de trabalho), precisão, exatidão, limites de detecção

(LD), limites de quantificação (LQ) e robustez, que serão discutidos com mais detalhes em outro tópico deste capítulo. A seguir são elencadas algumas orientações úteis para o estabelecimento das condições analíticas:

3.4.1 Busque, na literatura técnico-científica, informações sobre condições analíticas já utilizadas

Para proporcionar quantificações precisas e exatas, o método analítico deve ser seletivo ao marcador escolhido. Portanto, primeiramente, é imperioso realizar um levantamento das publicações técnico-científicas dos métodos já empregados e eficientes na quantificação daqueles marcadores, mesmo que provenientes de materiais vegetais diferentes. O intuito é buscar informações sobre as condições analíticas (desde instrumentação, preparo das amostras, fases móveis, comprimentos de onda de detecção, etc.) que possam ser utilizadas como ponto de partida para a adequação de um novo método ou possam ser simplesmente validadas para a nova matriz, caso cumpram os parâmetros necessários.

3.4.2 Busque, na literatura técnico-científica, informações físico-químicas sobre os marcadores de interesse

As características físico-químicas dos marcadores tais como massa molecular; pontos de fusão e ebulição; coeficiente de partição; solubilidade; polaridade; comprimentos de onda máximos e mínimos de absorção no UV-Vis; comportamento químico em meio aquoso, ácido ou básico – pK_a ; estabilidade frente a mudanças de temperatura e exposição à luz, entre outras, são determinantes na escolha da instrumentação e das condições analíticas. Elas devem ser conhecidas, tanto para a adequação de métodos já existentes quanto, e principalmente, para o desenvolvimento de um

novo método para o qual faltam os parâmetros que possam subsidiar as escolhas.

3.4.3 De posse das informações anteriores, escolha a instrumentação e a técnica analítica

Os instrumentos e técnicas analíticas devem ser escolhidos com base nos propósitos e escopo do método analítico (FDA, 2015). Nas monografias de plantas medicinais e fitoterápicos publicadas pela Organização Mundial da Saúde, que reúne métodos adotados por países que compõem o *Newly Independent States* (NIS) e *Countries of Central and Eastern Europe* (CCEE), técnicas cromatográficas como Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia a Gás (CG), acopladas a sistemas de detecção tais como, Arranjo de Diodos (DAD) e Espectrometria de Massas (EM) são amplamente empregadas (WHO, 2007, 2009). A Farmacopeia Brasileira adota técnicas que incluem as titulométricas, espectrofotométricas de absorção no UV-Vis e cromatográficas (BRASIL, 2019).

Por exemplo, se os marcadores pertencerem à classe dos óleos essenciais, CG e CG-EM são as técnicas de quantificação mais adequadas, já que os constituintes dos óleos essenciais (monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides) possuem baixa massa molecular, são voláteis e resistem a determinadas variações de temperatura (HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017). No entanto, para a quantificação de compostos fenólicos, tais como fenóis simples e heterosídicos, flavonoides e taninos, tanto a espectrofotometria de absorção UV-Vis quanto CLAE-DAD podem ser empregadas (BRASIL, 2019). Esses compostos possuem grupamentos cromóforos em sua estrutura, por isso, absorvem fortemente, nos comprimentos de onda do espectro de luz, nas regiões do ultravioleta ou do visível, condição fundamental para gerar relações quantitativas adequadas entre o marcador e o sistema de detecção do instrumento. Os alcaloides, pelo caráter básico que apresentam e por formarem sais solúveis em meio ácido, podem ser quantificados utilizando técnicas de titulação (BRASIL, 2019). No

entanto, CLAE-DAD com coluna C18 de fase reversa também tem sido empregada na quantificação de alcaloides com excelente desempenho (KLEIN-JÚNIOR; HENRIQUES, 2017), mesmo com a diversidade estrutural dessa classe de metabólitos secundários. Os alcaloides pirrolizidínicos, por exemplo, têm absorção relativamente pequena na região UV e, ainda assim, os acessíveis detectores UV são úteis na quantificação desses compostos (BIAVATTI; PEREDA-MIRANDA, 2017).

3.4.4 *Teste, criteriosamente, as condições do instrumento e da técnica escolhidos que possam influenciar no seu desempenho em quantificar os marcadores*

Se a técnica escolhida para ser testada for espectrofotometria de absorção UV-Vis ou CLAE-DAD, confirme experimentalmente o comprimento de onda (λ) de maior absorção para o marcador de interesse. Utilize para isso, dados do próprio *software* do instrumento de CLAE-DAD, obtidos após eluição da amostra e/ou do padrão analítico (padrão externo), ou um espectrofotômetro de absorção UV-Vis em modo de varredura. A escolha do λ adequado ao marcador de interesse otimizará parâmetros como a seletividade, precisão e exatidão do método analítico.

No caso de técnicas cromatográficas, um amplo conhecimento teórico sobre o tema orientará o desenvolvimento das condições ideais para a quantificação do marcador de interesse. Com base em orientações adaptadas de Lanças (2009, 2016, 2017), consideramos crucial testar os aspectos elencados a seguir:

a) Volume de injeção. O volume máximo de injeção para qualquer coluna é 1% do volume interno da coluna vazia. Para tanto, deve-se conhecer qual é o volume morto (mL ou min), que é o volume de eluição de um pico não retido pela coluna (primeira perturbação da linha de base). Em fase reversa, pode ser determinado também pela injeção de tolueno.

b) Temperatura do forno da coluna. A temperatura do forno da coluna pode afetar sensivelmente os tempos de retenção (TR) dos marcadores em CLAE e é determinante na eficiência de separação de constituintes de uma amostra em CG e em CLAE. De uma forma geral, o aumento da temperatura da coluna facilita a transferência de substâncias da fase estacionária para a fase móvel, reduzindo sensivelmente o tempo de análise, com incremento da eficiência das colunas e da sensibilidade da detecção, resultando em bandas cromatográficas mais estreitas.

c) Possíveis interações dos marcadores de interesse com a fase estacionária. Embora as colunas C18 de fase reversa sejam amplamente utilizadas, com excelentes desempenhos, na quantificação de uma gama de compostos de materiais vegetais por CLAE, é necessário considerar algumas particularidades. Por exemplo, compostos lipossolúveis (apolares) podem ficar muito tempo retidos nestas colunas, prolongando demasiadamente o tempo de análise. Nesse caso, colunas C8 ou C6 deveriam ser testadas. Por outro lado, compostos que tendem a ionizar em meio aquoso não ficarão retidos na coluna, podendo eluir ao mesmo tempo ou próximo do volume morto. Nesse caso, o tamponamento e o controle do pH da fase móvel podem favorecer a prevalência das formas não ionizadas do marcador durante a análise, que são mais bem retidas na coluna (mais detalhes no próximo item).

d) Fase móvel e o modo de eluição (isocrático ou gradiente). Em CG, a fase móvel é única, constituída por um gás inerte, chamado gás de arraste. Nesse caso, a qualidade e a pureza do gás de arraste, bem como a escolha da rampa de temperatura da coluna são cruciais. No entanto, em CLAE, a fase móvel pode ser constituída por uma mistura de solventes, que pode permanecer a mesma ao longo de todo o tempo de eluição cromatográfica (eluição isocrática), ou pode obedecer a um aumento gradativo da força de eluição, por alterações nas proporções entre os constituintes da fase móvel (eluição em gradiente). Eluições isocráticas simplificam o método, mas nem sempre proporcionam as

melhores separações, por isso, esse aspecto deve ser minuciosamente testado na fase de desenvolvimento do método analítico. Uma dica interessante para matrizes vegetais complexas é iniciar pelo modo de eluição gradiente. Após definir a condição do gradiente em que o marcador elui, é possível extrapolar para uma eluição isocrática, dependendo do interesse analítico. Recomenda-se utilizar o Triângulo de Snyder para seleção de solventes para fases móveis (consultar Lanças, 2016). Outro aspecto a ser considerado na escolha da fase móvel é que, se os marcadores de interesse são substâncias altamente ionizáveis (por exemplo, compostos fenólicos, flavonoides, taninos, alcaloides, etc.), tendem a formar picos com caudas pronunciadas e serem pouco retidos em CLAE de fase reversa. Nesse caso, a seletividade da fase móvel e sua força de eluição não serão controladas apenas pela aplicação do Triângulo de Snyder, mas pelo controle do pH e da força iônica do solvente. Esse controle deve favorecer a manutenção da forma não ionizada do composto de interesse, pois essa apresenta maior retenção em fase reversa.

e) Fluxo da fase móvel e tamanho das partículas da fase estacionária. Ambos são aspectos implicados diretamente no tempo de análise e na eficiência da separação em CLAE. Para melhores resultados, eles devem estar adequados ao tipo de instrumentação disponível no laboratório. Têm sido cada vez mais utilizados os equipamentos *Ultra-High Pressure Liquid Chromatography* (U-HPLC), preparados para trabalhar com fases estacionárias de diminutas partículas, que proporcionam reduzido tempo de análise, alta eficiência de separação, porém, requerem altas pressões de trabalho.

Podemos concluir que inúmeras variáveis estão implicadas no desenvolvimento de métodos analíticos. Portanto, seu estudo pode também se beneficiar do uso de planejamentos experimentais fatoriais, que auxiliam na identificação dos fatores que afetam o desempenho do método analítico, direcionando e reduzindo o tempo de desenvolvimento (FDA, 2015). Sobre esse assunto, os leitores são convidados a consultar os Capítulos 14 e 15.

4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE BIOPRODUTOS PARA SAÚDE

Definidos os principais parâmetros do método analítico, durante as etapas de desenvolvimento, o próximo passo é sua validação. A validação do método analítico, conforme a RDC nº 166 de 2017, da ANVISA, é “a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais, de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos” (BRASIL, 2017a). Essa definição e os critérios adotados pela agência reguladora brasileira estão alinhados com os principais órgãos reguladores mundiais, tais como *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), *Food and Drug Administration* (FDA), *United States Pharmacopeia* (USP) e *World Health Organization* (WHO).

Antes de dar início às etapas analíticas, é necessário realizar a verificação do sistema (*system suitability*), um procedimento que visa demonstrar que o sistema (equipamentos, dispositivos eletrônicos, operações analíticas e amostras a serem analisadas) está apto para o uso pretendido e opera de forma integrada (BRASIL, 2017a; FDA, 1996; ICH, 2005; USP, 2008). Os parâmetros de adequação do sistema são definidos nas etapas de desenvolvimento e validação do método analítico e devem ser confirmados antes e durante as análises das amostras. Para sistemas cromatográficos, são mundialmente aceitos os parâmetros para *system suitability*, recomendados pela FDA e USP, nas suas versões atualizadas.

No caso de métodos analíticos não disponíveis em farmacopeias e formulários reconhecidos pela ANVISA, os seguintes parâmetros devem ser validados: seletividade, linearidade, efeito matriz, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

4.1 Seletividade

É a capacidade do método de identificar ou quantificar o(s) marcador(es) de forma inequívoca, em presença de outros componentes da amostra, como impurezas, produtos de degradação, diluentes e componentes da matriz (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2014c; USP, 2008; ICH, 2005). Os procedimentos utilizados para demonstração da seletividade dependerão do objetivo pretendido. A legislação nacional e internacional recomenda a utilização de dois ou mais dos seguintes testes, acompanhados da justificativa pela escolha do(s) mesmo(s): teste de identificação; comparação do perfil cromatográfico da amostra e do padrão; análise dos excipientes; análise dos excipientes adicionados da SQR; comparação entre os perfis espectrais da amostra e da SQR; análise da pureza do pico cromatográfico; análise de impurezas. Informações adicionais sobre cada uma dessas análises podem ser obtidas em Brasil (2014c). Abaixo, são descritos os testes mais corriqueiramente empregados nas análises de seletividade do método analítico:

4.1.1 Teste de identificação

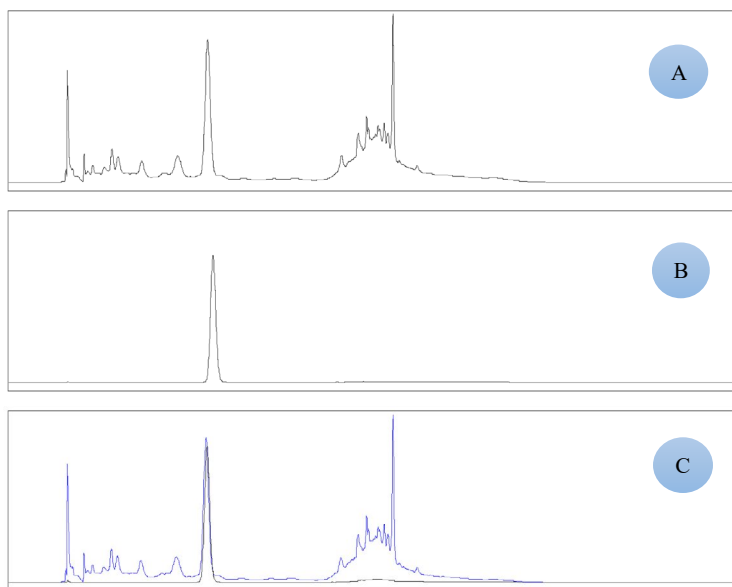
Visa garantir a identidade do(s) marcador(es). Deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos em relação ao padrão de referência em amostras contendo o marcador, juntamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o marcador, mas que tenham substâncias estruturalmente semelhantes (BRASIL, 2014c; FDA, 1996; ICH, 2005; USP, 2008). No caso de drogas e derivados vegetais, bem como MF e PTF, a capacidade do método de distinguir o material de interesse de outras espécies vegetais semelhantes deve ser demonstrada, principalmente para aqueles materiais que possam estar presentes como adulterantes ou substituintes (BRASIL, 2017a).

Ao utilizar procedimentos cromatográficos por meio de CLAE, os perfis cromatográficos devem ser apresentados para demonstrar o grau de seletividade do método (Figura 2).

4.1.2 Testes de pureza

Visam garantir que todos os procedimentos analíticos realizados permitem uma declaração precisa do conteúdo de impurezas (BRASIL, 2017a; ICH, 2005; USP, 2008). No caso de fitoterápicos, quando a identidade de impurezas não é conhecida ou quando não há disponibilidade de substâncias de referências para tal, as amostras devem ser expostas a condições de degradação em ampla faixa de pH e outras condições de estresse, como luz, calor, umidade e oxidação (BRASIL, 2014c).

Figura 2 – Perfil cromatográfico em CLAE de um extrato vegetal (A), da Substância Química de Referência (B) e sobreposição de ambos (C), demonstrando o grau de seletividade do método e a identidade do marcador na amostra



Fonte: Acervo dos autores (2013).

4.1.3 Análise de pureza de pico

As análises de pureza de pico se aplicam aos ensaios cromatográficos e podem se valer das análises espectrais do pico da SQR, em comparação com as análises espectrais da mesma substância na amostra. Para tanto, esses dados podem ser obtidos de cromatógrafos que utilizam detectores com arranjo de diodo (DAD) ou espectrômetros de massas (EM). Nesses casos, são comparados os espectros de UV-Vis ou de massas do marcador de interesse, tanto no padrão de referência como na amostra. A homogeneidade espectral de um pico cromatográfico é indicativa de sua pureza, ou seja, quanto maior a similaridade dos perfis espectrais da SQR e amostras, maior a confiança na identidade dos picos analisados (BRASIL, 2014c; BRASIL, 2017a; USP, 2008). Adicionalmente, cálculos da pureza do pico podem ser realizados por parâmetros adotados e previamente estabelecidos nos *softwares* dos cromatógrafos.

4.2 Linearidade

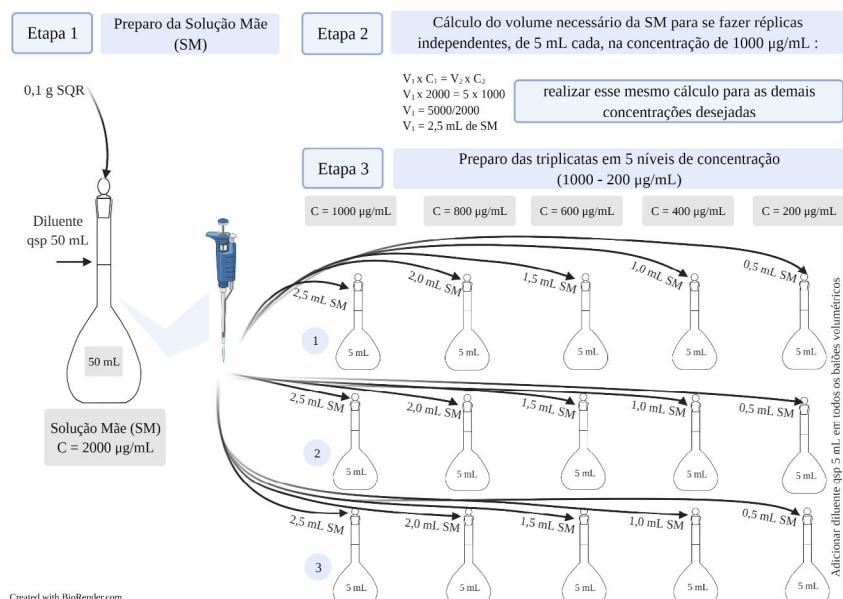
A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de gerar respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um marcador em uma amostra. Para que seja estabelecida a linearidade, devem ser utilizadas, no mínimo, cinco concentrações diferentes da SQR para as soluções preparadas, no mínimo, em triplicata (BRASIL, 2017a; ICH, 2005; USP, 2008; WHO, 2018). Brasil (2014a) e USP (2008) sugerem que as concentrações estejam na faixa de 80-120 % da concentração teórica do teste. As soluções devem ser preparadas de forma independente, no entanto, a agência reguladora brasileira permite que uma mesma solução-mãe seja utilizada para preparar as demais soluções (Figura 3).

Para a comprovação da linearidade do método, devem ser apresentados os seguintes dados estatísticos, conforme as agências reguladoras nacional e internacionais (BRASIL, 2014c; BRASIL, 2017a; FDA, 1996; USP, 2008):

- Gráfico com a representação das respostas (por exemplo, área do pico ou absorvâncias, para métodos cromatográficos e espectrofotométricos, respectivamente), em função da concentração do marcador;
- Gráfico de dispersão dos resíduos, com suas respectivas análises estatísticas;
- Equação da reta de regressão de y em x , estimada pelo método dos mínimos quadrados ordinário ou ponderado;
- Estimativa da relação linear entre as variáveis por meio dos valores dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2);
- Avaliação da significância do coeficiente angular.

As análises estatísticas podem ser realizadas com o auxílio de *softwares* da área, e, no Brasil, há *softwares* especialmente desenvolvidos e adequados aos parâmetros da agência reguladora nacional, disponíveis a preços acessíveis. Ademais, a própria agência reguladora publicou um Guia para Tratamento Estatístico da Validação Analítica (BRASIL, 2017b) para orientar sobre as análises estatísticas necessárias. As análises estatísticas devem adotar o nível mínimo de significância de 5%; devem testar a homocedasticidade dos dados para escolher o método adequado (método dos mínimos quadrados ordinário ou ponderado); o coeficiente de correlação deve ser $\geq 0,990$, sendo que podem ser feitas, adicionalmente, curvas de calibração com a amostra, e nesse caso, o r deverá ser $\geq 0,98$ (BRASIL, 2014a) e o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero.

Figura 3 – Representação das etapas de preparação de 5 (cinco) níveis de concentração de uma Substância Química de Referência (SQR), em triplicata, para a determinação da linearidade



Fonte: Próprios autores (2021). Criado com BioRender.com.

4.3 Efeito Matriz

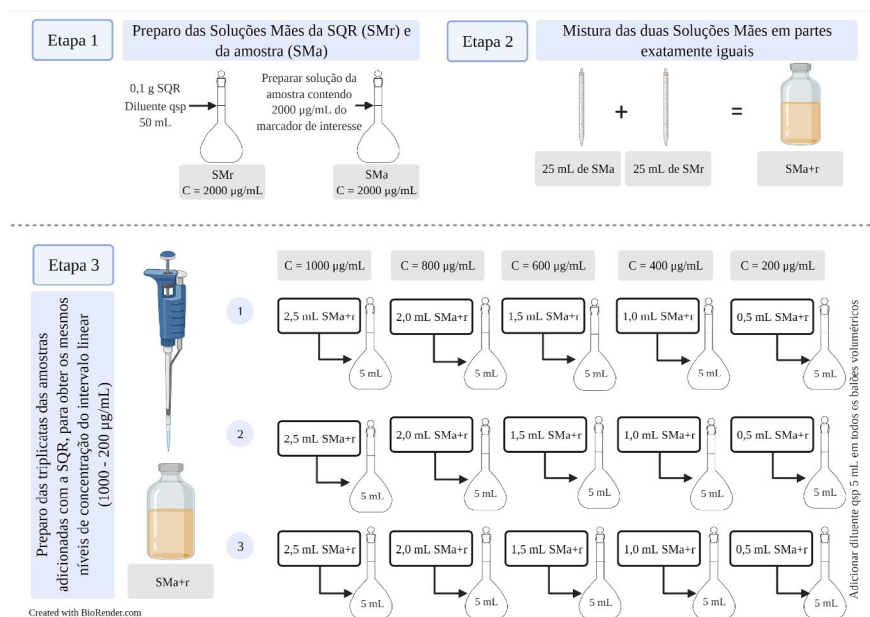
Fitoterápicos são bioprodutos para saúde necessariamente constituídos por matrizes complexas. Tanto na droga vegetal, quanto nos derivados vegetais e nos produtos finais, as substâncias de interesse constituem apenas parte de uma infinidade de outros compostos, que incluem substâncias conhecidas e desconhecidas do próprio vegetal, substâncias adicionadas (adjuvantes) e possíveis produtos de degradação. Para bioprodutos com essas características, a determinação do efeito matriz torna-se de fundamental importância.

A determinação do efeito matriz tem como objetivo demonstrar se os componentes da matriz exercem algum efeito sobre a resposta analítica. Isso é evidenciado pela comparação entre os coeficientes angulares de duas curvas de calibração: uma cons-

truída com soluções da substância química de referência e outra construída com soluções da amostra adicionada com a SQR. A construção de ambas as curvas deve seguir os mesmos parâmetros da linearidade, ou seja, utilizar os mesmos níveis de concentração da linearidade, com no mínimo 5 (cinco) concentrações diferentes, em, no mínimo, triplicata (BRASIL, 2017a). A Figura 4 ilustra a preparação de amostras adicionadas com a SQR. Em alguns trabalhos, a inexistência de efeito matriz é comprovada utilizando duas curvas construídas a partir da própria amostra. Em apenas uma das curvas, as amostras são preparadas com a adição da SQR, em ambas, são mantidos os mesmos níveis de concentração do intervalo linear. Em qualquer situação, o importante é comprovar, estatisticamente, a ausência de efeito matriz.

Para a comprovação estatística da ausência do efeito matriz, ambas as retas devem ser consideradas paralelas e coincidentes, isso acontece quando seus coeficientes angulares (inclinações) não forem estatisticamente diferentes de zero. Para tanto, alguns testes podem ser empregados, tais como teste de t precedido pela comparação das variâncias por meio do teste F. Deve ser adotado o nível de significância de 5% no teste de hipóteses (BRASIL, 2017b).

Figura 4 – Representação das etapas de preparação de amostras adicionadas com a Substância Química de Referência (SQR), de forma a obter os mesmos 5 (cinco) níveis de concentração da linearidade, para a análise do efeito matriz. Ver Figura 3 para detalhes da preparação das SQR da linearidade



Fonte: Próprios autores (2021). Criado com BioRender.com.

4.4 Faixa de trabalho

O intervalo entre os limites de quantificação de um método analítico é determinado verificando se este apresenta precisão, exatidão e linearidade, aplicadas a amostras contendo os marcadores de interesse entre os limites superior e inferior da faixa, utilizando o método proposto. Essa faixa deve abranger a especificação da matéria-prima ou produto e é normalmente expressa nas mesmas unidades que os resultados do teste. Para a determinação de teor, a faixa deve ser de 80% a 120% da concentração esperada do marcador de interesse (BRASIL, 2017a; FDA, 1996; USP, 2008).

4.5 Precisão

A precisão de um método analítico é o grau de concordância (grau de dispersão) entre os resultados de uma série de testes individuais obtidos a partir de amostras preparadas de maneira independente, conforme método a ser validado. Geralmente, a precisão é demonstrada pelo desvio padrão relativo (DPR) de uma série de medições (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2014c; ICH, 2005; USP, 2008), calculado conforme a Equação 1.

$$DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que: DP, desvio padrão; CMD, concentração média determinada nas amostras

Segundo a agência regulatória brasileira, não há um critério de aceitação pré-estabelecido para os valores de DPR. No entanto, eles devem ser definidos e justificados pelos responsáveis pela validação do método. No caso de fitoterápicos, recomenda-se que os valores de DPR não sejam superiores a 15% (BRASIL, 2014c).

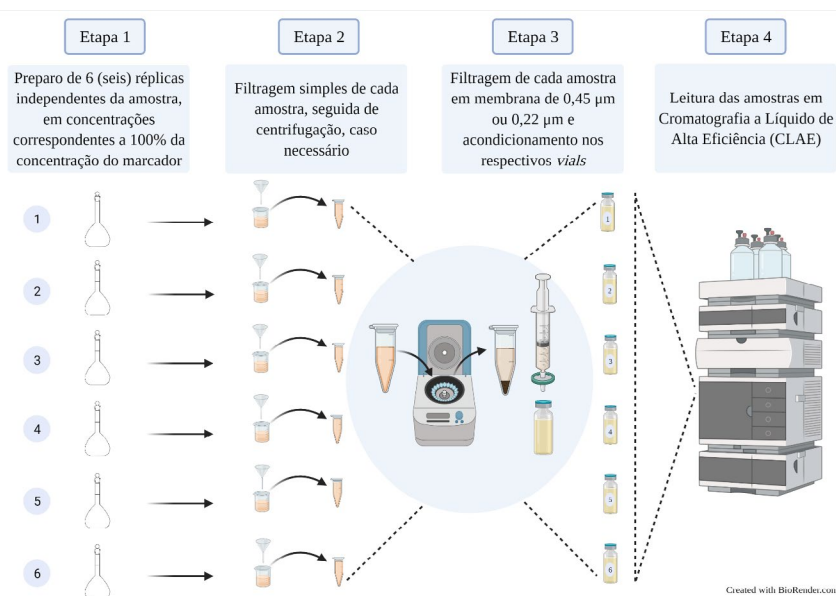
A precisão é uma medida na qual consideram-se três níveis:

- Repetibilidade: Refere-se à utilização do procedimento analítico no mesmo laboratório, com o mesmo analista e os mesmos equipamentos, em condições idênticas de operação. Pode ser determinada de duas formas: por, no mínimo, 9 determinações, sendo três repetições de três níveis de concentrações do intervalo linear (alto, médio e baixo); ou por, no mínimo, seis determinações a 100% da concentração do teste, em amostras individualmente preparadas (Figura 5) (BRASIL 2017a; FDA 1996; USP 2008).
- Precisão intermediária: Expressa a variação dentro do mesmo laboratório para a mesma amostra, em dias dife-

rentes (no mínimo dois), com analistas diferentes (BRASIL 2017a; USP 2008). As análises devem ser realizadas de forma idêntica às da repetibilidade (mesmas concentrações e número de determinações).

- **Reprodutibilidade:** É avaliada por meio de ensaios interlaboratoriais com o intuito de averiguar a proximidade dos resultados para uma mesma amostra obtidos em laboratórios diferentes. É aplicável para estudos colaborativos e quando se pretende inserir o método em farmacopeias ou literaturas oficiais. Para tanto, devem ser aplicados ensaios estatísticos adequados (BRASIL 2017a; FDA 1996; USP 2008).

Figura 5 – Representação das etapas de preparação de 6 (seis) amostras independentes em concentração de 100% do marcador, para determinação do parâmetro precisão por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

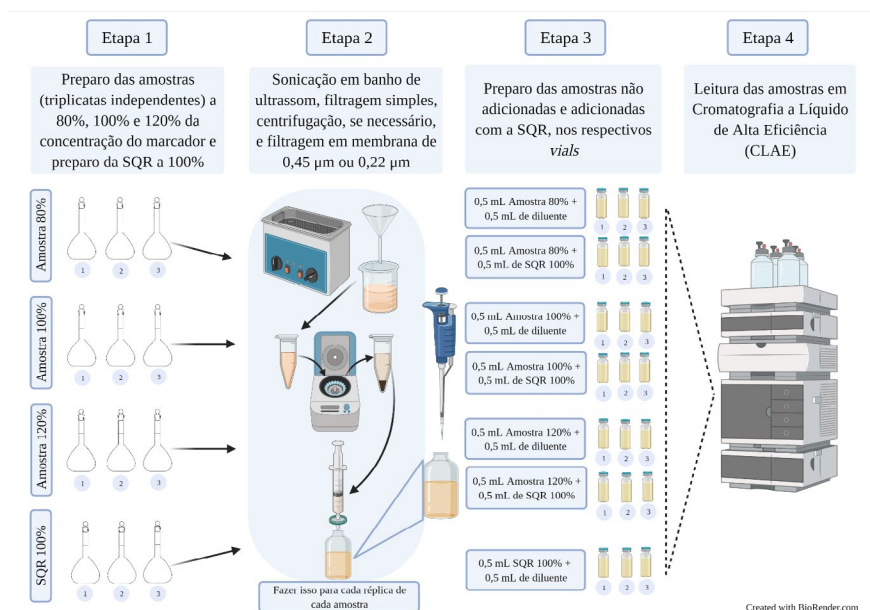


Fonte: Próprios autores (2021). Criado com BioRender.com.

4.6 Exatidão

A exatidão do método analítico é demonstrada pela concordância entre os resultados dos ensaios e os valores de referência aceitos como verdadeiros (BRASIL, 2014c, 2017a). Ela deve ser estabelecida contemplando a faixa linear do procedimento analítico, portanto, após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da seletividade, mencionados nos tópicos anteriores. Para matrizes complexas, como as dos fitoterápicos, deve-se realizar a análise da exatidão pelo método de adição de substância de pureza conhecida (SQR), no qual são acrescentadas às amostras concentrações conhecidas da SQR. Para tanto, devem ser realizadas, no mínimo, nove determinações, considerando o intervalo linear do método, ou seja, em três níveis de concentração (baixa-80%, média-100% e alta-120%), com três réplicas cada uma (BRASIL, 2014c; BRASIL, 2017a; ICH, 2005). Para melhor compreensão, a Figura 6 exemplifica uma dessas preparações.

Figura 6 – Representação das etapas de preparação de amostras adicionadas com a Substância Química de Referência (SQR), para determinação do parâmetro exatidão em Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência, pelo método de recuperação do marcador



Fonte: Próprios autores (2021). Criado com BioRender.com.

A exatidão é expressa pelo percentual de recuperação da SQR de concentração conhecida adicionada à amostra. O percentual de recuperação é obtido pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme Equação 2 (BRASIL, 2017a).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{CA(\text{amostra adicionada}) - CA(\text{amostra})}{CTA} \times 100$$

(Equação 2)

Em que: CA é a concentração experimental do marcador de interesse na amostra e CTA, concentração teórica da SQR adicionada.

4.7 Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) de um método analítico é a menor quantidade da substância de interesse em uma amostra que possa ser detectada nas condições experimentais estabelecidas, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ), por sua vez, é a menor quantidade dessa mesma substância que possa ser determinada, nas condições estabelecidas no método, com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2017a; ICH, 2005).

Dentre as diferentes formas de determinar os LD e LQ, uma das mais simples e aceitas pelas agências reguladoras é a baseada na curva de calibração, com o auxílio das Equações 3 e 4.

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{IC} \quad (\text{Equação 3})$$

$$LQ = \frac{10\sigma}{IC} \quad (\text{Equação 4})$$

Em que: IC é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, três curvas de calibração (BRASIL, 2017a; ICH, 2005). O σ também pode ser obtido de outras formas: a partir do desvio padrão residual da linha de regressão ou a partir da estimativa de ruído, obtida de amostras do branco analisadas em número apropriado (BRASIL, 2017a).

O LQ deve ser validado por meio de análises de um número adequado de amostras que estão próximas ou foram preparadas no limite de quantificação (ICH, 2005).

4.8 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade de permanecer inalterado mesmo com variações pequenas e deliberadas nos parâmetros do método, e fornece uma indicação de sua confiabilidade. Se as medições são suscetíveis de variações nas análises, estas deverão ser adequadamente controladas por uma declaração de precaução incluída no método (BRASIL, 2017a; FDA, 1996; ICH, 2005, USP, 2008).

Os exemplos de variações mais comuns, de acordo com Brasil (2017a) e ICH (2005) são:

- No preparo de amostras: estabilidade de soluções analíticas, tempo de extração.
- No caso de CLAE e de espectrofotometria: influência das variações de pH das soluções e fases móveis, influência das variações na composição da fase móvel, colunas diferentes (diferentes lotes e/ou fornecedores), temperatura e quociente de vazão.
- No caso de cromatografia gasosa: diferentes colunas (diferentes lotes e/ou fornecedores), temperatura e quociente de vazão.

5 REVALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE BIOPRODUTOS PARA SAÚDE

A revalidação, de acordo com Brasil (2017a), é a “repetição parcial ou total da validação de um método analítico para assegurar que esse continua cumprindo com os requisitos estabelecidos”. Conforme WHO (2018), a revalidação de um método analítico deve ser considerada sempre que houver alterações no método, incluindo alterações na fase móvel; mudanças na coluna; mudanças na temperatura da coluna; alterações na concentração/composição da amo-

tra e padrões e mudanças no detector. Também quando houver alterações na composição do produto, na obtenção do insumo farmacêutico ativo ou outras alterações que possam impactar no método validado (BRASIL, 2017a).

Por exemplo, se um derivado vegetal utilizado no produto final tiver sido extraído de uma planta com o mesmo solvente utilizado no método farmacopeico da monografia desta planta e não possua adição de excipientes, a validação do método analítico não é necessária, sendo suficiente a comprovação da sua adequabilidade (*system suitability*) às condições operacionais do laboratório (BRASIL, 2018). Já uma alteração na obtenção do extrato (no processo ou no solvente, por exemplo) ou adição de algum excipiente leva a uma composição diferente do extrato, com consequente alteração na composição do produto final, ensejando uma revalidação do método analítico (BRASIL, 2018).

Os parâmetros a serem revalidados dependerão da natureza das alterações (ICH, 2005). Uma revalidação parcial, normalmente, inclui os parâmetros seletividade, exatidão e precisão (BRASIL, 2014c).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento e a validação de métodos para análise quantitativa de bioprodutos, particularmente, os fitoterápicos, são exigidos para fornecer evidências objetivas e concretas para seu uso em cuidados, recuperação e manutenção da saúde. Diante do contextualizado neste capítulo, fica clara a importância de assegurar a qualidade de bioprodutos, visto serem derivados de recursos biológicos renováveis, que sofrem interferências ambientais e sazonais. Para minimizar as variações na composição química, e, consequentemente, na ação terapêutica a limites eficientes e seguros de marcador (es), é necessária essa avaliação analítica sistemática e criteriosa.

REFERÊNCIAS

ALVES, S.F.; BORGES, L.L.; SANTOS, T.O.; PAULA, J.R.; CONCEIÇÃO, E.C.; BARA, M.T. Microencapsulation of essential oil from fruits of *Pterodon emarginatus* using gum arabic and maltodextrin as wall materials: composition and stability. **Drying Technology**, v. 32, p. 96-105, 2014.

ASSUNÇÃO, P.I.D.; CONCEIÇÃO, E.C.; BORGES, L.L.; PAULA, J.A.M. Development and validation of a HPLC-UV method for the evaluation of ellagic acid in liquid extracts of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves and its ultrasound-assisted extraction optimization. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, e-1501038, 2017.

BIAVATTI, M.W.; PEREDA-MIRANDA, R. Alcaloides pirrolizidínicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 389-402.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Textos Básicos de Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, série B, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 13, de 14 de março de 2013. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2014a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 69, de 08 de dezembro de 2014. Dispõe sobre as boas práticas de Insumos Farmacêuticos ativos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2014b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2014c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Tratamento Estatístico da Validação Analítica. **Guia-Medicamentos**, versão 1, n. 10, p 1-19, 2017b. Disponível em: <https://www.farmaceuticas.com.br/wp-content/uploads/2017/09/Guia-10-v1-Tratamento-estatistico-validacao-analitica.pdf>. Acesso em: 12 mai. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consolidado de normas de registro e notificação de fitoterápicos**. Brasília: ANVISA, 2018. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33836/2501251/Consolidado_fitoterapicos_2018.pdf/a2f53581-43e5-47bb-8731-99d739114e10. Acesso em: 22 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. Monografias Plantas Medicinais. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019. v. 2.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Fitoterápicos**: documento irá orientar prescrição de fitoterápicos no Brasil. Notícias/Anvisa, 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2016/documento-ira-orientar-prescricao-de-fitoterapicos-no-brasil>. Acesso em: 25 abr. 2020.

DESAI, S.; TATKE, P. Phytochemical Marker: classification, application and isolation. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 22, p. 2491-2498, 2019.

EMA. European Medicines Agency. **Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products**. 2011. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-herbal-medicinal-products-traditional-herbal-medicinal-products-revision-2_en.pdf. Acesso em: 23 abr. 2020.

FDA. Food and Drug Administration. **Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics**: guidance for industry. 2015. Disponível em: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2020.

FDA. Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/71725/download>. Acesso em: 24 abr. 2020.

FERREIRA, T.M.S.; SANTOS, J.A.; MODESTO, L.A.; SOUZA, L.S.; SANTOS, M.P.V.; BEZERRA, D.G.; PAULA, J.A.M. An eco-friendly method for extraction and quantification of flavonoids in *Dysphania ambrosioides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 266-270, 2019.

HEALTH CANADA. Quality of Natural Health Products Guide. **Natural and Non-prescription Health Products Directorate**. Version 3.1. 2015. Disponível

em: https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/dhp-mps/alt_formats/pdf/prodnatur/legislation/docs/eq-paq-eng.pdf. Acesso em: 15 jun. 2020.

HEINZMANN, B.M.; SPITZER, V.; SIMÕES, C.M.O. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 167-184.

HONG, B.H.; HOW, B.S.; LAM, H.L. Overview of sustainable biomass supply chain: from concept to modelling. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 18, n. 7, p. 2173-2194, 2016.

ICH. International Conference on Harmonisation. **ICH Harmonised Tripartite Guideline**. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf. Acesso em: 25 abr. 2020.

KLEIN-JÚNIOR, L.C.; HENRIQUES, A.T. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 305-315.

LANÇAS, F.M. Estratégias para diminuição do tempo de análise em Cromatografia Líquida Moderna. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 4, p. 39-47, 2009.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. 2. ed. Campinas: Átomo, 2016.

LANÇAS, F.M. **Fundamentos de Cromatografia Gasosa**. Campinas: Átomo, 2017.

LIMA, A.R.S.; CONCEIÇÃO, E.C.; PAULA, J.A.M. Tecnologias aplicadas ao desenvolvimento de fitoterápicos. In: PAULA, J.A.M.; AMARAL, V.C.S. (Org.). **Ciências da Saúde: saberes e práticas interdisciplinares**. Anápolis: Editora UEG, 2019. p. 59-80. Disponível em: http://www.editora.ueg.br/conteudo/3858_e_books. Acesso em: 01 fev. 2021

LIMA, A.R.S.; LÔBO, L.A.C.; COSTA, T.L.C.; PEIXOTO, J.C.; BORGES, L.L.; AMARAL, V.C.S.; PAULA, J.A.M. Eco-friendly extraction and simultaneous determination of two coumarins in *Justicia pectoralis* (Acanthaceae). **Rodriguésia**, v. 71, e-01132019, 2020. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602020000100719&lng=en&nrm=iso&tln g=en. Acesso em: 8 jun. 2020.

MARKET RESEARCH FUTURE. **Global Herbal Medicine Market**. 2019. Disponível em: <https://www.marketresearchfuture.com/reports/herbal-medicine-market-3250>. Acesso em: 13 jun. 2020.

Capítulo 13

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

THIMMANAGARI, M.; McDONALD, I.; TODD, J. **Introduction to Bioproducts**. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Ontario, 2010. Disponível em: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/10-013w.htm#1>. Acesso em: 20 jun. 2020.

UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION. Validation of Compendial Methods. In: **US Pharmacopeia**. 32th ed. Rockville, 2008. cap. 1225. Disponível em: https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/usp32nf27firstSupplement01.pdf. Acesso em: 31 jan. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Guidelines on Good Manufacturing Practices (GMP) for Herbal Medicines**. Geneva: WHO, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Monographs on Selected Medicinal Plants**. Geneva: WHO, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality Control Methods for Herbal Materials**. Geneva: WHO, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Technical report series**. Geneva, n. 1003, 2017. Disponível em: https://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/publications/trs1003_annex1.pdf?ua=1. Acesso em: 20 abr. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Drug information**. Geneva, v. 32, n. 3, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/medicines/publications/druginformation/en/>. Acesso em: 15 abr. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Global report on traditional and complementary medicine 2019**. Geneva: WHO, 2019. Disponível: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312342>. Acesso em 20 mai. 2020.



Capítulo 14

PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS E TÉCNICAS DE OTIMIZAÇÃO APLICADOS NA OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS PARA SAÚDE – PARTE 1

LEONARDO LUIZ BORGES
DEBBORAH GONÇALVES BEZERRA
JOELMA ABADIA MARCIANO DE PAULA

1 INTRODUÇÃO

A obtenção de bioprodutos de fontes vegetais com potenciais benefícios à saúde, tais como fitoterápicos, alimentos, bioinseticidas, sistemas de liberação de fármacos entre outros, envolve diversas etapas de processamento até o produto final. O êxito na obtenção desses bioprodutos, agregando-lhes qualidade, segurança e sustentabilidade, demanda investimentos intelectuais e financeiros em Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação (PD&I). Muitas das etapas de PD&I de bioprodutos envolvem consumo energético, solventes, adjuvantes, condições físicas e químicas que podem impactar nos custos, rendimento, qualidade, eficiência e sustentabilidade ambiental da produção, sem mencionar os estudos específicos para atestar eficácia e segurança do bioproduto. Por isso, conhecimentos interdisciplinares, emanados das Ciências da Saúde, Exatas e da Terra, e Ambientais são imprescindíveis em todas as etapas.

Na busca de parâmetros adequados de produção e qualidade dos produtos intermediários e finais, nas etapas experimentais e de desenvolvimento de bioprodutos em escala laboratorial, são empre-

gados, muitas vezes, métodos e técnicas que envolvem tentativa e erro. No entanto, essa abordagem pode representar aumento de custo, tempo e consumo de insumos nos processos, aspectos não compatíveis com a forte competitividade e o avanço no surgimento de novas tecnologias. Nesse sentido, os delineamentos experimentais apoiados em ferramentas estatísticas para otimização de processos podem levar a resultados mais promissores.

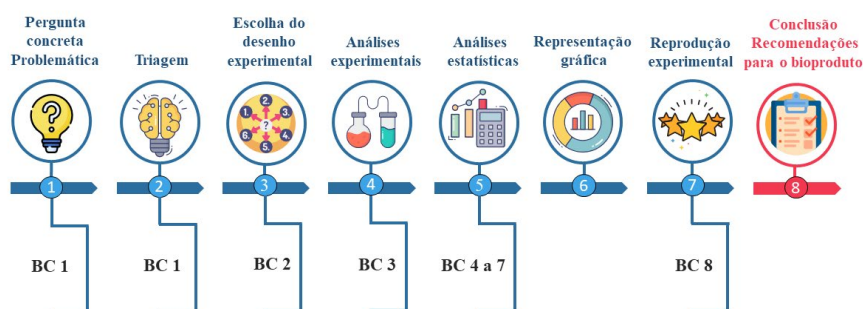
Dentre as vantagens de delinear um experimento, podemos citar a redução de custo e tempo e a maximização das respostas de interesse, como o rendimento, produtividade e qualidade de produtos. O planejamento aumenta sobremaneira as probabilidades de sucesso de um experimento, com análises estatísticas mais ajustadas aos dados obtidos, portanto, mais consistentes e confiáveis (FERREIRA *et al.*, 1999; PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018).

O planejamento de experimentos está acoplado a ferramentas aplicáveis a diversas áreas científicas e tecnológicas, em que modelos matemáticos podem ser utilizados para verificar o comportamento de um sistema de interesse, além de prever melhores condições de respostas investigadas em um experimento (RODRIGUES; LEMMA, 2014; VOLPATO; BARRETO, 2016). Portanto, este capítulo tem como objetivo introduzir fundamentos do planejamento experimental e as principais técnicas utilizadas para otimização de processos, com ênfase na obtenção de bioprodutos para saúde. Para facilitar a compreensão, o capítulo foi organizado em uma sequência de Bases Conceituais, que abrangem os principais fundamentos para a execução de um planejamento experimental.

2 QUAIS SÃO AS PRINCIPAIS ETAPAS DE UM DESIGN EXPERIMENTAL?

A Figura 1 nos mostra o resumo das principais etapas a serem consideradas em um planejamento experimental, com vistas à otimização de um processo.

Figura 1 – Esquema geral das principais etapas do planejamento experimental para o processo de otimização de um bioproduto



Legenda: BC – Base Conceitual

Fonte: Próprios autores (2021) – criado com imagens do freepik.com.

A primeira etapa da Figura 1 consiste no levantamento de uma hipótese e na definição de uma pergunta. A partir disso, na segunda etapa, busca-se levantar quais variáveis do nosso sistema ou unidade experimental poderiam exercer efeito em uma determinada resposta de interesse relacionada a um bioproduto (Base Conceitual 1). Em seguida (terceira etapa da Figura 1), é necessário definir o melhor desenho experimental. De acordo com o número de variáveis independentes (que chamaremos aqui de fatores) e níveis, escolhe-se o *design* experimental. É válido lembrar que, quanto maior o número de fatores e níveis, maior será a quantidade de combinações experimentais e maior a quantidade de experimentos. A Base Conceitual 2 aborda maiores detalhes sobre esse assunto (BERGER; MAURER; CELLI, 2018; RARDIN, 2017; RYAN, 2007; VOLPATO; BARRETO, 2016).

A quarta etapa (Figura1) consiste em realizar os experimentos, conforme orientações contidas na Base Conceitual 3. A quinta consiste em realizar o tratamento estatístico apropriado dos dados e a posterior extração das informações. Existem várias opções de softwares para executar essas análises, como, por exemplo, *Statistica*®, *R*®, *Octave*® e *Design Expert*®. O principal método estatístico utilizado para a análise dos dados em desenhos experimentais é a análise de variância (ANOVA), que aborda se, de acordo com as mudanças dos níveis das variáveis, existe algum efeito gerado sobre a nossa resposta de interesse referente ao bioproduto. A consulta às Bases Conceituais 4 a 7 pode esclarecer melhor ao leitor (BERGER; MAURER; CELLI, 2018; RARDIN, 2017; RYAN, 2007; VOLPATO; BARRETO, 2016).

Após o tratamento estatístico, chegamos à sexta etapa (Figura1), que consiste na obtenção dos modelos e, a partir destes, as representações gráficas.

Os modelos constituem funções de determinada variável resposta (y) em função de uma ou mais variáveis independentes (x), que podem ser descritas genericamente por $y=f(x)$. Se tivermos duas variáveis independentes (x_1 e x_2), podemos obter um modelo linear, como: $y=b_0+b_1x_1+b_2x_2$. Entretanto, as variáveis x_1 e x_2 podem interagir e, caso isso ocorra, obteríamos um modelo: $y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_{12}x_1x_2$, com uma interação de segunda ordem (x_1x_2). Essa interação poderia ocorrer, por exemplo, entre o pH e o nível de agitação de um sistema para a obtenção de um bioproduto. Caso esse efeito (x_1x_2) seja significativo, os fatores são capazes de interagir entre si, ou seja, não podemos olhar suas variações de forma totalmente independente. Quando desejamos um ponto ótimo (máximo ou mínimo), precisamos obter modelos quadráticos, no exemplo com duas variáveis seria: $y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_{12}x_1x_2+b_{11}x_1^2+b_{22}x_2^2+b_{12}x_1x_2$. Devemos salientar aqui que os modelos quadráticos são possíveis apenas quando trabalhamos com 3 níveis ou mais para cada variável (exemplo: pH 2, 5 e 8; agitação 50, 100 e 150 rpm).

Após a obtenção do modelo mais ajustado, as construções gráficas tornam-se possíveis. Lembre-se que a partir de uma simples função $y=f(x)$ podemos plotar um gráfico em um plano cartesiano. Em uma situação de mais de um fator (x_1 e x_2), precisamos acrescentar uma terceira dimensão para a construção de um gráfico que avalie simultaneamente a resposta y em função das variáveis x_1 e x_2 (LUNDSTEDT *et al.*, 1998). Os gráficos expressam o fenômeno em estudo de maneira simples, rápida e clara, permitindo a visualização objetiva das melhores condições (também chamadas de condições ótimas) sugeridas pelo modelo.

O modelo quadrático é capaz de gerar uma condição ótima (máximo ou mínimo), entretanto, como realmente confiar se este ponto ótimo irá funcionar na prática? Para confirmar o ponto ótimo, devemos proceder ao ensaio de verificação (sétima etapa da Figura 1), que consiste em reproduzir na prática as condições sugeridas pelo modelo e confrontar o resultado experimental com o valor predito, quanto mais próximos, mais confiável foi o modelo construído (confira a Base Conceitual 8).

A oitava etapa (Figura 1) consiste em compilar as conclusões finais do experimento e proceder às tomadas de decisões em relação ao processo. Ou seja, é necessário responder as perguntas: 1ª – Que condições serão adotadas a partir de agora para a obtenção de bioprodutos com características desejáveis maximizadas? 2ª – Um *design* experimental foi o suficiente para responder às melhorias desejáveis ao bioproduto? 3ª – As melhorias da qualidade ou da obtenção do produto são viáveis economicamente e são sustentáveis? É importante salientar que a viabilidade econômica envolve o escalonamento do processo (*scaling-up*) que seria a extrapolação das melhores condições experimentais em escalas maiores (escalas piloto e industrial), para verificar se a produção em larga escala do bioproduto investigado seguiria as mesmas condições investigadas inicialmente (BERGER; MAURER; CELLI, 2018; RARDIN, 2017; RYAN, 2007; VOLPATO; BARRETO, 2016).

São apresentadas a seguir as principais Bases Conceituais envolvidas nessas etapas.

2.1 Base Conceitual 1 – Variáveis, Fatores e Níveis

Variáveis são atributos que podem ser obtidos de determinada unidade experimental, podem ser numéricas (quantitativas) ou não numéricas (qualitativas). Existem também as variáveis ordinais, quando expressam um ordenamento natural de um certo sistema estudado. É importante fazer a separação de variáveis independentes (explanatórias) e dependentes (resposta). Estas têm uma relação de causa (variável independente) e consequência (variável dependente). Uma variável independente representa uma grandeza que pode ser controlada em um planejamento dentro de valores (níveis) pré-determinados. Uma variável dependente representa uma grandeza que seu valor depende de como a variável independente se comporta ou reage (consiste no parâmetro que desejamos otimizar). Quando estamos lidando com processos, nossas variáveis independentes passam a se chamar fatores, que podem ser utilizados para a investigação sobre respostas de interesse (variáveis dependentes) (Quadro 1) (CATEN; RIBEIRO, 1996; LUNDSTEDT *et al.*, 1998; VOLPATO; BARRETO, 2016).

Quadro 1 – Classificação das variáveis e exemplos

Variáveis	Tipos	Descrição	Exemplos
<i>Qualitativas (atribuem qualidade)</i>	Nominal	Definem um significado ou categoria	Tipo de excipiente em uma formulação
	Ordinal	Permitem uma ordem ou sequência	Satisfação do consumidor em relação a um produto (ruim, bom, excelente)
<i>Quantitativas (registros numéricos)</i>	Contínua	São números naturais (inteiros ou frações)	Massa, temperatura
	Discreta	São números inteiros	Número de rotações (rpm)

Fonte: Próprios autores (2021).

Quais variáveis de um processo serão utilizadas pelo pesquisador? Nessa etapa, é importante que o experimentador faça os chamados ensaios de triagem (*screening experiments*), que seria realizar experimentos preliminares para verificar que variáveis são mais relevantes para serem incluídas no modelo a ser construído. Outra forma de escolher as variáveis mais apropriadas pode ser feita a partir de um levantamento de dados da literatura que apon-tem evidências dos fatores mais prováveis de apresentarem associa-ção com respostas de interesse (CATEN; RIBEIRO, 1996; LUNDSTEDT *et al.*, 1998).

Além das variáveis que conseguimos manipular experimen-talmente, existem outras variáveis “invisíveis”, que podem influen-ciar no processo e que não podemos controlar, chamadas de estocásticas. Quanto mais padronizadas as condições que são reali-zadas, os experimentos (temperatura, umidade relativa, flutuações na corrente elétrica do laboratório, etc.) menores serão os impactos

das variáveis estocásticas (BERGER; MAURER; CELLI, 2018; CATEN; RIBEIRO, 1996; VOLPATO; BARRETO, 2016).

De acordo com a experiência e estudos prévios do pesquisador, são determinados quais os valores das variáveis (níveis dos fatores) serão fixados para executar os experimentos do planejamento estabelecido. A partir das combinações dos níveis de cada fator incluído no planejamento, o pesquisador determina os resultados da variável resposta, para depois proceder ao tratamento estatístico (BERGER; MAURER; CELLI, 2018; CATEN; RIBEIRO, 1996; VOLPATO; BARRETO, 2016).

Quando um estudo envolve apenas dois níveis, podemos deduzir que apenas modelos lineares serão possíveis de serem obtidos (com apenas 2 níveis não há a possibilidade de predizer uma parábola ou outro tipo de curva entre estes dois pontos). Em planejamentos fatorais, é comum a codificação dos níveis empregados para as variáveis (+1 para o maior nível e -1 para o menor nível). Essa transformação das variáveis possui importância para a padronização das diferentes escalas dos fatores investigados. Em planejamentos em três níveis, quando se tem a adição de um ponto central, estes são denotados por baixo (-1), médio (0) e alto (+1). Os tratamentos são as combinações de fatores e níveis atribuídas a um experimento (BERGER; MAURER; CELLI, 2018; CATEN; RIBEIRO, 1996; MINITAB, 2021; PORTAL ACTION, 2021).

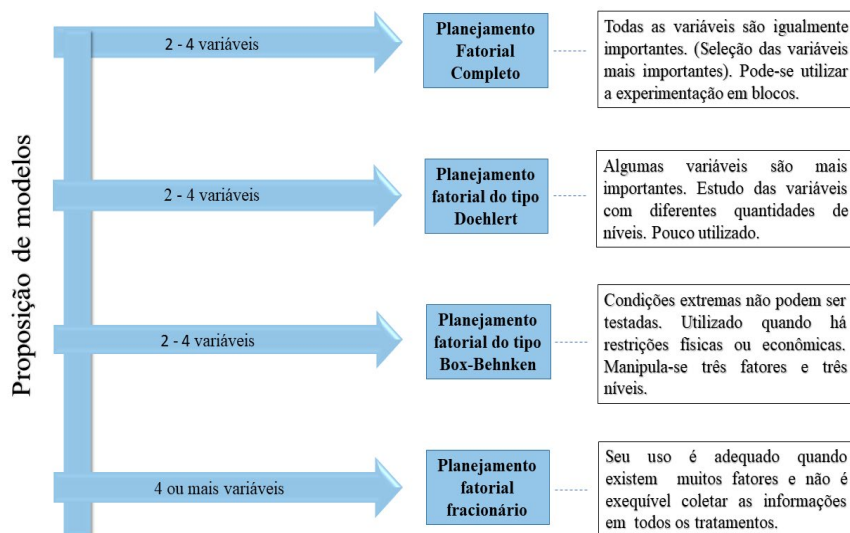
A utilização de bom senso em todas as etapas do planejamento experimental é necessária. A estatística sugere a existência ou não de associação entre as variáveis, entretanto, não nos permite construir modelos mecanísticos. Os modelos estatísticos nos permitem empiricamente realizar previsões de condições ótimas de um processo (PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018; TEÓFILO; FERREIRA, 2006; VOLPATO; BARRETO, 2016).

2.2 Base Conceitual 2 – Lógica Científica para Desenhos Experimentais

A estatística é uma ferramenta que permite planejar estudos, embasar decisões e conclusões, além de descrever fatos ou fenômenos e testar hipóteses. Ela caracteriza um conjunto de dados, seja por meio de determinação de média, mediana e desvios ou por outras variações dos dados. Por exemplo, as análises de correlação têm como lógica determinar o nível de associação entre dois ou mais conjuntos de dados pareados, mostrando se a variação no valor de uma variável está associada a alguma variação proporcional no valor de outra, ou se não existe qualquer relação entre as variações dessas variáveis. É possível testar, portanto, relações bidimensionais (apenas duas variáveis) ou multidimensionais (mais de duas variáveis). Por isso, é necessário definir quantas variáveis pretendemos associar ao mesmo tempo. Estuda-se, aqui, se o comportamento de uma variável tem relação com o comportamento da outra (lembre-se de que isso não significa que uma variável necessariamente interfira na outra) (BERGER; MAURER; CELLI, 2018; LUNDSTEDT *et al.*, 1998; PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018; TEÓFILO; FERREIRA, 2006; VOLPATO; BARRETO, 2016).

Planejamentos fatoriais com 2 níveis constituem ótimas alternativas para a realização de estudos de triagem, pois nos permitem, com um número reduzido de experimentos obter informações sobre possíveis efeitos de fatores sobre respostas desejadas (Figura 2).

Figura 2 – Orientações gerais para escolha de um modelo experimental



Fonte: Próprios autores (2021).

A partir de n fatores investigados em 2 níveis, o desenho fatorial apresentará 2^n experimentos (Tabela 1). Voltando ao exemplo do começo deste capítulo, em que um pesquisador deseja investigar os efeitos do pH e agitação em uma reação em que se obterá um bioproduto, caso o desenho experimental seja planejado com 2 níveis para cada fator, teremos um total de 4 experimentos.

Talvez o pesquisador queira incorporar um terceiro fator com 2 níveis para tentar melhorar o rendimento de um bioproduto, como a temperatura. Assim, teríamos um total de $2 \times 2 \times 2 = 2^3$ experimentos, com todas as combinações possíveis, portanto, um **planejamento fatorial completo** (Figura 2). Com a incorporação de mais fatores, o nível de experimentos aumenta em progressão geométrica (LUNDSTEDT *et al.*, 1998; PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Tabela 1 – Desenhos fatoriais com 2 e 3 variáveis

2 variáveis			3 variáveis			
Variáveis			Variáveis			
Experimento	$x1$	$x2$	Experimento	$x1$	$x2$	$x3$
1	-	-	1	-	-	-
2	+	-	2	+	-	-
3	-	+	3	-	+	-
4	+	+	4	+	+	-
			5	-	-	+
			6	+	-	+
			7	-	+	+
			8	+	+	+

Legenda: o sinal - corresponde ao menor nível de uma variável e o sinal + ao maior nível.

Imagine que o pesquisador tenha interesse em investigar 7 fatores sobre o rendimento na obtenção de seu bioproduto, ele simplesmente teria que conduzir $2^7=128$ experimentos! Talvez essa quantidade seja inviável devido a tempo, custo e logística em uso de equipamentos. Dentro desse contexto, existe uma alternativa capaz de reduzir a quantidade de experimentos e manter o nível de informação extraída satisfatório para apontar que fatores podem apresentar efeito sobre o rendimento do bioproduto. Essa alternativa consiste em fazer uma fração do total de combinações possíveis, o que chamamos de **planejamento fatorial fracionário** (Figura 2). Ao invés de fazer 8 experimentos com 3 fatores em 2 níveis (2^3), podemos realizar a metade desses experimentos ($2^3/2=2^{3-1}$), conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Desenho fatorial fracionário com 3 fatores e 2 níveis

3 variáveis			
	Variáveis		
Experimento	$x1$	$x2$	$x3$
1	–	–	+
2	+	–	–
3	–	+	–
4	+	+	+

Legenda: o sinal – corresponde ao menor nível de uma variável e o sinal + ao maior nível.

Quando o estudo apresenta a possibilidade de investigar diversas variáveis, mesmo com planejamentos fracionários do tipo 2^{n-1} , podem resultar em um número inviável de experimentos. Algumas modalidades de planejamentos fatoriais conseguem combinar desenhos com um grande número de variáveis e um número reduzido de experimentos, como é o caso do planejamento *Plackett Burman*. Esse planejamento apresenta alta eficiência no processo de *screening* de fatores significantes, entretanto não é adequado para identificar interações entre os fatores investigados, um preço pago devido ao número reduzido de experimentos (DOPICO-GARCIA *et al.*, 2007; ENGSTROM; CARLSSON-KANYAMA, 2004; TEÓFILO; FERREIRA, 2006; UNGUREANU *et al.*, 2015). Para maiores informações sobre os diversos tipos de planejamentos experimentais (simples e fatoriais) mencionados acima, os leitores são convidados a consultar o Capítulo 15.

Em planejamentos fatoriais completos ou fracionários pode-se realizar a análise de dados pareados ou em blocos de experimentação. O que seria um bloco? Seria uma condição específica na qual uma parcela dos experimentos é realizada. De um total de 16 experimentos, poderíamos fazer metade utilizando um reagente de um lote A e a outra metade de um lote B e isso poderia ser incluído no modelo, sendo possível a verificação se a mudança de lote desse

reagente não acarretaria um efeito significativo nas respostas obtidas. A bloqueio seria interessante. Outro exemplo seria, ao invés de fazer os experimentos em um só equipamento, utilizar outros equipamentos disponíveis ou diferentes operadores realizam blocos de experimentação. Nesse caso, os experimentos dos dois níveis são realizados em cada equipamento e de forma aleatória. Espera-se que os equipamentos diferentes não gerem efeito sobre a resposta, assim como a diferença de lotes de reagentes, entretanto, no cenário prático, muitas vezes o pesquisador precisa incluir essas condições para elucidar possíveis variações que não são causadas apenas pelos fatores selecionados (LUNDSTEDT *et al.*, 1998; PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Após a escolha do melhor modelo, enumere todas as combinações entre níveis dos fatores de 1 a n e inclua as réplicas. Gere uma sequência de números aleatórios usando um *software* e conduza os experimentos seguindo a sequência aleatorizada. Não realizar a aleatorização é uma quebra da confiabilidade experimental. Ela é imprescindível, pois ajuda a evitar erros incomuns ou diminuir os efeitos de fatores não-controláveis e é uma garantia que o experimentador execute todos os experimentos com o mesmo rigor (LUNDSTEDT *et al.*, 1998; PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Suponhamos que trabalhem com a secagem por atomização (*spray drying*) de um bioproduto. É possível controlar fatores como tamanho do bico de aspersão do atomizador, temperatura de entrada, velocidade do fluxo de alimentação do bioproduto, além de outros fatores. Porém, não se pode controlar umidade do ar de entrada e temperatura de saída que podem afetar o rendimento de secagem. Aleatorizar a ordem dos ensaios reduz a possibilidade de que as diferenças nas condições experimentais distorçam os resultados.

2.3 Base Conceitual 3 – Cuidados necessários durante a execução dos experimentos

Inicialmente, é necessário garantir que as condições experimentais sejam o mais homogêneas possível ou controladas, manipulando apenas os fatores selecionados. A aleatorização da sequência dos experimentos pode reduzir os impactos das condições que não possam ser controladas. A casualização garante que o experimentador não tenha “privilegiado” alguns tratamentos em detrimento de outros, portanto, garante que todos os experimentos foram realizados sem tendenciosidade, condição importante nos desenhos fatoriais, que, devido ao número reduzido de ensaios, não conta muitas vezes com **réplicas genuínas** de seus tratamentos. Uma **réplica genuína** seria uma repetição da condição experimental realizada exatamente da mesma forma que a anterior, seguindo rigorosamente as mesmas etapas. Nem sempre é possível executar replicatas de todos os experimentos de um desenho fatorial e a alternativa para esse problema consiste na utilização de **pontos centrais** (EASTERLING, 2015; SHORE, 2005).

Pontos centrais são réplicas dos níveis centrais de cada fator incluído no desenho fatorial. Essas repetições permitem estimar o erro experimental sem um grande aumento no número total de ensaios. Para não correr o risco do pesquisador “privilegiar” os ensaios dos pontos centrais em detrimento das outras combinações, a aleatorização mostra-se essencial (EASTERLING, 2015; SHORE, 2005).

A Tabela 3 traz um planejamento fatorial 2^3 com 3 pontos centrais, portanto, com 11 experimentos (8+3). Suponhamos que a variável x_i seja o pH de uma reação. Poderíamos ter os níveis pH=2 e pH=6, por exemplo, e o valor central (nível 0) seria o ponto médio entre esses dois níveis, ou seja, seria o valor de pH=4. O mesmo raciocínio se aplica aos outros fatores e a combinação dos níveis centrais de todos os fatores trata-se de um ponto central. Ao realizarmos replicatas desses pontos

de maneira aleatorizada, é possível estimar o erro do experimento com uma quantidade reduzida de experimentos.

Tabela 3 – Desenho fatorial fracionário com 3 fatores, 2 níveis e 3 pontos centrais

Experimento	Variáveis		
	$x1$	$x2$	$x3$
1	–	–	–
2	+	–	–
3	–	+	–
4	+	+	–
5	–	–	+
6	+	–	+
7	–	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Legenda: o sinal – corresponde ao menor nível de uma variável e o sinal + ao maior nível.

Caso seja possível realizar replicatas de todos os ensaios, também é uma opção para estimar o erro experimental. Entretanto, lembre-se de que replicatas genuínas de todos os ensaios de um desenho fatorial aumentaria sobremaneira o número de experimentos, o que, talvez, poderia inviabilizar todo o processo (EASTERLING, 2015; SHORE, 2005).

2.4 Base Conceitual 4 – Intervalo de confiança

O conceito de intervalo de confiança (IC) é importante ser lembrado para auxiliar no entendimento sobre o erro embutido na

inferência dos resultados experimentais. A estimativa de um intervalo contém um parâmetro populacional. A reflexão sobre esse conceito é de grande importância, porque, normalmente, não conseguimos determinar os parâmetros populacionais. O que fazemos então? Trabalhamos com amostras e realizamos estimativas a partir destas, dentro de um determinado nível ou faixa de certeza. Quando determinado desenho experimental é feito, realiza-se a determinação de valores de uma amostra dentro de uma população infinita de dados e os valores de α consistem basicamente na probabilidade das nossas inferências darem errado (MAXWELL; DELANEY; KELLEY, 2017; VOLPATO; BARRETO, 2016).

O exemplo a seguir, embora não ilustre a obtenção de um bioproduto para saúde, é útil para relembrar ao leitor esses conceitos fundamentais. Suponhamos que se deseja determinar a altura de todos os indivíduos do sexo masculino que residem no estado de Goiás, entretanto, isso levaria tempo, imprecisões e, provavelmente, não seria possível acessar toda essa população. Assim, poderíamos determinar uma altura para os indivíduos de uma amostra de 1,75 m (média amostral; $\bar{x}$). Mas faça-se a pergunta: essa altura é a mesma para todos os jovens contidos nessa população (média populacional; μ)? A resposta é não, pois não conseguimos levantar os dados de todos os indivíduos de nosso interesse. Assim, podemos determinar, dentro de um certo nível de probabilidade, qual seria a faixa de altura que estaria a média populacional. Poderíamos dizer que, dentro de um intervalo de confiança de 95%, a altura populacional está entre 1,65 m e 1,85 m. Talvez, jamais conseguiríamos determinar a altura real desse grupo de indivíduos, mas conseguimos determinar a probabilidade do valor populacional pertencente a determinada faixa. A probabilidade de μ não estar na faixa de 1,65 m a 1,75 m é de 5% e esse valor é conhecido como α , que pode ser pré-fixado pelo pesquisador (MAXWELL; DELANEY; KELLEY, 2017; VOLPATO; BARRETO, 2016).

Obviamente, valores mais baixos de α representam maior esforço do pesquisador, ou seja, maiores valores de n (tamanho amostral). Na faixa de distribuição do IC, o nível em que poderíamos errar essa projeção, por exemplo, é se escolhermos $\alpha = 0,05$ ou 5%. Logo, teríamos IC=95%. Assim, se os valores comparados estiverem dentro dessa faixa, teremos que assumir que são iguais ao grupo de valores que originou o IC. O IC é importante para mostrar a confiabilidade de uma estimativa. Uma pesquisa que resulte num IC pequeno é mais confiável do que uma que resulte num IC maior. Para obtermos um IC mais confiável, podemos aumentar o n amostral, no entanto, isso implica no aumento de custos do projeto (MAXWELL; DELANEY; KELLEY, 2017; VOLPATO; BARRETO, 2016).

2.5 Base Conceitual 5 – Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Hipóteses

Quando duas ou mais variáveis independentes forem estudadas simultaneamente, é possível identificar a ação de cada uma delas sobre a variável dependente, bem como possíveis interações entre as variáveis independentes enquanto agem sobre a dependente. Uma das grandes vantagens da combinação dos diferentes níveis dos fatores consiste na verificação da possibilidade de interação entre as variáveis independentes. Assim, os testes estatísticos paramétricos que comparam efeito de duas ou mais variáveis sobre a variável dependente testam essas possibilidades separadamente (BARKER, 2016; VOLPATO; BARRETO, 2016).

O teste de hipóteses pode ser conduzido por diferentes ferramentas estatísticas, como a ANOVA. Mas quais hipóteses exatamente são testadas no contexto de um planejamento experimental? Podemos dizer que, no contexto de um experimento, testar hipóteses seria assumir duas possibilidades: 1ª – Hipótese nula (H_0), que assume que não há diferença significativa entre as médias dos tratamentos envolvidos, ou seja, as médias são iguais. Nesse caso, assume-se que as variações observadas são aleatórias e nenhum efeito

investigado é relevante ou que existe uma diferença nas flutuações quantitativas encontradas com relação ao que se esperaria se essas variações fossem aleatórias. 2ª – Hipótese alternativa (H_1), que assume que há diferença significativa entre as médias dos tratamentos ou grupos envolvidos. Por exemplo, ao assumirmos que a temperatura exerce efeito significativo positivo sobre o rendimento de uma reação, estamos rejeitando H_0 e aceitando H_1 . A probabilidade de essa decisão estar errada ao extrapolarmos essa conclusão corresponde ao valor de p . Em outras palavras, o valor de p representa a probabilidade ou chance do efeito (ou da diferença) observada entre os tratamentos ser decorrente do acaso e não dos fatores estudados (BARKER, 2016; VOLPATO; BARRETO, 2016).

2.6 Base Conceitual 6 – Tipos de erros

Há erros que são evitáveis (grosseiros e sistemáticos) ou erros que fogem do controle do pesquisador (aleatórios). O somatório de todos os erros nas etapas do processo gera o erro global do experimento. Se forem muito influentes podem aumentar o erro experimental a ponto de atrapalhar na avaliação da significância dos fatores controláveis, levando a desvios no resultado.

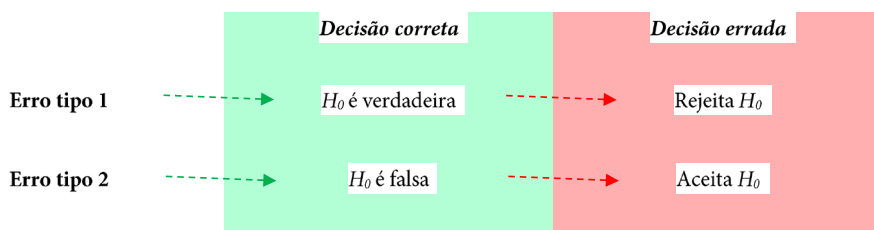
Podemos exemplificar o **erro grosseiro** como a imperícia do pesquisador, que poderia resultar em pesagem ou pipetagem incorretas. O erro grosseiro é evitável na medida que o experimentador treina minimamente as noções de boas práticas de laboratório antes de conduzir um planejamento experimental. O **erro sistemático** ocorre, normalmente, quando alguma etapa do processo está enviesada e, dessa forma, esse erro se reflete na mesma intensidade para todos os experimentos. Poderíamos citar, aqui, uma balança ou algum equipamento de leitura analítica descalibrados, pois a balança ou o outro equipamento iriam afetar sempre para “mais” ou para “menos” todos os resultados experimentais. O **erro aleatório** ocorre mesmo que consigamos neutralizar ao máximo os erros grosseiro e sistemático. O erro aleatório acompanha o pesquisador

e seria um somatório dos efeitos das variáveis “invisíveis” que não conseguimos controlar. Mesmo que o pesquisador faça repetições de um experimento, seguindo rigorosamente as mesmas etapas, procurando ser o mais repetitivo possível, normalmente, pequenas flutuações entre os resultados serão observadas. Esse seria o **erro aleatório** (CATEN; RIBEIRO, 1996).

Mesmo com o máximo de rigor técnico e científico, ao extrapolarmos os resultados de um planejamento experimental, os valores esperados pelo modelo estatístico podem não funcionar na prática. Precisamos, portanto, comentar aqui sobre o **teste de hipóteses**.

Quando o teste de hipóteses é realizado, busca-se decidir entre aceitar ou rejeitar uma hipótese. Normalmente, por uma questão de padronização, a aceitação e a rejeição são referentes à hipótese nula – H_0 . Há chances de erro na escolha de aceitar a hipótese. Estatisticamente, há dois tipos de erros. O primeiro erro é chamado de erro tipo I (erro α) e o segundo, tipo II (erro β) (Figura 3).

Figura 3 – Fluxograma que mostra os tipos de erro que o experimentador pode cometer nas suas decisões sobre as hipóteses



H_0 = Hipótese nula

Fonte: Próprios autores (2021).

Por exemplo, um pesquisador tem como objetivo conferir a eficácia de um medicamento pela avaliação de dois tratamentos, grupo tratamento e controle (placebo). Nesse caso, a H_0 é que a resposta do grupo tratamento é semelhante ou igual ao grupo-controle; e H_1 é que a resposta do grupo tratamento é significativamente diferente do grupo-controle. Pode ocorrer o erro do tipo I, se

o avaliador rejeitar a hipótese nula, quando ele precisaria, na verdade, tê-la aceitado como verdadeira. Esse erro coloca em risco a vida, caso o medicamento não seja eficaz e seja distribuído para o público, acreditando que seja eficaz, já que sua resposta foi semelhante ao placebo. Já o erro do tipo II pode ocorrer caso o pesquisador não rejeite a hipótese nula, H_0 , quando, na verdade, ele deveria tê-la rejeitado. Assim, ele assumiria que o medicamento não é estatisticamente diferente do placebo, sendo que, na realidade, é diferente (MINITAB, 2021).

Devemos admitir que há possibilidade de ocorrer os erros do tipo I e II quando estamos trabalhando com a otimização de processos para a obtenção de bioprodutos aplicados à saúde. Por exemplo, podemos assumir que existe um efeito positivo da temperatura sobre o rendimento na extração de determinado marcador de uma planta medicinal. Nesse caso, a H_0 é que o aumento da temperatura não altera as médias dos teores do marcador nas extrações, quer dizer que elas são semelhantes nos diferentes níveis de temperaturas testados e H_1 é que o aumento da temperatura altera significativamente os teores médios de marcadores nas extrações, quer dizer que as médias entre os grupos (níveis de temperaturas) são diferentes. Pode acontecer que os solutos de um determinado grupo exerçam alterações de pH no meio extrativo, não controláveis pelo pesquisador e que possam interferir na extração do marcador. Assim, se a alteração do pH for favorável à extração do marcador para esse determinado grupo e a temperatura não exercer efeito, as médias entre os grupos seriam estatisticamente diferentes. Teríamos, portanto, um erro do tipo I. Em uma outra situação, pode acontecer que o efeito da temperatura sobre a extração de marcadores não seja evidenciado pelo simples fato do meio extrativo apresentar-se saturado pelo marcador, resultando em teores médios de marcadores, entre os grupos, estatisticamente iguais. Teríamos, portanto, um erro do tipo II.

Se tentarmos reduzir um erro, podemos aumentar a chance de outro erro ocorrer. A decisão sobre nossos riscos deve ser amparada pelo conhecimento estatístico, sem dispensar o bom senso. Lembremo-nos de que a possibilidade de ocorrer erros ao fazermos inferências é algo intrínseco à ciência. Extrapolar resultados a partir de amostras e as observações experimentais não se confirmarem é algo que pode ocorrer, por isso, é necessário sempre a preocupação com a aleatorização dos ensaios e o rigor em cada etapa, somente assim conseguimos minimizar as possibilidades de erro (sejam do tipo I ou tipo II) (HERZOG; FRANCIS; CLARKE, 2019; RODRIGUES; LEMMA, 2014; VOLPATO; BARRETO, 2016).

No caso de desenhos fatoriais, a principal forma de minimizar os erros no teste de hipóteses consiste na aleatorização dos experimentos. A Base Conceitual 2 fala mais a respeito da importância da aleatorização.

Uma forma de estimarmos a possibilidade de cometermos o erro do tipo I consiste no nível de significância, determinado pelo valor de α . É o nível de α que baliza os limites entre aceitar ou negar uma hipótese alternativa (H_1). Os valores de α variam, geralmente, de 0,001 a 0,10, e o mais usual é de 0,05. A determinação desses limites está relacionada à variabilidade dos dados que se estuda. Assim, diminuem-se as chances de afirmar que existe um efeito quando ele não existe (reduzimos o erro tipo I); porém, teremos mais chances de ignorar um efeito que exista (aumentamos o erro tipo II). Se o teste é menos rígido, aumentamos as chances de aceitar efeitos que não existem (aumentamos o erro I), mas diminuímos as de negar efeitos que não existam (reduzimos o erro II) (HERZOG; FRANCIS; CLARKE, 2019; RODRIGUES; LEMMA, 2014; VOLPATO; BARRETO, 2016).

Outras formas de evitar erros são: cuidados no delineamento experimental; execução correta e semelhante das replicatas e aumento do n amostral (consequentemente, pode resultar em maiores custos). O experimentador deve ter bom senso e realizar as tomadas de deci-

sões com o auxílio de outras pessoas experientes no assunto. No entanto, para sabermos se estamos trilhando o caminho certo, é necessário fazer experimentos que mostrem a reprodutibilidade de nossas conclusões (HERZOG; FRANCIS; CLARKE, 2019; RODRIGUES; LEMMA, 2014; VOLPATO; BARRETO, 2016).

2.7 Base Conceitual 7 – Síntese das Análises Estatísticas

De posse dos dados coletados após a execução dos experimentos, além do cálculo de parâmetros de tendência central como a média, são necessárias as medidas de variabilidade (dispersão). A média é utilizada para identificar, com um valor único, qual o centro dos resultados das rodadas experimentais. Já as estimativas de variabilidade mostram as variáveis menos sensíveis a mudanças de respostas. Esses parâmetros são utilizados para a construção dos modelos empregados na otimização das respostas (CATEN; RIBEIRO, 1996; DERRINGER; SUICH, 1980).

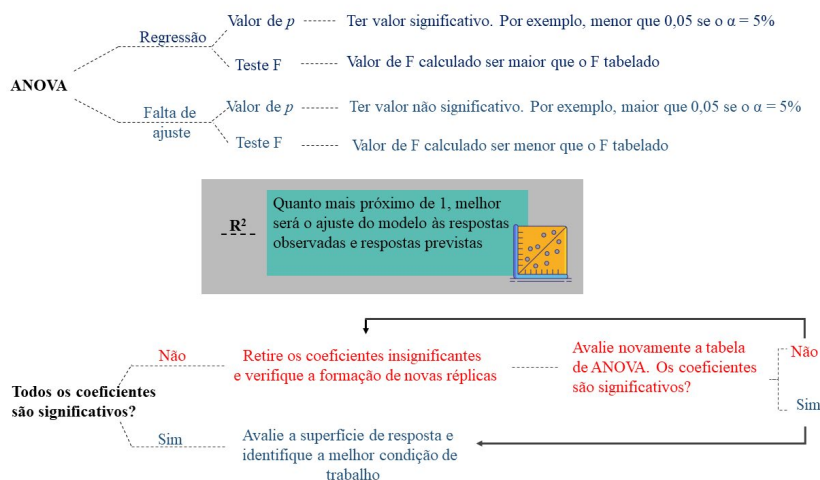
A partir dos resultados de planejamentos fatoriais e do posterior tratamento dos dados, devem ser gerados os modelos de regressão que auxiliam na explicação do comportamento conjunto entre as variáveis independentes e dependentes (respostas). Os modelos podem ter efeitos significativos lineares, quadráticos, além da interação de dois ou mais fatores. A significância dos efeitos pode ser obtida por meio dos valores de p a partir da ANOVA.

Para verificar se o modelo é de segunda ordem ou se existe curvatura, são utilizados pontos centrais ao planejamento. Acrescentar rodadas experimentais replicadas no centro do planejamento é importante, porque os pontos centrais não interferem nas estimativas dos efeitos dos planejamentos. Inserir esses pontos centrais permite uma estimativa de erro puro (variância) e falta ajuste do modelo, como já mencionado na Base Conceitual 3 (PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

A utilização de réplicas no ponto central (3 – 6 é um tamanho ideal) permite calcular a variância, o erro de um efeito, o erro experimental, o intervalo de confiança dos efeitos e o valor t correspondente. Para garantir a validade dos pontos centrais, é necessária a aleatorização dos experimentos, somente assim é possível garantir a reprodutibilidade do erro experimental. Esses detalhes diminuem o risco em falhar na obtenção da relação linear entre os intervalos, estimar um modelo com melhor ajuste e verificar a falta de ajuste. Também existe a estimativa de erros para efeitos sem repetições, porém, essa prática não é encorajada. Outra maneira de verificar o erro experimental é conferir se a distribuição de dados é normal, algum desvio pode ser proveniente de algum ruído experimental (LUNDSTEDT *et al.*, 1998; PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Por meio da ANOVA, estimam-se as médias quadráticas da regressão, resíduos, erro puro, os valores de F (calculados) e a falta de ajuste. Para descrever o modelo ou a função descrita pelas variáveis experimentais, são gerados o coeficiente de determinação (R^2), os valores experimentais *versus* valores previstos, os valores previstos *versus* resíduos, o histograma dos resíduos e os coeficientes de regressão calculados e a estimativa dos efeitos (PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018; TEÓFILO; FERREIRA, 2006). A compreensão desses parâmetros estatísticos é indispensável para a análise do ajuste do modelo e para entender as variáveis respostas em função das variáveis independentes. A Figura 4 nos mostra as análises mais importantes nas tomadas de decisões. O valor de R^2 merece ser destacado como um dos principais parâmetros de ajuste de um modelo. Quanto mais próximo de 1 o valor do coeficiente de determinação, mais próximos dos valores reais são os valores preditos por um modelo estatístico. Por exemplo, um modelo com $R^2=0,92$, conseguiria explicar 92% de um sistema experimental.

Figura 4 – Orientações para avaliação do ajuste do modelo experimental



Fonte: Próprios autores (2021) – criado com imagens do freepik.com.

Idealmente, a razão entre F calculado e F tabelado deve ser maior que 10, como parâmetro para uma boa regressão. Já para avaliação da falta de ajuste, a razão do F calculado e o F tabelado ideal é o mais próximo de 1. A exclusão de variáveis não significativas do modelo é um refinamento que pode aumentar o poder de previsão das respostas (LUNDSTEDT *et al.*, 1998; PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018).

No caso de planejamentos experimentais em blocos, é preciso estar atento à hipótese em teste. Ao aceitarmos a hipótese nula, H_0 , assumimos que não existe diferença significativa entre os blocos. No exemplo em que o pesquisador deseja investigar o efeito de diferentes lotes de um reagente utilizado nos experimentos (em que cada lote estaria em um bloco), caso não haja significância na resposta ($p > \alpha$), assumimos que não existe efeito quando ocorre a mudança de lote do reagente (PORTAL ACTION, 2021).

Em cenários práticos de otimização de processos, é comum trabalharmos com mais de uma resposta e muitas vezes deseja-se maximizar ou minimizar cada uma delas. Quando trabalhamos

com diversas variáveis respostas ($y_1, y_2, \dots, y_n$), é possível realizar a modelagem individual ou analisar as respostas conjuntamente. Nesse caso, é necessário combinar as diferentes respostas (por meio de uma média geométrica), a fim de obter uma resposta resultante única. Essa abordagem, chamada de função de desejabilidade (*Desirability function*), nos permite analisar em que condições poderíamos obter as melhores respostas simultaneamente. A **função de desejabilidade (D)** é escalonada para variar de 0 (insucesso total em obter a combinação de respostas desejadas) a 1 (obtenção das melhores respostas mesmo avaliadas conjuntamente). O ajuste ideal é determinado por maximizar a desejabilidade a um valor mais próximo de 1, pelo somatório dos escores individuais. Esta metodologia foi desenvolvida por Derringer e Suich (CATEN; RIBEIRO, 1996; DERRINGER; SUICH, 1980).

2.8 Base Conceitual 8 – Reprodutibilidade dos resultados

A reprodução experimental dos resultados preditos pelo modelo é importante para confirmação do seu poder preditivo. Esse assunto é uma séria preocupação na área científica, portanto, não pode ser desconsiderado (MAXWELL; DELANEY, 2004). Precisamos saber se as diferenças aleatórias são capazes de interferir na reprodução ou repetibilidade dos resultados obtidos estatisticamente. Essa prática também fornece base para estimar a variabilidade inerente nas unidades experimentais (EASTERLING, 2015).

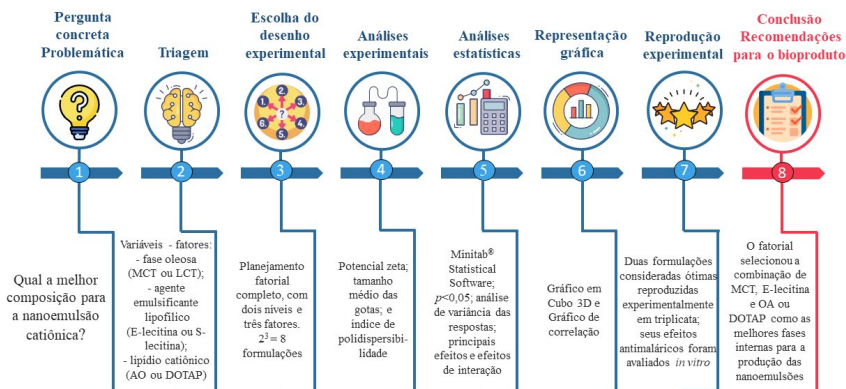
3 EXEMPLO GERAL DA APLICAÇÃO DE UM PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NA OBTENÇÃO DE UM BIOPRODUTO PARA SAÚDE

Bruxel *et al.* (2014) investigaram a melhor formulação para um bioproduto nanoemulsionado com potencial atividade antimalárica. A malária é uma doença parasitária que ainda causa mortali-

dade no mundo todo (WHO, 2020). Recentemente, oligonucleotídeos (ON) *antisense* marcados com diferentes enzimas e antígenos do *Plasmodium falciparum* têm sido considerados potenciais alternativas terapêuticas para malária. No entanto, as altas taxas de degradação desses ON em fluidos biológicos, sua alta hidrofilicidade e seu peso molecular dificultam seu acesso às células alvos, reduzindo a eficiência terapêutica. Bruxel *et al.* (2014) buscaram, portanto, desenvolver a formulação de uma nanoemulsão, com características físico-químicas otimizadas, que pudessem funcionar como carreadora de ON para células de eritrócitos infectadas com *P. falciparum*. Dentre os componentes para a formulação das nanoemulsões, foram testados produtos de origem natural, como triglicérides de cadeia média (MCT), óleo de soja (LCT), lecitina do ovo (E-lecitina) e lecitina de soja (S-lecitina).

A Figura 5 sumariza o planejamento experimental utilizado na otimização da formulação e as conclusões da pesquisa. O objetivo da pesquisa foi selecionar a melhor composição de nanoemulsões destinadas à adsorção de ON por meio de um planejamento fatorial completo 2^3 . Com base em suas propriedades físico-químicas, duas formulações foram selecionadas para estudos posteriores, ambas compostas por triglicerídeos de cadeia média, lecitina do ovo e oleilamina (OA) ou 1,2-dioleoil-3 trimetilamônio-propano (DOTAP). Os resultados gerais mostraram o potencial das nanoemulsões otimizadas no planejamento experimental como carreadoras de ON *antisense* e contra parasitas da malária (BRUXEL *et al.*, 2014).

Figura 5 – Resumo do estudo de otimização por meio de um fatorial completo para obtenção de uma nanoemulsão catiônica com adsorção de oligonucleotídeos (ON) *antisense* antimaláricos



Legenda: MCT – triglicerídeos de cadeia média; LCT – óleo de soja; E-lecitina – lecitina do ovo; S-lecitina – lecitina da soja; OA – oleilamina; DOTAP – 1,2 dioleoil-3-trimetil amônio propano.

Fonte: Adaptado de Bruxel *et al.* (2014) – criado com imagens do freepik.com.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações apresentadas neste capítulo estão longe de esgotar todos os detalhes que abrangem os planejamentos experimentais que visam a otimização de processos de produção e obtenção de bioprodutos para saúde. No entanto, apontam caminhos e alertam para situações cruciais que, se observadas, serão ferramentas muito úteis àqueles que se dedicam à PD&I neste setor.

REFERÊNCIAS

- BARKER, T. B. **Quality by Experimental Design**. 4th ed. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis, 2016.
- BARROS NETO, B. DE; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.
- BERGER, P. D.; MAURER, R. E.; CELLI, G. B. **Experimental Design**. Cham: Springer International Publishing, 2018.

BRUXEL, F.; BOCHOT, A.; DIEL, D.; WILD, L.; CARVALHO, E.; COJEAN, S.; LOISEAU, P.; FATTAL, E.; TEIXEIRA, H. Adsorption of antisense oligonucleotides targeting malarial topoisomerase II on cationic nanoemulsions optimized by a full factorial design. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 9, p. 1161-1171, 2014.

CATEN, C. S. TEN; RIBEIRO, J. L. D. Etapas na otimização experimental de produtos e processos: discussão e estudo de caso. **Production**, v. 6, n. 1, p. 45-64, 1996.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DOPICO-GARCIA, M. S.; VALENTAO, P.; GUERRA, L.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M. Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white “Vinho Verde” grapes. **Analytica Chimica Acta**, v. 583, p. 15-22, 2007.

EASTERLING, R. G. **Fundamentals of Statistical Experimental Design and Analysis**. Cedar Crest, New Mexico, USA: John Wiley & Sons, 2015.

ENGSTROM, R.; CARLSSON-KANYAMA, A. Food losses in food service institutions – examples from Sweden. **Food Policy**, v. 29, p. 203-213, 2004.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, I. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

HERZOG, M. H.; FRANCIS, G.; CLARKE, A. **Understanding Statistics and Experimental Design: How to Not Lie with Statistics**. Cham: Springer International Publishing, 2019.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTRÖM, A.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, p. 3-40, 1998.

MAXWELL, S. E.; DELANEY, H. D. **Designing experiments and analyzing data: a model comparison perspective**. 2nd ed. Mahwah, N.J: Lawrence Erlbaum Associates, 2004.

MAXWELL, S. E.; DELANEY, H. D.; KELLEY, K. **Designing experiments and analyzing data: a model comparison perspective**. 3rd ed. New York, NY: Routledge, 2017.

MINITAB. **O que são experimentos de superfície de resposta, experimentos centrais compostos e experimentos Box-Behnken?** Minitab, LLC. Disponível em: <https://support.minitab.com/pt-br/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/>. Acesso em: 22 fev. 2021.

PEREIRA, F.; PEREIRA-FILHO, E. Aplicação de programa computacional livre em planejamento de experimentos: um tutorial. **Química Nova**, v. 41, n. 9, p. 1061-1071, 2018.

Capítulo 14

PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS E TÉCNICAS DE OTIMIZAÇÃO – 1

PORTAL ACTION. Estatcamp – **Consultoria Estatística e Qualidade**. São Paulo, [s.d.]. Disponível: <http://www.portalaction.com.br/planejamento-de-experimento/>. Acesso em: 22 fev. 2021.

RARDIN, R. L. **Optimization in Operations Research**. 2nd ed. Arkansas, USA: Pearson Higher Education, 2017.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo e Fraternidade Fé e Amor, 2014.

RYAN, T. P. **Modern Experimental Design**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2007.

SHORE, H. **Response modeling methodology: empirical modeling for engineering and science**. Hackensack, NJ: World Scientific, 2005.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

UNGUREANU, C. P.; FAVIER, L.; BAHRIM, G.; AMRANE, A. Response surface optimization of experimental conditions for carbamazepine biodegradation by *Streptomyces* MIUG 4.89 C.P. **New Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 347-357, 2015.

VOLPATO, G. L.; BARRETO, R. E. **Estatística sem dor!** Botucatu: Best Writing, 2016.

WHO. World Health Organization. **World Malaria Report 2020**. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2020>. Acesso em: 28 fev. 2021.

Capítulo 15

PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS E TÉCNICAS DE OTIMIZAÇÃO APLICADOS NA OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS PARA SAÚDE — PARTE 2

LEONARDO LUIZ BORGES
DEBBORAH GONÇALVES BEZERRA
JOELMA ABADIA MARCIANO DE PAULA

1 INTRODUÇÃO

Há um consenso na literatura científica de que planejamentos experimentais são ferramentas poderosas para conduzir à otimização de processos (MILLS, 2003; MULLIN, 2013; STEINBERG; HUNTER, 1984; WEISSMAN; ANDERSON, 2015). O número de publicações de trabalhos científicos aplicando planejamentos experimentais no desenvolvimento de processos farmacêuticos, apenas no periódico *Organic Process Research & Development*, aumentou 145% de 2008-2013 em relação ao período de 2003-2007 (WEISSMAN; ANDERSON, 2015).

Segundo Steinberg e Hunter (1984), o trabalho pioneiro de Fisher nas décadas de 1920 e 1930 foi o grande responsável pelo avanço na aplicação de um tratamento estatístico com o objetivo de melhorar as condições de um processo. Dessa forma, a função da estatística ganhou protagonismo em todas as etapas de um processo e sua aplicação como uma ferramenta *a priori* é cada vez mais relevante. A estatística, portanto, é uma importante área de caráter interdisciplinar na Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação (PD&I)

de produtos para saúde, cuja participação é fundamental, desde os estágios iniciais da investigação.

A abordagem sistemática inerente a um planejamento ou desenho experimental pode eliminar vieses do pesquisador e ampliar seu olhar para condições do processo que talvez não tivesse considerado previamente. Ademais, quando investigamos vários fatores simultaneamente, os planejamentos fatoriais experimentais nos permitem visualizar a ocorrência de interações capazes de direcionar um determinado processo às condições desejadas (WEISSMAN; ANDERSON, 2015).

Esta segunda parte tem como objetivo ampliar conceitos inicialmente trabalhados na seção anterior, apresentando uma visão geral sobre os tipos de planejamentos ou desenhos experimentais, bem como sobre a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), comumente empregados na otimização de processos, incluindo aqueles aplicados na obtenção de bioprodutos.

2 DESENHO FATORIAL COMPLETO

Se, em um planejamento experimental, são testadas todas as combinações possíveis entre todos os níveis de cada fator, este é chamado de fatorial completo. Um **desenho fatorial completo** é apropriado quando o pesquisador deseja verificar a significância de todas as interações possíveis de acordo com a quantidade de fatores. Se temos 3 fatores (x_1 , x_2 e x_3), podemos extrair todas as interações possíveis entre essas 3 variáveis independentes (x_1 , x_2 , $x_1 x_2$, $x_1 x_3$ e $x_2 x_3$). Com os planejamentos fatoriais completos podemos, portanto, extrair mais informação sobre o processo estudado. Por exemplo, um planejamento com dois níveis para três fatores (2^3) teremos um total de oito experimentos. Introduzimos, na parte 1, algumas noções de **planejamentos fatoriais completos e fracionários** (BARKER, 2016; CUNICO *et al.*, 2008; LUNDSTEDT *et al.*, 1998; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Leong *et al.* (2018) avaliaram a extração e purificação de poli(hidroxialcanoatos) (PHA) por separação térmica a partir de culturas de *Cupriavidus necator* H16. Os PHA têm sido considerados alternativas promissoras aos plásticos convencionais devido à sua variabilidade na estrutura e rápida biodegradação. Para a investigação os autores utilizaram um fatorial completo 2^4 . Os fatores investigados foram: concentração de fosfato de potássio (8 e 15% – p/p), concentração de poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno) (10 e 18% – p/p), pH (8 e 10) e cloreto de sódio (0 e 10 mM). Os resultados mostraram que os maiores coeficientes de partição e rendimento de PHA foram obtidos nas condições de 15% em peso de fosfato de potássio, 18% em peso de poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno), pH=10 e sem adição de cloreto de sódio (LEONG *et al.*, 2018).

3 DESENHO FATORIAL FRACIONADO

Existem circunstâncias em que o pesquisador deseja, com um menor número de experimentos, extrair informações acerca de quais fatores podem exercer efeitos significativos (positivo ou negativo) sobre uma ou mais respostas. Dentro desse contexto, uma alternativa seria o emprego de **desenhos fatoriais fracionários**. Alguns fatoriais são constituídos de frações bem determinadas de fatoriais completos, e são importantes na seleção dos níveis e/ou dos fatores em estudo (RODRIGUES; LEMMA, 2014).

O **desenho fatorial fracionado** é adequado para planejamentos experimentais nos quais muitos fatores (k grande) devem ser avaliados e não é exequível realizar todas as combinações dos diferentes níveis dos fatores, devido ao elevado volume de experimentos. Com o emprego de planejamentos fracionados, é possível extrair interações de segunda ordem (não todas!) e verificar efeitos lineares com um número reduzido de experimentos. Normalmente, a influência das interações de terceira ordem ($x_1x_2x_3$) ou superior, não são significativas e são excluídas em modelo polinomial. O **desenho experimental fracionado** apresenta reduzido número de

experimentos e direciona os principais efeitos. Quando consideramos um desenho completo, podemos construir planejamentos que correspondam a 50% (1/2), 25% (1/4), do total de experimentos do desenho completo. Obviamente que, quanto menor o número total de experimentos, menor é o número de informação extraído do nosso sistema em estudo em relação às interações que podem ser identificadas em um planejamento fatorial completo (LUNDSTEDT *et al.*, 1998; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

A escolha da fração e os critérios em relação às condições experimentais é parte do bom senso do experimentador. A seguinte regra para fatoriais fracionados é importante: o número de ensaios realizados deve ser no mínimo igual ao número de variáveis e mais 4 rodadas experimentais (RODRIGUES; LEMMA, 2014). Por exemplo, deseja-se testar 5 fatores utilizando meia-fração (1/2) ou metade de um fatorial completo: $2^{5-1} = \frac{1}{2}^1 \times 2^5 = 16$ rodadas experimentais.

O pesquisador deve ter cuidado na escolha da fração a ser utilizada, pois o emprego de um número muito reduzido de experimentos compromete a identificação das interações. Quando o foco inicial consiste em realizar uma triagem com diversas variáveis, sem a preocupação inicial com a identificação de interações, os planejamentos fatoriais fracionários em 2 níveis constituem alternativas ideais. O Quadro 1 traz um resumo de fatoriais fracionários com dois níveis, suas resoluções e menor número de letras ou geradores de efeitos para a formação de sua relação definidora (RODRIGUES; LEMMA, 2014; BARKER, 2016).

A resolução do planejamento fatorial fracionado explica que efeitos em um experimento são confundidos com outros efeitos. O uso de um planejamento fatorial fracionado leva um ou mais efeitos a serem confundidos, dessa forma, eles não podem ser estimados separadamente. Por isso, é recomendado utilizar um planejamento fatorial fracionado com a maior resolução possível para o grau de fracionamento exigido (Quadro 1).

Quadro 1 – Resumo de fatoriais fracionários com dois níveis, suas resoluções e menor número de letras ou geradores de efeitos para a formação de sua relação definidora

Número de fatores ou variáveis (<i>k</i>)							
	3	4	5	6	7	8	
Quantidade de rodadas experimentais	4	2^{3-1} ±C=AB					
	8	2^3 completo	2^{4-1} IV ±D=ABC	2^{5-2} III ±D=AB ±E=AC	2^{6-3} III ±D=AB ±E=AC ±F=BC	2^{7-4} III ±D=AB ±E=AC ±F=BC ±G=ABC	
	16	2^3 2 vezes	2^4 completo	2^{5-1} V ±E=ABCD	2^{6-2} IV ±E=ABC ±F=BCD	2^{7-3} IV ±E=ABC ±F=BCD ±G=ACD	2^{8-4} IV ±E=BCD ±F=ACD ±G=ABC ±H=ABD
	32	2^3 4 vezes	2^4 2 vezes	2^5 completo	2^{6-1} VI ±F=ABCDE	2^{7-2} V ±F=ABCD ±G=ABDE	2^{8-3} V ±F=ABC ±G=ABD ±H=BCDE
	64	2^3 8 vezes	2^4 4 vezes	2^5 2 vezes	2^6 completo	2^{7-1} VII ±G=ABCDEF	2^{8-2} V ±G=ABCD ±H=ABEF

Fonte: Próprios autores (2021).

Por exemplo, é mais adequado optar por um planejamento cujos efeitos principais são confundidos com interações de 3 fatores (resolução IV) do que um planejamento cujos efeitos principais são confundidos com interações de 2 fatores (resolução III) (MINITAB, 2021).

A resolução está ligada diretamente à relação definidora dos efeitos. A relação definidora é um conjunto total de termos ou variáveis utilizados para estipular a fração em um planejamento fatorial fracionado. O padrão de confundimento dos efeitos pode ser facilmente conhecido a partir da fração definidora. O primeiro passo para definirmos o padrão de confundimento de um planejamento fatorial fracionário é definir o gerador. O gerador decorre da escolha que se faz para definir os níveis dos fatores que estão sendo acrescentados. Por exemplo, em um planejamento 2^{4-1} , utilizam-se 3 variáveis para montagem da matriz de cálculo dos efeitos ($x_4 = x_1x_2$). Seu gerador é o produto dos fatores ($4 = 123$). Em seguida, a relação definidora é obtida pela multiplicação do gerador ($4 \times 4 = 123 \times 4 \rightarrow I = 1234$). Já em um planejamento 2^{5-2} , utilizam-se 3 variáveis para montagem da matriz de cálculo dos efeitos ($x_4 = x_1x_2x_3$ e $x_5 = x_1x_2$). São obtidos dois geradores ($4 = 123$ e $5 = 12$). Em seguida, a relação definidora é obtida pela multiplicação do gerador. A primeira identidade é $4 \times 4 = 123 \times 4 \rightarrow I = 1234$ e $5 \times 5 = 12 \times 5 \rightarrow I = 125$. Pode-se afirmar, então, que $125 = 1234$, novamente realiza-se a multiplicação desse gerador obtendo uma terceira identidade ($125 \times 125 = 1234 \times 125 \rightarrow I = 345$). Assim, a relação definidora é $I = 345$ (MINITAB, 2021).

Os planejamentos de resolução III não têm nenhum efeito principal confundido com outros efeitos principais. Porém, os efeitos principais são confundidos com interações de segunda ordem e interações de segunda ordem podem ser confundidas entre si. Nos planejamentos fatoriais fracionários de resolução IV, nenhum efeito principal é confundido com outros efeitos principais ou com qualquer outro efeito de interação de segunda ordem. No entanto, as interações de segunda ordem são confundidas entre si. Já nos plane-

jamentos de resolução V, nenhum efeito principal ou de segunda ordem é confundido com qualquer outro efeito principal ou com qualquer outro efeito de interação de segunda ordem. As interações de segunda ordem são confundidas com interações de terceira ordem. Após a avaliação do modelo, as variáveis que têm maior influência na resposta podem ser incluídas em novos estudos (RODRIGUES; LEMMA, 2014; BARKER, 2016).

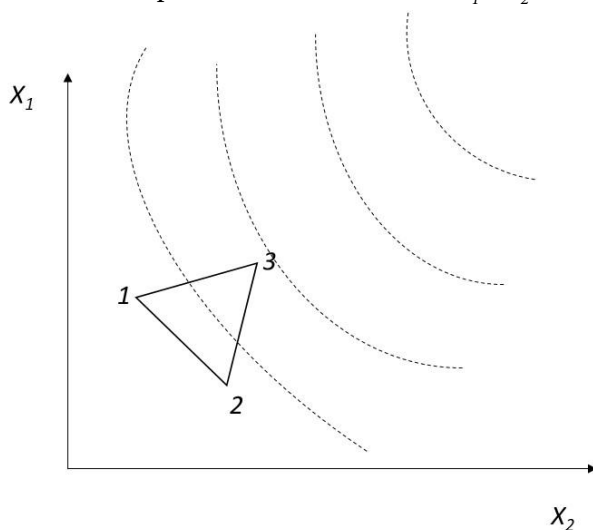
Por exemplo, para investigar a taxa de degradação anaeróbia de ácidos graxos voláteis (AGV) sob a influência do efeito individual e combinado de seis elementos traços (Co, Ni, Mo, Se, Fe e W) foi empregado um planejamento fatorial fracionário, devido à grande quantidade de fatores que resultaria em um elevado número de experimentos. Trata-se de um processo importante para o tratamento e produção de energia renovável. Para tanto, os autores empregaram planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} (que seria a mesma coisa de $2^6/2^2$), ou seja, $\frac{1}{4}$ do planejamento fatorial completo. O método fatorial fracionário foi adequado para identificar quais os elementos que inibiram ou aumentaram a taxa de degradação anaeróbica de gorduras voláteis e ofereceu subsídios para a construção de outros desenhos fatoriais com o objetivo de obter o potencial “ponto ótimo”. Nesse estudo, molibdênio, cobalto e selênio apresentaram efeito positivo significativo ($p \leq 0,05$) sobre a taxa de degradação anaeróbica de gorduras voláteis, enquanto níquel e tungstênio exerceram efeito negativo significativo (JIANG *et al.*, 2017).

4 DESENHO SIMPLEX

O desenho experimental simplex baseia-se em um modelo matemático que utiliza a programação linear, formado por uma função cujo objetivo é maximizar ou minimizar um resultado, utilizando inequações (desigualdades) e equações (igualdades). O planejamento simplex é uma estratégia gradual, na qual os experimentos são realizados um a um. Os métodos simplex são representados, graficamente, por figuras geométricas. Sua configuração é de

um polígono de $x+1$ vértices, em que x é o número de variáveis independentes. Sendo assim, o simplex assume a forma de um triângulo quando são avaliadas duas variáveis (conforme Figura 1), de um tetraedro quando são avaliadas quatro variáveis e assim por diante. Muito utilizado em planejamentos experimentais conhecidos como modelos de mistura, em investigações sobre as quantidades ideais dos excipientes a serem utilizados em um bioproduto, por exemplo. As variáveis de estudo são representadas por x_i , os coeficientes das variáveis por α_i e a função $\alpha_1 x_1 + \alpha_2 x_2 + \dots + \alpha_i x_i = b$. Todas as restrições devem ser equações de igualdade (SILVA; BORSATO; SILVA, 2000; SOUSA; SILVA; ARENALES, 2005).

Figura 1 – Desenho simplex com duas variáveis (x_1 e x_2)



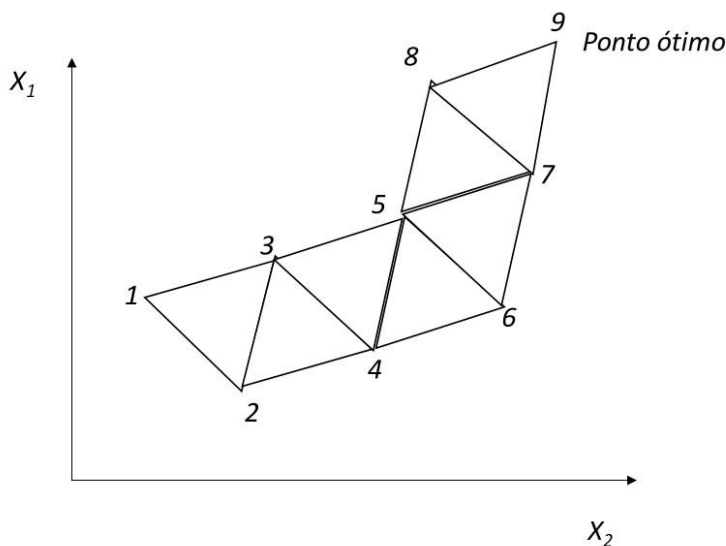
Fonte: Próprios autores (2021).

O método simplex é realizado de forma a “caminhar” pelo espaço para encontrar uma melhor resposta (solução ótima), conforme a Figura 2. Senão, é necessário verificar as variáveis que devem entrar ou sair do planejamento experimental e determinar a nova solução factível básica. Se há várias respostas de interesse, podemos combiná-las e ponderar suas importâncias com o método

de *Derringer e Suich* (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; DERRINGER; SUICH, 1980; SILVA; BORSATO; SILVA, 2000; SOUSA; SILVA; ARENALES, 2005).

Um exemplo de aplicação do desenho simplex foi utilizado por Zettel e Hitzmann (2017) para identificar as melhores características para a produção de pães, tais como, volume, saturação de cor de superfície, crocância, firmeza do miolo e elasticidade. O objetivo era transferir uma receita de forno comum para um forno de revestimento de cerâmica. As variáveis independentes da otimização simplex foram o tempo de fermentação, temperatura do forno e o tempo de cozimento. Após a execução do modelo os parâmetros de obtenção dos pães, considerados ideais foram: tempo de fermentação de 117 minutos, temperatura do forno de 215 °C e tempo de cozimento de 16 minutos (ZETTEL; HITZMANN, 2017).

Figura 2 – Processo de otimização simples com duas variáveis (x_1 e x_2)



Fonte: Próprios autores (2021).

5 DESENHO DE MISTURAS

Um bioproduto em desenvolvimento pode requerer a utilização de muitos componentes que necessitam ser combinados em diferentes proporções. Para obter as melhores quantidades dos componentes de determinada **mistura**, a fim de levar a um resultado desejado, devemos construir um planejamento experimental adequado a essa situação.

Quando trabalhamos com misturas, existe uma relação direta entre os seus constituintes. Se determinado bioproduto é composto por três constituintes: 20% de A, 30% de B e 50% de C, essa mistura possui propriedades que poderiam ser modificadas de acordo com as mudanças de proporção entre os 3 constituintes hipotéticos. Supondo que o pesquisador deseje dobrar a quantidade do componente A, na tentativa de maximizar alguma resposta do bioproduto, necessariamente, as proporções de B e C serão modificadas, pois a soma dos três componentes deve resultar em 100%. Assim, dobrando A de 20% para 40%, B e C devem compor os 60% restantes (Equação 1) (ATKINSON; DONEV; TOBIAS, 2007; BARKER, 2016; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; CORNELL, 2002, 2011; LUNDSTEDT *et al.*, 1998). Em sistemas de misturas, se chamarmos de q a quantidade de ingredientes e x_i a proporção de cada componente na mistura, temos que:

$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1 = 100\% \quad (\text{Equação 1})$$

Assim como em outros desenhos experimentais, quando se trata de misturas, diferentes modelos, podem ajustar-se aos dados (linear ou simplex, quadrático – Scheffé, modelo cúbico, etc.) e escolhe-se o modelo com melhor ajuste. No processo de construção de desenhos experimentais para misturas, é usual a combinação de dois desenhos experimentais, por exemplo, o desenho de misturas e desenho fatorial completo/fracionário, para avaliação das melho-

res proporções dos constituintes com o objetivo de maximizar ou minimizar respostas de interesse em um bioproduto (ATKINSON; DONEV; TOBIAS, 2007; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; BOX; DRAPER, 2007; CORNELL, 2002, 2011; LUNDSTEDT *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2011).

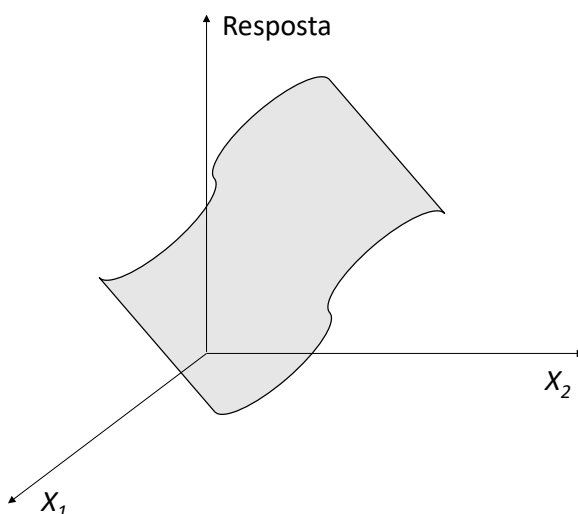
Esse tipo de planejamento foi utilizado para o desenvolvimento de um biocombustível (mistura de óleo de Melaleuca e óleo de Palma com baixa viscosidade e alta volatilidade) como alternativa a combustíveis fósseis utilizados em motores a diesel. Foram realizadas oito rodadas experimentais: três foram a combinação de misturas dos biocombustíveis (75:25, 50:50 e 25:75), duas amostras de óleo puro (100% óleo de Melaleuca e 100% óleo de Palma) e três amostras repetidas. As variáveis respostas avaliadas foram viscosidade dinâmica e densidade. A composição de mistura otimizada para o biocombustível prevista pelo modelo foi 32% de óleo de Palma e 68% de óleo de Melaleuca (CHE MAT *et al.*, 2019).

6 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E OUTRAS REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) é utilizada principalmente como refinamento de modelos em que há a suposição de curvatura na superfície de resposta. Ela tem como objetivo fornecer mapas empíricos gerados a partir dos dados da otimização, empregando os diferentes desenhos abordados. Esses mapas ilustram a forma pela qual os fatores, que podem ser controlados pelo pesquisador, influenciam a variável resposta. Auxiliam, portanto, a encontrar os níveis de variáveis que otimizam uma resposta; a selecionar as condições operacionais que atendam às especificações e a obter um valor ótimo para a variável resposta. É importante ressaltar que, ao considerar modelos quadráticos, é essencial a inclusão de réplicas no experimento, devido à necessidade de detectar o grau de curvatura do modelo (CHONG; ZAK, 2013; LUNDSTEDT *et al.*, 1998).

A MSR nos permite visualmente obter as regiões onde encontramos os máximos ou mínimos de uma resposta, dentro da faixa de níveis investigada (Figura 3) (ATKINSON; DONEV; TOBIAS, 2007; CHONG; ZAK, 2013; CHRISTENSEN, 2001; LUNDSTEDT *et al.*, 1998).

Figura 3 – Representação gráfica tridimensional de uma resposta investigada em função de duas variáveis independentes (x_1 e x_2)



Fonte: Próprios autores (2021).

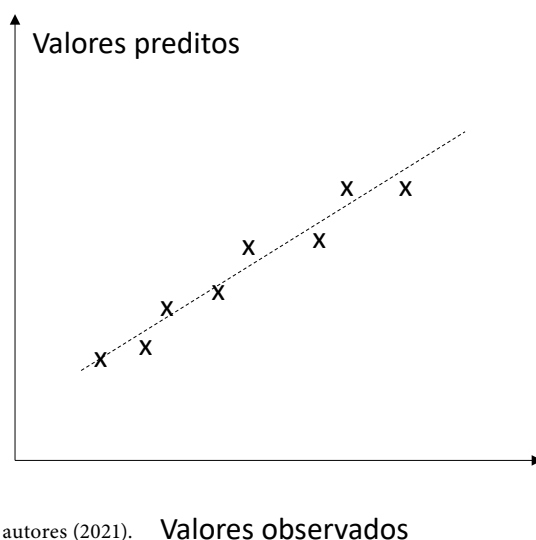
Observe em perspectiva, na Figura 3, que, à medida que modificamos os níveis nos eixos x_1 e x_2 , a resposta investigada sofre variações expressas graficamente por essa representação (MINITAB, 2021; PORTAL ACTION, 2021). Os gráficos de superfície de resposta expressam os resultados de modelos obtidos por regressão múltipla ($y \sim x_1 + x_2 + \dots + x_n$), que consistem em ferramentas imprescindíveis para a otimização de processos (PORTAL ACTION, 2021).

A representação gráfica dos resultados das análises estatísticas, incluindo a MSR, auxilia o pesquisador na visualização de qual caminho seguir na escolha de níveis, com o objetivo de otimizar

um processo ou as características de um bioproduto (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; EASTERLING, 2015).

Uma das formas de observar a qualidade do modelo em prever dados consiste na construção do gráfico de valores observados *vs.* valores preditos (Figura 4). Esses gráficos auxiliam na interpretação visual do quanto os dados estão ajustados, ou seja, do nível de proximidade entre os valores preditos pelo modelo e os resultados experimentais. No gráfico de resíduos (diferença entre valores preditos e experimentais), observa-se se eles estão distribuídos aleatoriamente, se há formação de grupos ou tendência, ou se há presença de *outliers* (LUNDSTEDT *et al.*, 1998; MAXWELL; DELANEY, 2004; RARDIN, 2017).

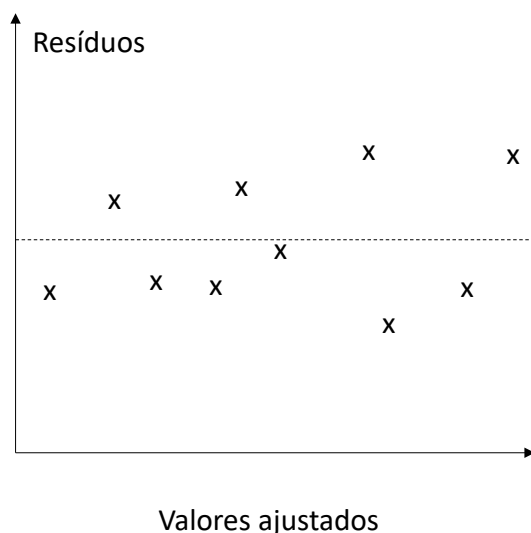
Figura 4 – Gráfico de valores preditos *versus* valores observados (experimentais). Quanto maior a dispersão dos pontos em torno da reta, menor a poder preditivo do modelo gerado



Fonte: Próprios autores (2021).

A Figura 5 traz uma representação geral da distribuição de resíduos em um modelo polinomial. Esse gráfico também auxilia a observação do poder de ajuste do modelo, pois, se temos menores valores de resíduos, maior o poder do nosso modelo em prever corretamente os resultados de um sistema. Quando os gráficos de resíduos são aceitáveis, os resultados numéricos serão confiáveis. Os gráficos de resíduos nos permitem identificar a ocorrência de um erro sistemático ocorrido nos experimentos de um desenho fatorial. Outras representações gráficas que podem auxiliar na verificação da qualidade dos resultados de um planejamento experimental são gráficos de contorno, de Pareto, de interações, *networks* e também fluxogramas (LUNDSTEDT *et al.*, 1998; MAXWELL; DELANEY, 2004; RARDIN, 2017).

Figura 5 – Gráfico de resíduos. Quanto menos dispersos em relação a reta horizontal, menores os resíduos (diferença entre valores preditos e observados)



Fonte: Próprios autores (2021).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O acoplamento entre a escolha apropriada do desenho experimental, o devido tratamento estatístico (opção pelo modelo mais ajustado) e a construção das representações gráficas mais ilustrativas representam o caminho para conclusões robustas, capazes de permitir tomadas de decisões corretas em processos de obtenção de bioprodutos.

REFERÊNCIAS

- ATKINSON, A. C.; DONEV, A. N.; TOBIAS, R. D. **Optimum experimental designs, with SAS**. Oxford: Oxford University Press, 2007.
- BARKER, T. B. **Quality by Experimental Design**. 4th ed. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis Group, 2016.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos pesquisa e desenvolvimenno na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.
- BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R. **Response Surfaces, Mixtures, and Ridge Analyses**. 2nd ed. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 2007.
- CHE MAT, S.; IDROAS, M. V.; TEOH, Y. H.; HAMID, M. F. Optimisation of viscosity and density of refined palm Oil-Melaleuca Cajuputi oil binary blends using mixture design method. **Renewable Energy**, v. 133, p. 393-400, 2019.
- CHONG, E. K. P.; ZAK, S. H. **An Introduction to Optimization**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2013.
- CHRISTENSEN, R. **Advanced Linear Modeling**. New York, NY: Springer New York, 2001.
- CORNELL, J. A. **Experiments with mixtures: designs, models, and the analysis of mixture data**. 3rd ed. New York: Wiley, 2002.
- CORNELL, J. A. **A Primer on Experiments with Mixtures: Cornell/A Primer on Mixtures**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2011.
- CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: Uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, 30 jun. 2008.
- DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

EASTERLING, R. G. **Fundamentals of Statistical Experimental Design and Analysis**. Cedar Crest, New Mexico, USA: John Wiley & Sons, 2015.

JIANG, Y.; WANG, T. T.; SHAO, J.; GUO, S.; ZHU, W.; YU, Y.J; CHEN, S.I.; HATANO, R. Investigation of the impact of trace elements on anaerobic volatile fatty acid degradation using a fractional factorial experimental design. **Water Research**, v. 125, p. 458-465, nov. 2017.

LEONG, Y.; CHANG, C. K.; ARUMUGASAMY, S.; LAN, J.; LOH, H. S.; MUHAMMAD, D.; SHOW, P. Statistical design of experimental and bootstrap neural network modelling approach for thermoseparating aqueous two-phase extraction of polyhydroxyalkanoates. **Polymers**, v. 10, n. 2, p. 1-15, 2018.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTRÖM, A.; PETERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, p. 3-40, 1998.

MAXWELL, S. E.; DELANEY, H. D. **Designing experiments and analyzing data: a model comparison perspective**. 2nd ed. Mahwah, N.J: Lawrence Erlbaum Associates, 2004.

MILLS, J. E. Design of experiments in pharmaceutical process research and development. In: ABDEL-MAGID, A. F.; RAGAN, J. A. (Eds.). **Chemical Process Research**. ACS Symposium Series 870. Washington, DC: American Chemical Society, 2003. Chapter 6. p 87-109.

MINITAB. **O que são experimentos de superfície de resposta, experimentos centrais compostos e experimentos Box-Behnken?** Minitab, LLC. Disponível em: <https://support.minitab.com/pt-br/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/>. Acesso em: 22 fev. 2021.

MINITAB. **O que é a resolução do experimento em um experimento fatorial?** Minitab, LLC. Disponível em: <https://support.minitab.com/pt-br/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/factorial-and-screening-designs/what-is-design-resolution/>. Acesso em: 22 fev. 2021.

MINITAB. **O que é uma relação definidora em um experimento fatorial com dois níveis?** Minitab, LLC. Disponível em: <https://support.minitab.com/pt-br/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/factorial-and-screening-designs/what-is-a-defining-relation/>. Acesso em: 22 fev. 2021.

MULLIN, R. Design of experiments makes a comeback. **Chemical & Engineering News**, v. 91, n. 13, p 25-28, 2013.

PORTAL ACTION. Estatcamp – **Consultoria Estatística e Qualidade**. São Paulo, [s.d.]. Disponível: <http://www.portalaction.com.br/planejamento-de-experimento/>. Acesso em: 22 fev. 2021.

Capítulo 15

PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS E TÉCNICAS DE OTIMIZAÇÃO – 2

RARDIN, R. L. **Optimization in Operations Research**. 2nd ed. Arkansas, USA: Pearson Higher Education, 2017.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3. ed. Campinas, São Paulo: Casa do Espírito Amigo e Fraternidade Fé e Amor, 2014.

SILVA, R. A. DA; BORSATO, D.; SILVA, R. S. F. DA. Método simplex supermodificado como estratégia de otimização para respostas combinadas em sistemas alimentares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 329-336, 2000.

SILVA, N. A. M.; LANA, A. M. Q.; SILVA, F. F.; SILVEIRA, F. G.; BERGMANN, J. A. G.; SILVA, M. A. TORAL, F. I. B. Seleção e classificação multivariada de modelos de crescimento não lineares para bovinos Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 364-371, 2011.

SOUSA, R. S.; SILVA, C. T. L.; ARENALES, M. N. Métodos do tipo dual simplex para problemas de otimização linear canalizados. **Pesquisa Operacional**, v. 25, n. 3, p. 349-382, 2005.

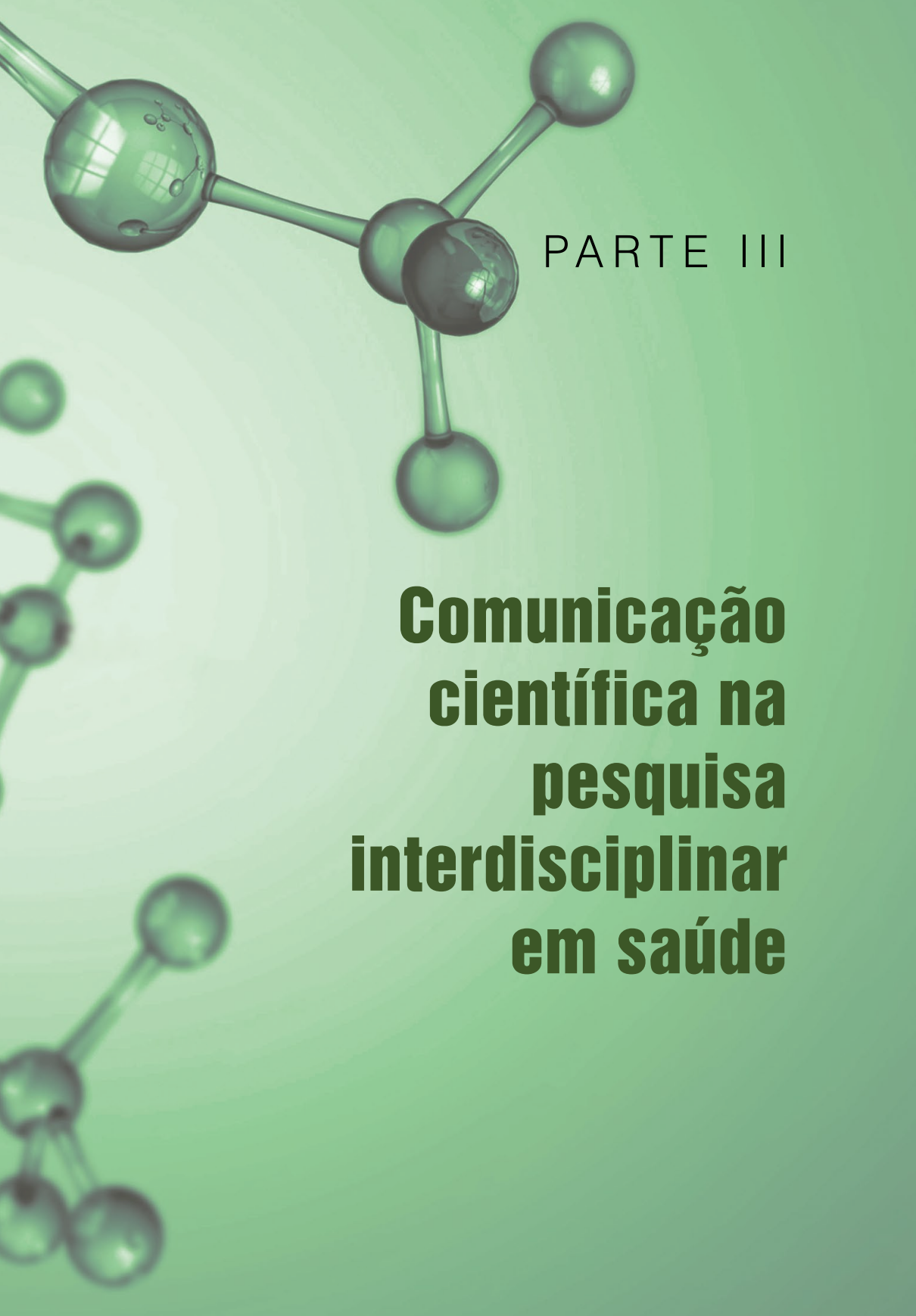
STEINBERG, D. M.; HUNTER, W. G. Experimental design: review and comment. **Technometrics**, v. 26, n. 2, p. 71-97, 1984.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, abr. 2006.

WEISSMAN, S. A.; ANDERSON, N. G. Design of experiments (DoE) and process optimization. A review of recent publications. **Organic Process Research & Development**, v. 19, p. 1605-1633, 2015.

ZETTEL, V.; HITZMANN, B. Optimization of the production parameters for bread rolls with the Nelder–Mead simplex method. **Food and Bioproducts Processing**, v. 103, p. 10-17, 2017.v





PARTE III

**Comunicação
científica na
pesquisa
interdisciplinar
em saúde**



Capítulo 16

MÉTODOS DE COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

Gênero Resumo

MARTINA ESTEVAM BROM VIEIRA
TÂNIA CRISTINA DIAS DA SILVA HAMU
FLÁVIO MONTEIRO AYRES

1 INTRODUÇÃO

Alunos e docentes dos programas de pós-graduação nas Ciências da Saúde são frequentemente expostos ao desafio de escrever resumos com finalidades diversas, tais como: composição de projeto (em processo seletivo, concurso, solicitação de fomento, submissão de projeto de pesquisa e outros), participação em evento científico, publicação parcial ou integral de dados, composição do produto final do curso (monografia, trabalho de conclusão de curso, dissertação e tese) e produto final de estudo (relatório parcial, relatório final, prestação de contas e outros).

A forma como esse gênero textual é escrito tem o potencial de impactar relevantemente no alcance do objetivo que lhe foi empenhado e na decisão do leitor de continuar lendo ou não o trabalho completo. Representa uma forma eficaz e rápida de divulgar os resultados de pesquisas e do desenvolvimento dos mais diversos produtos para a saúde. Dessa forma, estratégias variadas de escrita de um mesmo trabalho podem ser adotadas para se atingirem objetivos distintos que perpassam, por exemplo, pela defesa pública do

projeto de pesquisa até a obtenção de fomento e obtenção de título (FERREIRA; PATINO, 2018; GARCIA; GATTAZ; GATTAZ, 2019).

Segundo o Grande Dicionário Houaiss (2020), o verbete de resumo refere-se ao ato de resumir ou sintetizar, com ênfase na apresentação das características básicas de alguma coisa, fornecendo a ideia geral sobre a mesma. Tal definição é acompanhada pelos adjetivos “breve” e “sucinto”.

No presente capítulo, o resumo e as demais variantes em outros idiomas serão genericamente referidos apenas como “resumo”. A seção de resumo é traduzida em espanhol como *resumen*; francês, como *résumé*; e inglês, como *abstract* ou *summary*. Manuscritos com a apresentação do resumo em mais que um idioma, geralmente, optam por uma versão no idioma recomendado pela equipe editorial e outra versão em inglês. Associado ao resumo, o título e as palavras-chave compõem a tríade comumente atrelada a em um mesmo conjunto. As estratégias para se escrever resumos de alto impacto, bem como a importância desse conhecimento com foco nas mais diversas áreas da Ciência da saúde, serão apresentadas nas páginas seguintes.

A fim de levantar dados e discorrer sobre estratégias de escrita de resumos, 95 periódicos científicos da área da saúde indexados ao *Scientific Electronic Library Online* – SciELO (www.scielo.br) tiveram as instruções para autores consultadas e analisadas para posterior extração de dados referentes à produção textual do resumo. O levantamento de dados foi realizado *on-line* no dia 17 de junho de 2020, sem qualquer restrição de idioma ou escopo. O critério de exclusão aplicado foi para periódicos cujas instruções aos autores era condicionadas ao acesso de sítios eletrônicos externos à SciELO e isso ocorreu em dois periódicos.

A escolha da SciELO para consulta foi justificada devido ao pungente potencial dessa base de dados em prospectar a produção científica de autores brasileiros para a comunidade científica inter-

nacional e a referida base de dados contempla a interdisciplinaridade com os mais diversos periódicos em Ciências da saúde. A SciELO é uma biblioteca promovida pela parceria entre a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, o Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde – BIREME e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Os tópicos seguintes apresentam os dados extraídos desses 95 periódicos e analisados pela ótica dos autores deste capítulo. Informações adicionais obtidas a partir de referências bibliográficas tiveram os créditos atribuídos ao longo do capítulo, bem como um quadro de lembretes, as referências bibliográficas e uma lista de sítios eletrônicos recomendados estão disponíveis na página final.

2 TÍTULO

O título é um elemento que precede o resumo e, portanto, a primeira parte do texto analisada pelo leitor e um dos principais parâmetros alvos ao compor as estratégias de busca eletrônica. Os adjetivos do título ideal perfazem uma longa lista e alguns dos mais desejáveis podem ser: atraente, completo, claro, exato, motivador, pertinente, sintético e assim por diante. Para que o título esteja o mais próximo dessa idealização, recomenda-se que o núcleo frasal contenha a principal palavra-chave do manuscrito, de modo que ela não seja repetida posteriormente entre as palavras-chave.

A redação assertiva do título pode ser alcançada elaborando-se uma curta sentença afirmativa sobre o tema, resultado ou conclusão do manuscrito. Essa afirmação deve ser coerente com os conteúdos posteriormente desenrolados ao longo do texto. Se necessário, o título pode vir acompanhado de um subtítulo que o complemente, sem que haja quebra de linha para a inserção de tal subtítulo. Considerando-se que o título tem sentido completo por si mesmo, ele constitui uma frase quando o verbo é ausente; uma

oração, quando houver verbo; ou período composto, quando houver mais que uma oração. Uma vez definido o título, espera-se que as correspondentes traduções sejam fiéis à versão original. Para isso, há periódicos que oferecem a tradução do título, bem como do resumo, e palavras-chave, para autores estrangeiros.

No contexto do parágrafo anterior, um título bem formulado cumpre as funções de: a) descrever resumidamente o manuscrito que o sucede, de forma menos aprofundada que o resumo e complementar a ele; b) fornecer embasamento para que o leitor decida se deve ou não prosseguir com a leitura para o resumo; c) quando apropriado, informar o desenho do estudo, especialmente no caso de estudo caso-controle, ensaios clínicos, revisões integrativas, revisões sistemáticas e metanálises; d) quando for o caso, informar características particulares do estudo como, por exemplo, no caso de consenso apresentado por organização ou agrupamento de organizações, consórcios, etc.; por fim, e) em conjunto com o resumo e as palavras-chave, compor elementos para rastreamento eletrônico sensível e específico do texto em banco de dados bibliográficos. Uma dica bastante útil é que a tríade título, resumo e palavras-chave seja elaborada após a escrita de todo o manuscrito.

A extensão do título varia conforme a política editorial, podendo o editor-chefe atender à solicitação justificada dos autores para que títulos acima do limite máximo de caracteres ou palavras sejam publicados. Intuitivamente, a extensão ideal do título é de uma a duas linhas impressas. Para preservar a concisão do título, redações como “avaliação do”, “considerações sobre”, “contribuição ao estudo de”, “contribuição para o conhecimento de”, “estudo da”, “estudo exploratório”, “investigação de”, “subsídios para” devem ser evitadas.

Adicionalmente, abreviações, abreviaturas, acrônimos, aspecto metodológico, fórmulas matemáticas ou químicas, adjetivos excessivos, datas, gírias, imprecisões e palavras dúbias, indicação institucional ou de localização geográfica, siglas, significado obscuro, símbolos, palavras supérfluas e pontuações são conteúdos proibiti-

vos ou raramente descritos no título. Em casos excepcionais, o título pode contemplar a explicação por extenso de termos encurtados, bem como a complementação de estado e país quando o nome de cidade for fundamental para delimitar estudos regionais.

O título pertinente embasa o leitor a decidir corretamente se o manuscrito desperta o seu interesse ou não. Preferencialmente, o título deve ser compreensível aos leitores com domínio de temáticas alheias à do manuscrito. Por outro lado, títulos redigidos equivocadamente são pouco atrativos, levando o leitor a seguir para a próxima referência da pesquisa bibliográfica.

Além do título principal do manuscrito, alguns periódicos solicitam o acréscimo de outro título, que pode ser denominado “título abreviado”, “título condensado”, “título curto” ou “título resumido”. Neste capítulo, esse título será referido de forma padronizada apenas como “título abreviado”. Em inglês, o título abreviado é traduzido como *running title*, *running head* ou *short title*.

O título abreviado é um recurso editorial alternativo, portanto, nem sempre requerido, e que informa o tópico principal do manuscrito. Quando aplicável, esse título visa reproduzir a identificação do manuscrito no vernáculo da publicação, no cabeçalho das páginas subsequentes à primeira. Em outras situações, o título abreviado se faz necessário quando o título do manuscrito é demasiadamente extenso para constar na capa do periódico, motivo pelo qual o título abreviado passa, então, a ser denominado “título de capa”. Uma vez que abreviaturas não são aceitas nesse título, a estratégia de simplesmente abreviar palavras para encurtar o título deve ser evitada.

3 RESUMO

O resumo é um texto autossuficiente, claro e conciso que apresenta a essência do manuscrito na íntegra, ou seja, qual conteúdo será oferecido ao leitor que consuma integralmente a obra. Esses aspectos qualitativos são importantes, pois o resumo é publicado

separadamente nas bases de pesquisa, devendo o leitor cumprir o laborioso trabalho de traçar o percurso seguinte até chegar ao manuscrito na íntegra. Ao contrário do título, que é um texto curto e limitado para a indexação, o resumo é a parte estratégica mais robusta da formulação de parâmetros para identificação e seleção do manuscrito em banco de dados bibliográficos. Não é exagero, portanto, ressaltar a obrigatoriedade de coerência entre o resumo e as principais partes do texto principal. Após a escrita do resumo, deve-se perguntar: ele é uma síntese que representa o trabalho de forma adequada, clara e precisa? Ele é minimamente claro para um leitor não familiarizado com a temática abordada no resumo?

O uso de abreviaturas, abreviações e siglas deve ser evitado ao máximo. Porém, esses termos se fazem convenientes quando recorrentes três ou mais vezes no texto, devendo o termo completo ser mencionado na primeira ocorrência, seguido do termo encurtado entre parênteses. Outras noções importantes para a escrita de resumos, e que podem nortear os demais textos acadêmicos, são:

- aparelhos, equipamentos e instrumentos devem vir acompanhados do nome comercial, fabricante, local de origem e símbolo sobrescrito de, por exemplo, marca registrada® ou marca comercial (*Trade Mark*) TM;
- destaques gráficos, como “aspas”, **negrito**, *itálico*, ^{sobrescrito}, sublinhado, _{subscrito} e ~~tarjado~~ só se aplicam quando normatizado pela política editorial, ou seja, só devem ser utilizados quando devidamente justificados. No entanto, se padroniza que nomes científicos e palavras em outro idioma devem ser escritos em itálico;
- drogas devem ser referidas por nomes genéricos. Fármacos e agentes terapêuticos devem ser referidos pelo nome comercial, seguido do local de origem (cidade, estado e país) ou do endereço eletrônico do fabricante entre parênteses. Em combinações terapêuticas, os termos e substân-

cias químicas podem ser abreviados, desde que explicados na primeira citação;

- elementos químicos, como citado na tabela periódica, não são considerados abreviaturas e, portanto, não carecem de definição;
- escrita dos números em décadas e séculos variam conforme o idioma e a política editorial no que se refere ao uso de número cardinal ou ordinal e algarismo arábico ou romano;
- genes e informações correlatas devem seguir as nomenclaturas e símbolos fornecidos pelo *US National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ou pela Comissão de Nomenclatura de Genes/HUGO;
- quantidades expressas em números devem ser escritas por extenso quando iniciarem a sentença ou quando estiverem abaixo de 10. Números iguais ou acima de 10 devem ser escritos em algarismos arábicos;
- resumos não comportam a citação de referência bibliográfica. Porém, nos raríssimos casos em que o uso de citação de referência seja inevitável, os dados bibliográficos completos devem ser citados no corpo do resumo;
- termos reconhecidos internacionalmente, como o Sistema Internacional de Medidas (SI), devem ser utilizados para descrever quantidades, unidades e parâmetros laboratoriais diversos (área, comprimento, massa, tempo, temperatura e volume). Esses números devem ser escritos com algarismos arábicos;
- o uso correto e não negligenciado da distinção dos sujeitos conforme sexo (conjunto de atributos biológicos) e gênero (conjunto moldado por circunstâncias sociais e culturais) deve seguir as diretrizes sobre Equidade de

Sexo e Gênero em Pesquisa (*Sex and Gender Equity in Research* – SAGER). Esse cuidado se aplica desde a documentação textual do delineamento experimental até a comunicação científica de organismos potencialmente diferenciados ou por sexo ou por gênero.

O corpo do resumo pode ser formatado como estruturado ou narrativo, conforme o uso ou não uso de subdivisão em tópicos, respectivamente. O texto deve ser escrito com sentenças curtas, com foco restrito aos aspectos centrais do estudo para o direcionamento do leitor. A formatação narrativa é um padrão comumente associado aos resumos de artigos especiais, estudos teóricos e informes técnico-institucionais. Quando o formato estruturado é solicitado, as subdivisões ou seções mais frequentes são as que refletem o conteúdo formal do manuscrito. Essa estruturação permite ao leitor identificar rapidamente tópicos como:

a) introdução, embasamento, fundamento/*background* – conteúdo inicial do resumo que contextualiza a temática e a justificativa que motivou a realização do estudo. Adicionalmente, pode-se recorrer ao tópico de **contexto**, que agrega a introdução e o objetivo do manuscrito;

b) objetivo/*aim, objectives, purpose* – elemento central do resumo que informa ao leitor qual o propósito do estudo, a hipótese testada, a questão principal ou pergunta norteadora da investigação. Ou seja, o que foi feito ou investigado? Para que o resumo tenha coerência interna, esse conteúdo deve estar obrigatoriamente alinhado com o título, com a conclusão e com o delineamento do estudo. Da mesma forma, o objetivo informado no resumo é uma prévia do objetivo localizado, geralmente, ao final da introdução no texto principal do manuscrito. Conforme as normas editoriais e disponibilidade de espaço, a introdução pode ser omitida e o resumo iniciar diretamente com o objetivo. Dica – iniciar o tópico com o verbo que melhor descreve o objetivo, conjugado no infinitivo, compondo uma oração clara, precisa, concisa e sem comentário;

c) materiais e método(s)/*material and methods* – breve descrição dos principais procedimentos empregados para se alcançar o objetivo declarado anteriormente, isto é, como o estudo foi conduzido? Quando relevante, informar sobre o desenho do estudo, descrição do grupo amostral, período de condução da pesquisa, variáveis, instrumentos, materiais, procedimentos, principais métodos observacionais e analíticos. Em artigos de revisão, esse tópico informa sobre fontes de busca de dados, critérios de inclusão/exclusão, quantitativo de referências encontradas e selecionadas. Quando estes não forem itens metodológicos centrais do texto, os detalhes técnicos e estatísticos são desnecessários no resumo.

Alternativamente aos materiais e métodos, um tópico de **dese-
nho do estudo/*desing and setting*** pode se aplicar melhor para a declaração do desenho do estudo, instituição investigada e contextualização geográfica;

d) resultados/*results, findings* – descreve os principais dados obtidos no estudo em uma frase concisa que responda à pergunta: o que foi encontrado? Se necessário, também apresentar os dados secundários aos dados principais. Os resultados incluem a caracterização mínima do grupo amostral (sem repetir os materiais e métodos), resultados qualitativos e quantitativos (médias com desvios-padrão ou medianas com amplitude), bem como a forma de análise final dos dados e, quando aplicável, o nível de evidência científica. Apenas se fundamental, fornecer detalhes estatísticos como tamanho de efeito, nível de significância e intervalo de confiança. Dados não significantes jamais devem ser apresentados com afirmações imprecisas, como simplesmente “a medida aumentou/reduziu”.

Atenção especial deve ser dada aos periódicos que vetam explicitamente a apresentação de resultados numéricos ou estatísticos no resumo. Essas recomendações podem ser divergentes entre as políticas editoriais, mas uma coisa é certa: atenção para que os resultados sejam apresentados sem exagero a fim impressionar o leitor;

e) discussão/*discussion* – via de regra, o resumo não comporta a discussão dos resultados e esse tópico conta em desfavor da qualidade da redação;

f) conclusão(ões)/*conclusions* – interpretação sucinta e as possíveis implicações dos resultados que respondam estritamente ao objetivo do estudo. A redação deve ser curta, pontual e restrita aos resultados do trabalho, evitando se prolongar com comentários, isto é, o que se pode concluir com os resultados encontrados? Porém, quando pertinente, declarar como os resultados apresentados contribuem para o estado da arte, nível de evidência e relevância clínica. Dependendo do tipo de manuscrito, as conclusões podem dar lugar a um tópico de **recomendações**/*the take home message*.

Tópicos adicionais podem melhor se adequar a outros tipos de manuscritos. Por exemplo, o resumo de artigos de revisão, revisão sistemática e metanálise podem, alternativamente, ser subdivididos em **objetivo/objective**, **fontes de dados/data source**, **estratégia de pesquisa/research strategies**, **seleção de dados/data selection**, **extração de dados/data extraction**, **síntese dos dados/data synthesis** e **conclusões/conclusions**. Já os relatos de casos podem ser subdivididos em **objetivo/objectives**, **descrição do caso/case description** e **comentários/comments**. O importante é que o tema central e a contribuição do manuscrito estejam claros no resumo e atendam às normas da política editorial de interesse. No entanto, nem todos os tipos de manuscritos publicados contemplam o resumo, como é o caso da “carta aos editores” e “editorial”.

Além do resumo escrito, **resumo gráfico/graphical abstract** é uma alternativa opcional ao resumo convencionalmente elaborado como texto escrito. O elemento diagramado nele inserido pode ser fotografia, desenho, mapa, gráfico ou qualquer outra imagem que sintetize em um único olhar as principais conclusões do manuscrito. Trata-se de um único elemento diagramado especialmente formulado com o propósito de compor o resumo gráfico ou mesmo a principal imagem do manuscrito na íntegra. Entretanto, os aspec-

tos metodológicos dessa abordagem de resumo extrapolam a perspectiva aberta no presente capítulo, que está focado no texto escrito.

4 RESUMO DE ENSAIO CLÍNICO

Estudos delineados como ensaios clínicos são identificados pelo Número de Identificação Único (ID) ou *Unique Identifier*. A Organização Mundial da Saúde – OMS considera Ensaio Clínico as pesquisas que prospectivamente designam participantes humanos para uma ou mais intervenções para avaliar os efeitos e os resultados de saúde.

No caso do Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos – ReBEC, a URL é composta pelo endereço do ReBEC seguido do ID, da seguinte forma: <http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-XXX-XXX/>. Para facilitar a identificação internacional não ambígua do ensaio clínico, a OMS abriga uma plataforma de registros internacionais de ensaios clínicos (*International Clinical Trials Registry Platform* – ICTRP) para a obtenção de um número universal de ensaio clínico denominado *Universal Trial Number* – UTN. Esses dados de identificação são validados conforme critérios da OMS e da *International Committee of Medical Journal Editors* – ICMJE. As bases de registro de ensaios clínicos estão listadas no próprio sítio eletrônico do ICMJE.

O registro de ensaios clínicos no Brasil segue a RDC da Anvisa nº 36, de 27 de junho de 2012. Para ensaios clínicos randomizados, as recomendações da extensão CONSORT (*Consolidated Standards of Reporting Trials*) para resumo devem ser adicionalmente seguidas ao elaborar o manuscrito. O número de identificação do registro e a URL do sítio eletrônico para acesso público do registro devem ser informados ao final do resumo. Os caracteres e palavras contidas nessa descrição não são contabilizados nas métricas totais do resumo. Esses dados de acesso podem ser consultados e avalia-

dos pela equipe editorial para, então, deliberar sobre o aceite ou rejeição da publicação um manuscrito.

Assim como nos ensaios clínicos, o registro do estudo é frequentemente exigido em revisões sistemáticas e metanálises, mas costuma ser opcional em estudos observacionais.

5 PALAVRAS-CHAVE

Conforme o público-alvo, partindo do mais leigo para profissionais especializados, as palavras-chave podem ser categorizadas em geral, intermediária ou específica, respectivamente (GARCIA; GATTAZ; GATTAZ, 2019). No mínimo três e no máximo de cinco a 10 palavras-chave devem ser listadas logo após o resumo, no mesmo idioma e, preferencialmente, em ordem alfabética. As palavras-chave representam o conteúdo principal do artigo e, portanto, são termos utilizados para a identificação e classificação temática do manuscrito. Esses termos abrangem um subconjunto de variantes, tais como:

a) as respectivas traduções, baseadas ou não em indexadores, como *palabras clave* em espanhol, *mots-clés* em francês e *keywords* ou *headings* em inglês;

b) *descriptors* em inglês, *descriptores*, em espanhol, ou descritores, em português, listados no vocabulário controlado como “Descritores em Ciências da Saúde – DeCS” pela Biblioteca Virtual em Saúde – BVS/Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde ou antiga Biblioteca Regional de Medicina – BIREME. Os DeCS visam padronizar os termos de indexação e recuperação de documentos científicos;

c) termos do *Medical Subject Headings* – MeSH, que visam organizar os vocábulos da National Library of Medicine – NLM de forma controlada e hierarquizada.

Além dos DeCS/MeSH, outros índices podem ser recomendados, conforme o escopo do periódico, tais como o *Nursing Thesaurus*

do *Internacional Nursing Index*, *Key Words in Anesthesiology* ou o *Sociological Abstracts*. Se por um lado alguns periódicos toleram o uso termos livres, outros exigem que as palavras-chave sejam baseadas exclusivamente nos DeCS/MeSH, nos respectivos idiomas dos resumos. Em idiomas distintos, as palavras-chave de um manuscrito devem ser traduzidas de forma fidedigna, evitando-se interpretações divergentes ou conflitantes.

Enquanto o título e o resumo são os elementos sequencialmente mais lidos de um manuscrito, as palavras-chave muitas vezes passam despercebidas pela atenção do leitor. As palavras-chave, entretanto, não são menos importantes no resumo, pois fazem parte fundamental da indexação múltipla em bancos de dados bibliográficos. A diversificação de palavras utilizadas no título, no resumo e nas palavras-chave é uma estratégia que potencializa as chances de o manuscrito ser localizado pelo leitor em uma busca bibliográfica e, conseqüentemente, impacta nas métricas de citação. As combinações de termos diversificados são enriquecidas pela escolha de palavras sinônimas, antônimas, correlatas, palavras homógrafas, termos compostos, dentre outras. Entretanto, descrições institucionais, dados numéricos ou estatísticos não configuram como possíveis palavras-chave.

A PubMed, base de dados especializada em ciências biomédicas e ciências da vida foi desenvolvida pelo U.S. *National Institutes of Health* (NIH) e administrada pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). É uma base de acesso público, indexa a literatura especializada nas áreas de ciências biológicas, enfermagem, odontologia, medicina, medicina veterinária e saúde pública. Por ser uma ampla base de consulta, é constantemente utilizada e a busca por artigos de interesse pode ocorrer de forma simples a mais avançada. Uma das facilidades é que, ao executar consultas no PubMed, o pesquisador não busca apenas por palavras-chave [MeSH], mas também por termos de texto livre, ou seja, termos que ainda não foram atribuídos como MeSH ou alguns sinônimos (MASTERSON *et al.*, 2019).

Para executar essa consulta mais específica, a PubMed oferece código dos campos de busca, colocados entre colchetes, que possuem a função de direcionar a busca para um determinado tópico do artigo, por exemplo o Título (código: [TI]), ou o resumo ou abstract (código: [AB]). A busca combinada por termos livres no título ou resumo pode ser realizada utilizando-se a combinação “*Title+Abstract*” (código [TIAB]) (VRIJE UNIVERSITEIT AMSTERDAM, 2020).

Ao utilizar na consulta o termo [tiab] após cada termo livre, a busca vai restringir e pesquisar termos de interesse no título e no resumo, selecionando artigos mais relevantes e de interesse do pesquisador. Quanto mais termos livres forem utilizados, mais resultados de pesquisa e artigos de interesse serão selecionados. Uma dica para a escolha de termos livres é adotar palavras usadas nos resumos de artigos relevantes para o pesquisador (VRIJE UNIVERSITEIT AMSTERDAM, 2020).

6 RESUMO COMO REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Resumos publicados em anais de eventos científicos (congressos, cursos/minicursos, encontros, seminários, simpósios, oficinas, *workshops*, etc.) e em suplemento de periódicos são eventualmente aceitos como referência bibliográfica. Essas são publicações preliminares e que, portanto, se adiantam às publicações científicas na íntegra. Por ser fonte de consulta para conhecimentos ainda inéditos, a citação de resumos pode ter validade restrita por curto período como, por exemplo, dois a cinco anos desde a publicação. Uma explicação razoável para a estipulação de tal intervalo de tempo é estabelecer um prazo para que o conteúdo preliminarmente apresentado no resumo seja ratificado por um manuscrito publicado na íntegra.

Adicionalmente, resumos de eventos são potenciais referências de difícil acesso e não indexadas. Esse perfil de publicação é denominado como “literatura cinzenta”, abrangendo documentos

oficiais, legislação, livros, manuais, normas, produtos finais de curso e demais publicações não indexadas.

A maioria das políticas editoriais é categórica ao vetar a citação de resumos e exige a citação apenas de referências consultadas na íntegra pelos autores. Quando aceita, recomenda-se que a citação de resumos seja evitada; que ocorra apenas se imprescindível; e que a condição de resumo seja devidamente informada no rodapé da página ou nos créditos da citação. Em outros casos, a política editorial permite a menção dados oriundos de eventos científicos, mas sem que isso seja citado entre as referências bibliográficas. Igual tratamento é frequentemente destinado aos dados oriundos de artigos no prelo, observações não publicadas e comunicações pessoais.

A aceitabilidade como referência bibliográfica é profícua no caso de resumo aprovado, por exemplo, em evento ou periódico de relevância internacional e com criteriosa comissão científica. Um exemplo bastante ilustrativo sobre isso é o volume 58 do periódico *Cytogenetic and Genome Research*, publicado em 1991. Esse volume publicou milhares de resumos do evento “*London Conference (1991) – Eleventh International Workshop on Human Gene Mapping*”, que são referências bibliográficas marcantes para a genética humana, apesar de serem apenas resumos. Esse exemplo, entretanto, é um marco excepcional e não uma recomendação para que resumos sejam usados como referências bibliográficas de forma indiscriminada. Por outro lado, vale o incentivo para se publicar resumos em eventos altamente competitivos como o deste exemplo.

Outra situação peculiar é que dissertações e teses podem ser aceitas para publicação no formato de resumo até 12 meses após a aprovação em defesa pública, conforme a política editorial do periódico. Esses resumos não são considerados literatura cinzenta por se inserirem em volumes de periódicos científicos. Além dos dados regularmente encontrados nos resumos científicos, os resumos de dissertações e teses elencam dados institucionais do programa de pós-graduação, dos orientadores, de composição da

banca examinadora e data da defesa. Mais que referências bibliográficas propriamente ditas, esses resumos podem direcionar o leitor na busca de dissertações e teses em acervos institucionais.

Por fim, o fornecimento de resumos estratégicos quanto ao título, corpo do resumo e palavras-chave é um requisito fundamental para que estudos de prática baseada em evidência sejam bem-sucedidos. O delineamento preciso de revisões sistemáticas, metanálises, revisões qualitativas e revisão integrativa envolve inicialmente o levantamento de referências bibliográficas pelo uso de palavras-chave em bancos de dados bibliográficos. Em uma etapa seguinte, parte dessas referências é selecionada pela análise preliminar dos títulos e resumos para, em uma posterior etapa de análise, selecionar as referências pelo texto na íntegra. Esse intrincado percurso para se alcançar o estado da arte e evidências científicas concretas perpassam pela competente escrita resumos científicos. Nesse caso, o conjunto de dados do resumo é parte do objeto analisado e, quando incluso após análise do texto na íntegra, citado como referência bibliográfica (GARCIA; GATTAZ; GATTAZ, 2019).

7 RESUMO COMO PARTE DA CARTA DE SUBMISSÃO

A **carta de submissão/cover letter** é o documento inicial de interlocução entre o autor correspondente e a equipe editorial, representada pelo editor-chefe. Os propósitos dessa carta são: a) apresentar os autores, as respectivas instituições e o manuscrito em si; b) justificar a motivação para a escolha do periódico ou da editora; c) justificar como o manuscrito se encaixa no escopo do periódico ou da editora; d) atestar a originalidade do manuscrito; e e) informar um resumo que descreva a natureza do manuscrito.

O resumo pode ser o mesmo informado no corpo do manuscrito ou pode um breve parágrafo redigido em consonância com a totalidade da carta. Em ambos os casos, a questão central da pesquisa, materiais e métodos, resultados e conclusões mais impor-

tantes devem ser informados, bem como a expectativa de impacto inovador desses dados para o conhecimento existente.

8 CONFLITO DE INTERESSE NO RESUMO

Os conflitos de interesse envolvendo resumos são de múltiplas ordens, como descrito abaixo:

- apesar de incomum, a política editorial pode considerar que um trabalho previamente publicado como resumo teve o direito autoral transferido para o evento no qual foi apresentado ou para o periódico que o publicou. Em tais situações, a publicação do manuscrito na íntegra fica condicionada à autorização formal da organização que atualmente detém o direito autoral do resumo;
- em outros casos, resumos apresentados em eventos ou publicados em periódicos são caracterizados como publicação parcial dos dados e, portanto, sem ineditismo do trabalho para publicação na íntegra. Essa situação se agrava quando o texto relata integralmente os dados. Um parâmetro frágil, mas adotado por alguns periódicos, é a inferência de que a originalidade do material é preservada se a prévia publicação do resumo não ultrapassar 400 palavras.
- resumos sobre produtos ou equipamentos com finalidade comercial ou propagandística. Esse tipo de publicação científica é vetado pela Resolução CFM no. 1.595/2000;
- um procedimento de praxe e de ordem legal na comunidade científica é a citação das fontes financiadoras e de fomento ao final do texto, quando houver espaço destinado para isso no resumo isolado. Quando o resumo está inserido em um manuscrito na íntegra, as fontes de recursos são citadas para todo o manuscrito e não apenas no resumo;

9 PARÂMETROS QUANTITATIVOS DOS RESUMOS

Em geral, espera-se que o resumo tenha entre 100 e 250 palavras (GARCIA; GATTAZ; GATTAZ, 2019). Entretanto, os quantitativos dos elementos que constituem o resumo variam drasticamente entre periódicos (Quadro 1).

Essas métricas impactam na categorização do texto, pois resumo demasiadamente extenso pode ser categorizado como expandido e, dessa forma, descaracterizar o ineditismo dos dados. Adicionalmente, resumos muito longos podem ser truncados pelas plataformas eletrônicas das bases de dados bibliográficos, o que compromete a difusão da produção científica.

10 ASPECTOS ORTOGRÁFICOS E GRAMATICAIS

Por se tratar de um texto científico, os autores devem ter especial atenção à aplicação correta das regras de ortografia e gramática. Esses cuidados prezam pelo rigor linguístico do texto e preservam a clareza da informação para o leitor. Baseados em avaliações rigorosas e na premissa de que a ciência só ocorre se for compartilhada, as equipes editoriais e os revisores por pares demandam textos cuja qualidade global alavancam as métricas de visibilidade acadêmica, como: número de visualizações, de *downloads*, de compartilhamento e de citações (GARCIA; GATTAZ; GATTAZ, 2019).

Preferencialmente, o resumo deve se apoiar em sentenças curtas, na forma direta, ativa e com o tempo verbal consistente ao longo do texto. Por outro lado, o resumo deve se abster de frases longas ou repetitivas, uso equivocado da tecla *enter*, múltiplos espaços entre palavras ou após pontuação. Tanto em português quanto em outro idioma, os autores são encorajados a submeter previamente o texto para um profissional especializado em revisão linguística ou em tradução.

Quadro 1 – Parâmetros quantitativos mínimos e/ou máximos para escrita de resumos, conforme periódicos científicos da Área da Saúde indexados na SciELO

Tipo de manuscrito	Resumo		Formato	Palavras-chave	Título	Título abreviado
	Mín.	Máx.				
Original (inclusive revisão sistemática e metanálise)	150 palavras	250 a 600 palavras 1.700 caracteres	Parágrafo único Estruturado ou narrativo	Três a dez	Até 10 a 80 palavras Até 250 caracteres	Até 12 palavras Até 100 caracteres
Comunicação breve	–	200 palavras		Três a seis	Até 150 caracteres	Até 50 caracteres
Atualização/revisão	–	300 palavras		Seis		
Relato de caso/Caso clínico	–	N/A ou até 250 palavras		Três a seis		
Editorial	N/A	N/A	N/A	N/A	Até 150 caracteres	Até 50 caracteres
Carta aos editores					N/A ou até 150 palavras	N/A ou até 50 palavras
Comentários	–	150 palavras	–	–	–	–

Fonte: <https://www.scielo.br/>
Caracteres incluem os espaços; quando especificado, artigos e preposições não contam como palavras; N/A = não se aplica; – = sem informação.

11 ANÁLISE CRÍTICA DO RESUMO PELA PERSPECTIVA DA IDENTIDADE INTERDISCIPLINAR

O resumo é um texto que deve contemplar resposta a cada uma das seguintes perguntas: “o que o pesquisador fez?”, “como a pesquisa foi conduzida?”, “o que o pesquisador descobriu?” e “o que o pesquisador concluiu?” (GARCIA; GATTAZ; GATTAZ, 2019). Essas respostas são concatenadas em quatro “movimentos” de tamanhos variáveis e hibridizáveis (Quadro 2).

Quadro 2 – Padrão didático para organização de estratégias conforme os “movimentos” do resumo

Movimentos	Introduzir o propósito	Descrever a metodologia	Sintetizar os resultados	Apresentar as conclusões
Estratégias → O que informar?	Intenção	Metodologia	Considerações	Interpretação
	Hipótese	Objeto/sujeito	Dados	Inferências
	Objetivo(s)	Procedimentos	Proposições	Implicações
	Problema	Escopo	–	Aplicações

Fonte: Bathia (1993 *apud* CARVALHO, 2010).

Carvalho (2010) argumenta que as estratégias percorridas nos “movimentos” dos resumos se flexibilizam conforme as áreas do conhecimento, exatamente pelo fato da linguagem variar conforme a função almejada e o contexto da situação. A construção linguística do resumo é um processo alicerçado nos domínios de saberes envolvidos e, por isso, pode enfatizar distintamente a importância dos campos dos participantes da pesquisa, dos processos envolvidos e das circunstâncias. Em especial no que concerne à interdisciplinaridade, estratégias heterogêneas podem confluir na organização textual dos resumos como gênero acadêmico.

A apropriação do saber com outras áreas do conhecimento reflete, portanto, nos resumos vinculados aos projetos e produção

científica de programas de pós-graduação interdisciplinares, como é o caso do PPG CAPS, cuja área de concentração abrange pesquisa, desenvolvimento, obtenção e monitoramento de produtos aplicáveis à saúde humana e animal.

Lembretes

1. Seguir rigorosamente as instruções aos autores; 2. Seguir guidelines internacionais; 3. Formular o título cuidadosamente; 4. Racionalizar o uso de palavras na introdução; 5. Delimitar claramente o objetivo do estudo; 6. Detalhar suficientemente a metodologia; 7. Citar achados pontuais, específicos e precisos.	8. Concluir de forma realista; 9. Evitar neologismos, abreviações e gírias; 10. Fazer cuidadosa revisão linguística; 11. Reduzir o uso de abreviaturas; 12. Construir o texto em equipe; 13. Elaborar o texto com antecedência; 14. Se abster de citar referência.

Fonte: Caramelli (2011); Ferreira e Patino (2018); Garcia, Gattaz e Gattaz (2019).

Atalhos para sítios eletrônicos interessantes

- *ClinicalTrials.gov*
- Descritores em Ciência da Saúde – DeCS
- Medical Subject Headings – Home Page ou <https://meshb.nlm.nih.gov>
- International Committee of Medical Journal Editors – ICMJE ou <http://www.icmje.org/>
- “Normas para apresentação de artigos propostos para publicação em revistas médicas”, da ICMJE (Rev Port Clin Geral 1997; 14:159-174)
- Registro Brasileiro de Ensaio Clínico – ReBEC
- International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP)
- The Universal Trial Number (UTN)
- Consort – Welcome to the CONSORT Website

- RDC da Anvisa nº 36, de 27/06/2012
- International System of Units (SI), 8th ed. 2006
- Manual do Editorial – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA
- Sex and Gender Equity in Research: rationale for the SAGER guidelines and recommended use
- ou <https://doi.org/10.5123/s1679-49742017000300025>
- Rede EQUATOR – *Enhancing the QUALity and Transparency Of health Research*
- International System of Units from NIST
- HomePage – Sense About Science Blog
- *A roadmap for searching literature in PubMed: tiab-terms*

REFERÊNCIAS

CARAMELLI, B. Resumo: o trailer da comunicação científica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 6, p. 607, dic. 2011.

CARVALHO, F. F. Padrões de organização textual e lexicogramatical do gênero acadêmico resumo de tese: um estudo de caso. **Trabalhos em Linguística Aplicada**, v. 49, n. 1, p. 115-128, 2010.

FERREIRA, J.C.; PATINO, C.M. Twelve tips to write an abstract for a conference: advice for young and experienced investigators. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 4, p. 260-260, 2018.

GARCIA, D. C.F.; GATTAZ, C. C.; GATTAZ, N. C. The relevance of title, abstract and keywords for scientific paper writing. **Journal of Contemporary Administration**, v. 23, n. 3, p. 1-9, 2019.

GRANDE DICIONÁRIO HOUAISS. **Verbetes Resumo**. Disponível em: www.houaiss.uol.com.br. Acesso em: 30 jan. 2020.

MASTERSON, D.; NASCENTES, D.; PONCIANO, É.; BARCELOS, M.; GALDENCIO, R. **Orientações sobre o Processo de Busca**. Rio de Janeiro: Biblioteca Central, Centro de Ciências de Saúde, UFRJ. 2019.

VRIJE UNIVERSITEIT AMSTERDAM. University Library. **A roadmap for searching literature in PubMed: tiab-terms**. Disponível em: <https://libguides.vu.nl/PMroadmap/tiab>. Acesso em: 30 jan. 2020.



Capítulo 17

MÉTODOS DE COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

Gênero resenha

ANDREIA JULIANA RODRIGUES CALDEIRA
OLIRA SARAIVA RODRIGUES
FLÁVIO MONTEIRO AYRES

1 INTRODUÇÃO

A redação científica, em contexto acadêmico, demanda uma prática construída e contextualizada a partir de uma série de competências interligadas à leitura e à escrita, cuja importância de preparação é premente, uma vez que se reconhece um grande percentual de estudantes universitários no Brasil, sem ter desenvolvido habilidades de interpretação e escrita suficientes.

Estabelecer a redação científica, com estratégias práticas delineadas em busca de um rigor discursivo e metodológico para a melhoria da qualidade no que tange às produções textuais acadêmicas, tanto para graduação quanto pós-graduação no campo de conhecimento das ciências, é o intuito da pesquisa, viabilizando uma produção acadêmica com rigor discursivo e metodológico por parte dos discentes.

Sabe-se que o percurso acadêmico em escritas científicas requer três domínios para que haja êxito: a) domínio de conteúdo para o conteúdo propriamente dito; b) domínio de conteúdo para o aspecto metodológico; e c) domínio linguístico para a forma. O domínio de

conteúdo é adquirido a partir de disciplinas e orientações de áreas específicas. O domínio metodológico tem a finalidade de percorrer métodos apropriados para subsidiar o percurso investigativo e o domínio linguístico se constitui no intuito de promover uma escrita clara, objetiva, coesa e coerente, com criticidade por meio de capacidades de interpretação e produção científica com rigor.

Faz-se necessário, para tanto, um processo de aculturação, por meio de condições didático-pedagógicas para desenvolve habilidades necessárias de produção científica. Desse modo, este escrito, em específico, será direcionado para a forma, a partir de uma orientação de redação científica do gênero textual resenha acadêmica, em sua relação conceitual, tipológica e apresentação de instruções, com a finalização de análises de resenhas na área de saúde.

2 CONCEITO E TIPOLOGIA

A resenha acadêmica apresenta algumas características que difere de outros gêneros textuais. Em gêneros, Marcuschi (2008) salienta que “quando se fala em uso e função, não se ignora a existência de formas” (p. 62) e sua seleção requer atenção. O autor diverge da corrente teórica sócio-histórica cultural que:

Preocupa-se com a organização social e as relações de poder que os gêneros encapsulam. Tem uma visão histórica dos gêneros e os toma como altamente vinculados com as instituições que os produzem. A atenção não se volta ao ensino, e sim para a compreensão do funcionamento social e histórico, bem como sua relação com o poder (MARCUSCHI, 2008, p. 153).

Para ele, a linguagem, como um todo, é compreendida como atividade humana, portanto dinâmica, e assume diversas formas, para cumprir seu papel comunicativo-interativo, reconhecidas como gêneros textuais.

É importante mencionar que um texto poderá ser classificado como um ou mais gêneros, sendo sempre um prevalecente, como uma questão de mescla de funções e formas de gêneros diversos num dado gênero. O predomínio da função supera a forma na determinação do gênero, o que evidencia a plasticidade dos gêneros.

Para Pietrafesa e Borba (2009), “resenhar significa fazer um levantamento das características de um texto, enumerando seus aspectos relevantes, descrevendo as circunstâncias que o envolvem, as condições de produção e de recepção do discurso” (p. 96). O autor ainda salienta uma característica de texto técnico-científico, no entendimento da objetividade em uma linguagem técnica, portanto, há um estilo estrutural de linguagem que permite que o texto seja caracterizado como resenha.

A resenha, por assim dizer, também pode ser encontrada em outros ambientes, espaços não acadêmicos, como jornais, revistas e internet, sendo resenhas de livros, filmes, em sua maioria. A procura de leitura de resenhas, quase sempre, justifica-se por busca de interpretações, muitas vezes críticas, de uma determinada obra.

Assim, a resenha instrumentaliza o indivíduo a olhar de forma mais exigente, podendo recorrer, inclusive, a várias resenhas sobre o mesmo objeto, a fim de compará-las. É um texto que permite, então, um comportamento mais crítico frente aos bens de consumo postos ao leitor, pelo viés da avaliação, seção importante na construção de uma resenha (RODRIGUES, 2013, p. 275).

A resenha acadêmica pressupõe uma conexão entre aspectos textuais da linguagem e aspectos contextuais do local da escrita, no caso, da academia. Importante salientar que resenhas acadêmicas são construídas a partir da variedade culta, de acordo com a linguagem para ambientes universitários.

Uma das grandes dificuldades dos acadêmicos, de um modo geral, é tecer a diferenciação entre os gêneros textuais resumo e resenha, diante da proximidade, pois a resenha apresenta resumo em sua composição. No entanto, o resumo não aceita o acréscimo de nenhum discurso além do já existente no texto resenhado, já a resenha mescla resumo com descrições e/ou análises, de acordo com sua tipologia.

As duas principais tipologias de resenha em ambiente universitário são: resenha descritiva/informativa e resenha crítica/opinativa. Naquela, o autor se limita à descrição, sem repetição, mas ressaltando distintos aspectos do conteúdo. Esta, além da descrição, apresenta um julgamento diante da obra resenhada, havendo uma apreciação crítica em vários aspectos, por meio de argumentações.

Uma propriedade marcante no gênero resenha diz respeito ao seu caráter político, visto que requer um posicionamento do autor diante da obra analisada, em diálogo, inclusive com outras obras e autores, na compreensão de que o conteúdo temático, o estilo e a construção composicional estão indissoluvelmente ligados e são igualmente determinados pela especificidade de um determinado gênero textual.

Destarte, a criticidade torna-se elemento fundante na resenha. Leituras anotadas, concentradas e aprofundadas, observando toda a estrutura textual, com zelo para não distorcer ideias e pensamentos do texto resenhado torna-se essencial para todo resenhador elaborar um texto descritivo, analítico e reflexivo.

3 PANORAMA DO GÊNERO RESENHA NA ÁREA DA SAÚDE

O surgimento das resenhas se deu no século XVII, em revistas cultas como o *Journal des Savants*, de Paris, e a *Philosophical Transactions*, da *Royal Society* de Londres, veiculando conhecimento acadêmico (RODRIGUES, 2013). Porém, apesar de resistir ao tempo, e do valor científico atribuído, a resenha ainda é pouco explorada na área da saúde.

Capítulo 17

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA – GÊNERO RESENHA

Em uma busca, a partir da base de dados *web of Science*, sem restrição de datas e idiomas, utilizando-se as palavras-chave “resenha” e “saúde”, 40 referências foram recuperadas. Dessas resenhas, seis foram sobre vídeos, uma sobre artigo científico e 32 sobre livros (Quadro 1).

Quadro 1 – Acervo de resenhas com temática da saúde em 34 periódicos do *web of Science*

	Citação da resenha	Citação da obra	Tipo de obra
1a	PITTA, A. M. R.. O balanço de um século da saúde pública no Brasil: resenha sobre o vídeo “Políticas de saúde no Brasil: um século de luta pelo direito à saúde.” Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde , v. 4, n. 4, 2010.	Título Original: Políticas de saúde no Brasil: um século de luta pelo direito à saúde. Direção: Renato Tapajós. Duração: 60 minutos. Ano de Produção: 2006. O vídeo foi realizado por iniciativa da Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa, do Ministério da Saúde, em parceria com a Organização Pan-Americana da Saúde (Opas) e a Universidade Federal Fluminense (UFF).	vídeo
1b	PEREIRA, M. O humano acima de tudo. Resenha sobre o vídeo: Do luto à luta. RECIIS – Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde . Rio de Janeiro, v.4, n.2, p.63-66, 2010.	Título Original: Do Luto à Luta Gênero: Documentário Tempo de Duração: 75 minutos Ano de Lançamento: 2005 Estúdio/Distrib.: Mais Filmes Direção: Evaldo Mocarzel Formato: Avi – Tamanho: 996Mb Tema: Síndrome de Down	vídeo
1c	SILVA, M. M. R. Gomes da. Parir é natural. Resenha sobre o vídeo: Parir é natural. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde 2016 abr.-jun.; 10(2) [www.reciis.iciict.fiocruz.br] e-ISSN 1981-6278.	Documentário Parir é natural (2015), do diretor Silvio Tendler e realizado com apoio do Selo Fiocruz Vídeo, da VideoSaúde Distribuidora da Fiocruz. https://www.arca.fiocruz.br/handle/iciict/15947 .	vídeo
1d	NETTO, M. M. L. Zika pela voz das mulheres. Resenha sobre o vídeo: Zika pela voz das mulheres. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde , v. 10, n. 3, 2016.	Zika (2016), dirigido pela antropóloga e coordenadora da organização feminista não governamental Anis – Instituto de Bioética, Debora Diniz.	vídeo

Capítulo 17 COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA – GÊNERO RESENHA

	Citação da resenha	Citação da obra	Tipo de obra
1e	MEIRELLES, L. C. O veneno está na mesa 2. Resenha sobre o vídeo: O veneno está na mesa 2. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde , v. 8, n. 3, 2014.	O veneno está na mesa 2. Diretor: Silvio Tendler Produção: Maycon Almeida Produtora: Caliban Cinema e Conteúdo Roteiro: Silvio Tendler Fotografia: Xeno Veloso Ano: 2014 País: Brasil Gênero: documentário Cor: colorido Duração: 71 minutos Disponível em: http://www.youtube.com/watch?v=fyvoKljtvG4	vídeo
1f	AURELIANO, W. A. Genética, saúde e sociedade. Resenha sobre o vídeo: Quatro Heranças – Genética Médica Populacional. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde , v. 7, n. 3, 2013.	Documentário: Quatro Heranças – Genética Médica Populacional Direção: Gabriel Faccini Ano: 2012 / Duração: 53 min/cor/Brasil Produção: Verte Filmes Disponível na Internet em https://vimeo.com/53109501 (com legendas em inglês).	vídeo
1g	GARCIA, M. P.; BARDANACHVILI, E.; DA SILVA, L. T. B.; RIBEIRO, L. S.; COSTA, S. L. M. 'SiCKO-SOS Saúde' e a mercantilização da vida. Resenha sobre o vídeo: SiCKO. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde , v. 9, n. 3, 2015.	Diretor: Michael Moore Produção: Dog Eat Dog Productions e The Weinstein Company Roteiro: Michael Moore Título original: SiCKO Ano: 2007 País de origem: Estados Unidos da América Gênero: documentário Cor: Colorido Duração: 123 minutos.	vídeo
2	JUNIOR, H. L. R. Resenha referente ao livro: TRENT, RJA (ed.). Clinical Bioinformatics, Methods in Molecular Biology, vol. 1168, Springer Science+ Business Media, New York: 2014. Journal of Health Informatics , v. 6, n. 4, 2014.	TRENT, R. J. A., editor. Clinical Bioinformatics. Methods in Molecular Biology . 2th Ed. v.1168, New York: Springer Science+Business Media; 2014.	livro

	Citação da resenha	Citação da obra	Tipo de obra
3	HARTZ, Z. “Compreendendo o sistema de saúde para uma melhor gestão”: resenha ilustrada da sua complexidade. Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical , v. 16, p. 77-81, 2017.	PINEAULT, R. Compreendendo o sistema de saúde para uma melhor gestão. Brasília: Conass , 2016.	livro
4	MACHADO, C. J.; PEREIRA, C. A. Instrumentos de coleta de dados na Saúde Pública: resenha crítica da obra de Monteiro e Horta. Caderno de Saúde Coletiva , v. 22, n. 4, p. 434-438, 2014.	MONTEIRO, Gina Torres Rego; DA HORA, Henrique Rego Monteiro. Pesquisa em saúde pública: como desenvolver e validar instrumentos de coleta de dados . Editora Appris, 2013.	livro
5	GARCIA, J. M. Saúde mental na escola: o que os educadores devem saber. Psico-USF , Bragança Paulista, v. 21, n. 2, p. 423-425, 2016.	ESTANISLAU, Gustavo M.; BRESSAN, Rodrigo Affonseca. Saúde mental na escola: o que os educadores devem saber . Artmed Editora, 2014.	livro
6	NARDI, A. C. F.; MALTA, D. C.; SOUZA, M. D. F.; M. D., DUARTE, E., FERREIRA, H. L., DUARTE, E. C.; GARCIA, L. P. Resenha do livro Saúde Brasil 2014: uma análise da situação de saúde e das causas externas. Epidemiologia e Serviço de Saúde , v.24, n.4, p.803-804, 2015.	Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Saúde Brasil 2014: Uma análise da situação de saúde e das causas externas . Brasília: Ministério da Saúde; 2015.	livro
7	LORENSET, R. B. C.; LANFREDI, A. A. Produção acadêmico-científica no curso de educação física: resenha crítica. Anuário Pesquisa e Extensão Unoesp Xanxerê , v. 5, p. e24639-e24639, 2020. https://bit.ly/30HTiFx .	FLORINDO, A. A. Promoção da atividade física e da alimentação saudável e a saúde da família em municípios com academia da saúde. Revista Brasileira de Educação Física e Esporte , v. 30, n. 4, p. 913-924, 2016.	artigo
8	CRUZ, J. I. Resenha nacional: planos de saúde-doutrina, jurisprudência e legislação. Revista de Direito Sanitário , v. 16, n. 3, p. 241-246, 2015.	AGUILLAR, F. H. F.; BARBUGIANI, L. H. S. Coleção direito econômico-Planos de saúde . Saraiva Educação SA, 2017.	livro

Capítulo 17 COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA – GÊNERO RESENHA

	Citação da resenha	Citação da obra	Tipo de obra
9	DALLARI, S. G. Vigilância Sanitária: proteção e defesa da saúde. Revista de Direito Sanitário , v. 1, n. 1, p. 138-140, 2000.	COSTA, E. A. Vigilância sanitária: proteção e defesa da saúde . 1999.	livro
10	MACHADO, L. V.; LESSA, P. dos S. Resenha "Medicalização da vida: ética, saúde pública e indústria farmacêutica". Psicologia & Sociedade , v. 24, n. 3, p. 741-743, 2012.	CAPONI, S. Medicalização da vida: ética, saúde pública e indústria farmacêutica . 2010.	livro
11	WINOGRAD, M.; SOLLERO-DE-CAMPOS, F.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Resenha: um diálogo entre a psicanálise e a neurociência. Psicologia: Teoria e Pesquisa , v. 21, n. 1, p. 121-122, 2005.	ANDRADE, V. M. Diálogo Entre a Psicanálise e a Neurociência . Casa do Psicólogo, 2003.	livro
12	BARBOSA, R. M. dos S. P. Resenha do livro "Atividade Física, Saúde e Qualidade de Vida: conceitos e sugestões para um estilo de vida ativo", de Markus Vinicius Nahas. Revista Brasileira de Ciências do Esporte , v. 34, n. 2, p. 513-518, 2012.	NAHAS, M. V. Atividade física, saúde e qualidade de vida: conceitos e sugestões para um estilo de vida ativo . 5. ed. rev. atual. Londrina: Midiograf, 2010. 318p.	livro
13	VAREJÃO, C. S., BORGES, G. G., NUNES, L.M.P. Farmacêuticos, terapêutica oncológica para enfermeiros e. Artigo resenha de livro. Revista de enfermagem da UFPE on line , v.8, n. 12, p.4406-4407, 2014.	BONASSA, E. M. A.; GATO, M. I. R. Terapêutica oncológica para enfermeiros e farmacêuticos. In: Terapêutica oncológica para enfermeiros e farmacêuticos . 2012. p. 644-644.	livro
14	LIMA, M. E. A. O resgate de uma dívida: resenha do livro Escritos de Louis Le Guillant-da Ergoterapia à Psicopatologia do Trabalho. Cadernos de Psicologia Social do Trabalho , v. 9, n. 2, p. 109-111, 2006.	LE GUILLANT, L. Escritos de Louis Le Guillant: da ergoterapia à psicopatologia do trabalho . Vozes, 2006.	livro

	Citação da resenha	Citação da obra	Tipo de obra
15	CARDOSO, T. M.; LIMA, E. M. F. de A. Experiências brasileiras em saúde mental e arte: contribuições singulares em um campo de pluralidade. Resenha: Saúde Mental e Arte: Práticas, Saberes e Debates, de Paulo Amarante e Fernanda Nocam (orgs.). São Paulo, Ed. Zagodoni, 2012. 224 p. Revista de Psicologia da UNESP , p. 103-105, 2013.	AMARANTE, P., NOCAM, F. Saúde Mental e Arte: Práticas, Saberes e Debates . São Paulo: Zagodoni, 2012	livro
16	MASSARANI, L. 'Creative Research Communication—Theory and Practice'. Book Review. Journal of Science Communication , v. 16, n. 05, 2017.	WILKINSON, C.; WEITKAMP, E. Creative research communication — theory and practice . Manchester, u.k.: manchester university press, 2016.	livro
17	ALMEIDA, C. Global health: history, contexts, and strategies. Book Review. Cadernos de Saúde Pública , v. 34, n. 3, 2018.	BIRN, A. E.; PILLAY, Y.; HOLTZ, T.H. Textbook of global health . 4th, Ed., New York: Oxford University Press, 2017, 673p. p. ISBN: 9780199392285.	livro
18	SILVA FILHO, O. C. Saúde mental infantojuvenil e desastres: um panorama global de pesquisas e intervenções Book Review. Caderno de Saúde Pública 2020; 36(7):e00064120.	HOVEN, C.W., AMSEL, L.V., TYANO S. C. An international perspective on dis-asters and children's mental health . Springer; 2019. 439 p. (Series: Integrating Psychiatry and Primary Care). ISBN 978-3-030-15872-9.	livro
19	VIANNA, A. C. F. Mediações e pesquisas na área de comunicação e saúde. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde . 2019 jan-mar.;13(1).	SACRAMENTO I, organizador. Mediações comunicativas da saúde . Rio de Janeiro: Multifoco; 2017.	livro

	Citação da resenha	Citação da obra	Tipo de obra
20	ALVES, F. “Saber Prático de Saúde. As lógicas do Saudável no Quotidiano” discute os conceitos do saudável e do bem-estar, e revela a sua contingência social e cultural. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde , v. 5, n. 4, 2011.	PORTO, L. F. da S., Porto. Saber Prático de Saúde. As lógicas do Saudável no Quotidiano , Edições Afrontamento, 2008 ISBN-13: 9789723609110.	livro
21	LINDNER, L.; KABARITE, E. A Botica de Ontem e a Farmácia de Hoje: Balcões de procura de alento. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde , v. 5, n. 2, 2011.	EDLER, F. C. Boticas & farmacias: uma história ilustrada da farmácia no Brasil . Rio de Janeiro: Casa da Palavra, 2006. 160 p. ilus. ISBN: 857734004X.	livro
22	GALVÃO, M. C. B. Prontuário do paciente. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde Rio de Janeiro, v.7, n.2, 2013.	GALVÃO, M. C. B.; RICARTE, I. L. M. Prontuário do Paciente . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. ISBN 978-85-2144-8.	livro
23	LOPES, M. H. B. de M. Health Communication: from theory to practice. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde . Rio de Janeiro, v.3, n.2, p.76-78, 2009.	SCHIAVO, R. Health communication: From theory to practice . Jossey-Bass, San Francisco; 2007 ISBN 978-0787982058.	livro
24	ALMEIDA, C. QUITO, M. V. Public health & human rights – Evidence-based approaches. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde . Rio de Janeiro, v.2, Sup.1, p. Sup.101-Sup.106, 2008.	BEYER, C; PIZER, H. F. Public health & human rights – Evidence-based approaches , Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2007 ISBN: 978-0801886478.	livro

	Citação da resenha	Citação da obra	Tipo de obra
25	TRIGUEIRO, M.; FREITAS, C. Dr. Golem – How to think about medicine. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde . Rio de Janeiro, v.2, n.2, p.118-121, jul.-dez., 2008.	COLLINS, H.; PINCH, T. Dr. Golem – How to think about medicine , Chicago and London: The University of Chicago Press; 2005 ISBN: 978-0226113661.	livro
26	ROLLA, V. C DE-OLIVEIRA, M. S. On the Take: How Medicine's Complicity with Big Business Can Endanger your Health. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde . Rio de Janeiro, v.2, n.2, p.116-117, 2008.	KASSIRER, J. P. On the Take: How Medicine's Complicity with Big Business Can Endanger your Health USA: Oxford University Press; 2004 ISBN: 978-0195176841.	livro
27	BASTOS, F. I. P. M.; BELLIDO, J. Disease Surveillance: a Public Health Informatics Approach. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde . Rio de Janeiro, v.2, n.1, p.127-129, 2008.	LOMBARDO, J.; BUCKERIDGE, D. Disease Surveillance: a Public Health Informatics Approach John Wiley & Sons, 2007 ISBN: 978-047006812-0.	livro
28	CARDOSO, M. D. Epidemiology and Culture. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde . Rio de Janeiro, v.2, n.1, p.113-115, 2008.	TROSTLE, J. A. Epidemiology and Culture . Cambridge, Cambridge University Press, 2005 ISBN: 978-052179389-6.	livro
29	CHAMAS, C. I. Comércio Internacional, Patentes e Saúde Pública. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde . Rio de Janeiro, v.4, n.1, p.177-180, 2010.	JURUA, M. S. G. Comércio Internacional, Patentes e Saúde Pública , 2007 – Paraná ISBN-13: 978-85-3621-520-4.	livro

	Citação da resenha	Citação da obra	Tipo de obra
30	RAYMUNDO, M. M. Leituras de novas tecnologias e saúde. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde . Rio de Janeiro, v.4, n.2, p.53-57, 2010.	ANA CRISTINA DE SOUZA MANDARINO, A. C. de S.; GOMBERG, E. Leituras de novas tecnologias e saúde Salvador: EDUFBA, 2009. 1 ed. 262 p. ISBN: 852320622-2	livro
31	BARRETO, B. M. V. B. Caminhos da Espiritualidade: o cuidar e o cuidar-se no trabalho em saúde. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde . Rio de Janeiro, v.4, n.3, p.121-125, 2010.	VASCONCELOS, E. M. (Org.) <i>et al.</i> Caminhos da Espiritualidade: o cuidar e o cuidar-se no trabalho em saúde A espiritualidade no trabalho em saúde . São Paulo: Editora Hucitec, 2006, 391p. ISBN: 85-271-0689-2	livro
32	TIZIANI, V. Iluminação artificial e a Saúde Pública. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde . Rio de Janeiro, v.5, n.1, p.121-125, 2011.	BARGHINI, A. Antes que os Vaga-Lumes Desapareçam ou Influência da Iluminação Artificial sobre o Ambiente . São Paulo, Editora ANNABLUME; FAPESP, 2010. 192 p. ISBN: 978-85-391-0057-6.	livro
33	FRAGA, C. A. M. Molecular Design. Concepts and Applications. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde . Rio de Janeiro, v.3, n.2, p.79-80, 2009.	SCHNEIDER, G.; KARL-HEINZ, B. Molecular Design. Concepts and Applications . Wiley-VCH Verlag GmbH, Alemanha; 2008 ISBN: 978-3527314324.	livro
34	DE BRITO, M. A. Resenha do livro Química Orgânica Experimental – Técnicas de Escala Pequena. Revista Eletrônica De Farmácia , v.10, n.1, p.4. Recuperado de https://www.revistas.ufg.br/REF/article/view/20941 .	PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G. Química orgânica experimental – técnicas de escala pequena . 2ª Edição. 880 pp. 2009. Bookman. ISBN: 9788577805150.	livro

Fonte: Próprios autores (2021).

De modo geral, a resenha tem como objetivo despertar a atenção do leitor para determinada obra, situando-o quanto à importância na área a qual se destina. Cabe aos resenhistas a competência na tarefa de fornecer uma visão concisa e breve, mas, ao mesmo tempo, instigante e atrativa (RODRIGUES, 2013).

4 RESENHA COMO PRODUÇÃO CIENTÍFICA

O presente tópico se baseia em dados extraídos de 11 dos 95 periódicos científicos da área da saúde indexados no *Scientific Electronic Library Online – SciELO* (www.scielo.br). A coleta de dados foi realizada on-line no dia 17 de junho de 2020, a partir das seções de “instruções aos autores”, informadas individualmente pelos periódicos, sem qualquer restrição de idioma ou escopo. Dois periódicos foram excluídos da análise pois o acesso às “instruções aos autores” era condicionado ao acesso de sítios eletrônicos externos à SciELO.

Resenha é um tipo de produção científica ainda pouco difundido e subutilizado na área da saúde. Enquanto a maioria dos periódicos omite as condições detalhadas para o envio de resenhas, outros deixam clara a política editorial de receber demandas espontâneas dos autores e/ou de convidar profissionais com reconhecida expertise para contribuir em um determinado volume ou tema, como exemplificado no Quadro 2. Manuscritos submetidos espontaneamente são avaliados quanto à temática, qualidade, boa redação e disponibilidade de espaço. Em caso de dúvida se o periódico se dispõe, ou não, a publicar resenha, aconselha-se consultar diretamente a equipe editorial do seu interesse.

Quadro 2 – Periódicos da área da saúde indexados no SciELO que instruem sobre a publicação de resenha

Periódico	ISSN Impresso/ On-line	Missão
Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)	0102-6720/ 2317-6326	“Publicar artigos de estudos clínicos e experimentais que contribuam para o desenvolvimento da pesquisa, ensino e assistência na área gastroenterologia cirúrgica, clínica, endoscópica e outras correlatas”
Advances in Rheumatology	N/A/ 2523-3106	“Promover desenvolvimentos importantes no campo da Reumatologia com publicação de pesquisas originais (incluindo revisões sistemáticas e metanálises), revisões de literatura, diretrizes e cartas provenientes de material publicado”
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences	N/A/ 2175-9790	“Publicar trabalhos científicos com a finalidade divulgar os mais recentes avanços da área das Ciências Farmacêuticas no Brasil e no exterior”
Cadernos de Saúde Pública	0102-311X/ 1678-4464	“Publicar artigos originais que contribuam para o estudo da saúde pública em geral e disciplinas afins, como epidemiologia, nutrição, parasitologia, ecologia e controles de vetores, saúde ambiental, políticas públicas e planejamento em saúde, ciências sociais aplicadas à saúde, dentre outras”
Ciência & Saúde Coletiva	1413-8123/ 1678-4561	“Publicar debates, análises e resultados de investigações sobre temas considerados relevantes para a Saúde Coletiva”
História, Ciências, Saúde- Manguinhos	0104-5970/ 1678-4758	“Publicar artigos originais e outros materiais relacionados à história das ciências e da saúde”

Periódico	ISSN Impresso/ On-line	Missão
Interface – Comunicação, Saúde, Educação	1414-3283/ 1807-5762	“Interface – Comunicação, Saúde, Educação é uma publicação on-line, em acesso aberto, interdisciplinar, editada pela Unesp (Laboratório de Comunicação e Educação em Saúde – Departamento de Saúde Pública, Faculdade de Medicina de Botucatu), dirigida para a Educação e Comunicação nas práticas de saúde, a formação de profissionais de saúde (universitária e continuada) e a Saúde Coletiva em sua articulação com a Filosofia, as Artes e as Ciências Sociais e Humanas. Prioriza abordagens críticas e inovadoras e a pesquisa qualitativa”
Physis: Revista de Saúde Coletiva	0103-7331/ 1809-4481	“Divulgar a produção na área de Saúde Coletiva, com ênfase nas áreas de Ciências Humanas e Sociais e de Política, Planejamento e Administração em Saúde”
Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil	1519-3829/ 1806-9304	“Divulgar artigos científicos englobando o campo da saúde materno infantil”
Revista Brasileira de Saúde Ocupacional	0303-7657/ 2317-6369	“Publicar artigos científicos relevantes para o desenvolvimento do conhecimento e para incrementar o debate técnico-científico no campo da Saúde e Segurança no Trabalho (SST)”
Saúde em Debate	0103-1104/ 2358-2898	“Contribuir para a produção de conhecimento na área da saúde coletiva/saúde pública, promovendo o debate através da publicação de artigos originais de interesse acadêmico, político e social”

Fonte: Próprios autores (2021).

As métricas para redação envolvem o número de autores, que, inclusive, pode ser restrito a um autor único, até cinco páginas de manuscrito, de 1.200 a 4.000 palavras, até 10.000 caracteres e até 75 referências. O manuscrito deve ser conciso e, por decisão editorial, a resenha pode ser devolvida aos autores para redução do texto. Mesmo com o subterfúgio de reduzir o volume do texto, abreviação, abreviatura, sigla e símbolo (oficiais ou não) devem ser evitados ao máximo e, quando for o caso, explicados ao ocorrer primeiro no manuscrito. O resumo ou *abstract*, com ou sem título, e as respectivas palavras-chave, é uma seção não obrigatória e, por vezes, excluída nas instruções de muitos periódicos. As normas para escrita do resumo, quando existentes, podem diferir das normas aplicadas a outros tipos de manuscritos como, por exemplo, dos artigos originais, dos relatos de caso e de revisão.

Os objetos citados aos autores como passíveis de resenha são predominantemente livros, seguidos de algumas outras poucas alternativas, como: bancos de dados informatizados e vídeos. Outros inúmeros objetos também podem ser resenhados, desde que tenham aderência ao escopo do periódico. A citação técnica do objeto no idioma original é um dos itens iniciais do manuscrito. Uma imagem que ilustre a identidade do objeto pode ser requerida sob forma de documento suplementar. Geralmente, a imagem é a capa do livro resenhado, pois a maioria das resenhas é de livro. Os parâmetros de formatação dessa imagem perpassam pela alta resolução do arquivo, variando em detalhes de periódico para periódico.

Sobre o conteúdo apresentado, espera-se o objeto resenhado seja tecnicamente analisado em profundidade tanto na tipologia descritiva/informativa quanto na crítica/opinativa. Nas duas tipologias, uma descrição geral, uma avaliação criteriosa e a (des)recomendação do objeto ao leitor são conteúdos indispensáveis da resenha.

Um bom motivo para se publicarem resenhas é que elas são citáveis por outros autores, prestigiando os índices individuais de produção científica dos resenhistas. Entretanto, cautela deve ser

tomada quanto ao potencial conflito de interesse. Por isso, fonte financiadora e parcerias comerciais devem ser declarados. Manuscritos promocionais ou com finalidade publicitária são desrecomendados.

5 MODELO ESTRUTURAL E METODOLÓGICO DA RESENHA

No decorrer do presente capítulo, as particularidades da resenha foram apresentadas enquanto estilo literário e inserção no contexto acadêmico-científico. Já os aspectos estruturais e metodológicos da escrita da resenha serão apresentados nos parágrafos seguintes deste tópico. Esse não é um receituário inquestionável de como escrever resenha, mas uma proposta facilitadora deste trabalho. Outra aplicação salutar é servir de balizador quanti e qualitativo dos componentes da resenha. Ao redigir uma resenha, as partes são descritas a seguir são comumente consideradas (COSCARELLI, 2012; MENDES, 2010):

Título – Informativo, conciso e claro sobre o objeto resenhado. Informações que enriquecem o título incluem citar que se trata de uma resenha; se o objeto resenhado é, por exemplo, aplicativo, CD, DVD, espetáculo ou evento cultural, livro, *software*, etc.; ano, volume ou edição da obra. Uma publicação que seguiu esse padrão de título é o texto de Nardi *et al.* (2015): “Resenha do livro Saúde Brasil 2014: uma análise da situação de saúde e das causas externas”. Não obstante, alguns manuscritos são intitulados apenas com a palavra “Resenha” ou, em inglês “*Review*”, seguido de um cabeçalho com a citação do objeto. A estratégia de se intitular apenas como “Resenha” empobrece o alcance de difusão da resenha, pois os dados do cabeçalho podem não ser listados na busca em bancos de dados.

Cabeçalho – referência técnica do objeto resenhado. As normas podem seguir a ABNT, Vancourver ou como for mais apropriado dependendo o objeto e de onde a resenha será publicada. O

cabeçalho é inserido contíguo e espaçado do título, dos dados autorais da resenha e da imagem do objeto resenhado.

Apresentação do objeto – Informar:

a) qual é a obra resenhada, com informações que dão continuidade e são complementares ao cabeçalho, mas sem repeti-lo;

b) quem é o autor ou quem são os autores, com dados biográficos e credenciais curriculares que contextualizem quem concebeu o objeto resenhado. Uma descrição correspondente pode ser adaptada se a obra for criação institucional, resultante de consórcio, de desconhecido ou demais casos possíveis;

c) qual a finalidade da concepção do objeto resenhado, preferencialmente, com apresentação de contexto histórico, hipóteses, justificativas, intenções do autor do objeto;

d) como o objeto resenhado pode ser classificado, considerando-se critérios conceituais, históricos, técnicos, teóricos, etc.

e) a quem o objeto resenhado foi inicialmente destinado.

Resumo – de forma contínua e complementar ao que foi informado no “cabeçalho” e na “apresentação do objeto”, a resenha tem prosseguimento com uma descrição mais pormenorizada do objeto resenhado. Se for um livro, o resumo pode, por exemplo, descrever a organização do raciocínio ao longo dos capítulos ou descrever as partes que compõem a obra. Já o resumo de um filme pode apresentar uma sinopse; um equipamento ou *software*, o prospecto com dados de fabricação.

Crítica – Informar:

a) se a finalidade da concepção do objeto resenhado foi, ou não, alcançada. É importante que essa parte da resenha esteja alinhada com e seja complementar ao conteúdo de “Apresentação do objeto”;

b) descrição, explicação e justificativa de quais foram as finalidades alcançadas, de acordo com a concepção do objeto;

c) descrição, explicação e justificativa de quais foram as finalidades não alcançadas, de acordo com a concepção do objeto;

d) se há alinhamento entre a forma de categorização do objeto (estilo, classificação, informação de arquivologia, tipologia, desenho experimental e outros) e a implicação do significado dessa categorização para quem consome o objeto resenhado. Por exemplo, a categorização do objeto é, de fato, clara quanto à identidade do objeto? Ou, por exemplo, quanto à finalidade, aplicabilidade, recorte temporal?

Conselho para quem consome o objeto resenhado

– Informar:

a) a quem o objeto resenhado é recomendado? As abordagens para responder a essa pergunta são diversas, incluindo desde faixa etária até temática de interesse, área profissional ou de atuação, conhecimentos ou vivências específicas sobre o assunto, perfil institucional de atuação profissional, etc. Por essa recomendação, o leitor saberá quem é o público-alvo do objeto.

b) a quem o objeto resenhado não é recomendado? Essa resposta pode incluir as abordagens da pergunta anterior e, também, aspectos que são erroneamente interpretados por quem teve contato apenas superficial com o objeto. Claramente, o resenhista tem a tarefa de informar a quem a obra não é endereçada.

c) justificativas consistentes para a recomendação ou não recomendação do objeto. Assim, enquanto a conclusão da tipologia descritiva/informativa fornece uma análise criticamente mais técnica, a tipologia crítica/opinativa se encerra com o julgamento ou a percepção embasada em conhecimento de causa do resenhista.

Dica – ao resenhar, o faça de forma que o leitor, ao seguir a sua recomendação, conclua que tomou uma decisão mais acertada. Por

outro lado, se o leitor da resenha contrariar a não recomendação do objeto, que ele se recorde que foi sabiamente avisado pelo resenhista.

6 RESENHAS NA PÓS-GRADUAÇÃO, UMA FERRAMENTA DE ENSINO

As resenhas são, na verdade, um convite à leitura, mas não substituem a leitura das obras originais. De modo geral, a resenha deve ser feita por especialistas, em função do conhecimento intrínseco, suficiente para avaliar, comentar e comparar, de forma direta e crítica. Então, por que uma resenha é solicitada a um aluno, que não é especialista, e talvez nunca o seja? (RODRIGUES, 2013). Para Motta-Roth (2001), a produção de resenhas é uma oportunidade para que os escritores inexperientes, os alunos, sejam iniciados no debate acadêmico. Segundo Mendes (2010), no decorrer do ensino superior, uma das formas mais usuais, para o aprimoramento das informações de cunho intelectual, é o desenvolvimento de resenhas. Já Rodrigues (2013) discute que esses gêneros textuais permitem aos acadêmicos a aproximação com teóricos renomados na área de atuação, principalmente, para o amadurecimento profissional.

No processo de ensino-aprendizagem da resenha, é essencial instrumentalizar o estudante para que ele desenvolva sua competência argumentativa. Nesse contexto, a produção de resenhas oferece ao estudante oportunidades de executar práticas discursivas (tanto a leitura quanto a escrita), que são requeridas a ele como membro da comunidade acadêmica. Mesmo que na graduação não seja exigido do aluno um conhecimento profundo de pensamentos e correntes teóricas, no contexto de uma formação crítica, é necessário que o aluno desenvolva a capacidade de descrever e de assumir uma posição crítica acerca de textos e livros de sua área de estudo (DA SILVA, 2011).

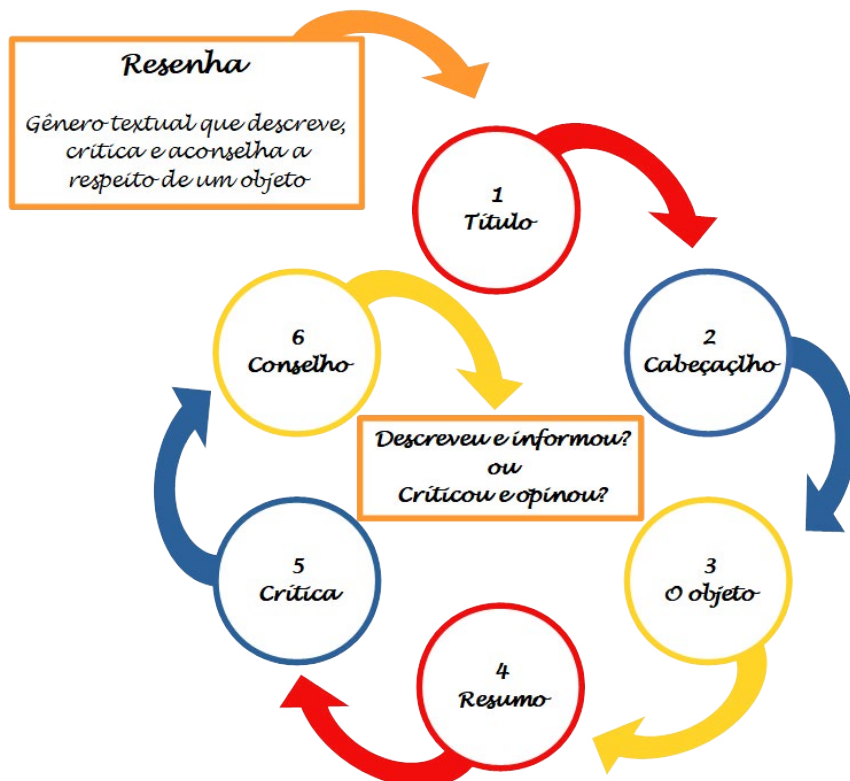
Ainda considerando-se o universo acadêmico, a troca de experiências, a partir de resenhas, pode gerar um ciclo de conheci-

mento, afinal, organizar ideias, impressões e sensações de uma obra exige maior compreensão do conteúdo. Desse modo, escrever sobre uma obra, compartilhando um ponto de vista, é quase que uma extensão da leitura da própria obra (BRAGA, 2017; DA SILVA, 2011). Do ponto de vista do leitor, as resenhas podem ser um exercício de reflexão e levar a um debate pessoal: “concordo plenamente”, “discordo plenamente”, “realmente, isso poderia ter sido melhor”. Além disso, a leitura de resenhas, escritas por um grupo de alunos, podem estimular outros alunos (ou outras turmas) à procura de determinada obra, difundindo conhecimento científico (BRAGA, 2017; DA SILVA, 2011; RODRIGUES, 2013).

Pelo caráter reflexivo inerente ao exercício de escrita da resenha, este gênero textual pode ser uma excelente ferramenta didática na pós-graduação. A proposta consiste no amadurecimento da compreensão e crítica de determinada obra recorrente no programa de pós-graduação ou algum autor relevante para a pesquisa. Além das obras e autores, diversos outros objetos de estudo podem ser resenhados e, conseqüentemente, caracterizados como produção científica qualificada se alcançarem qualidade acadêmica para aceite em periódicos científicos especializados.

Vai escrever uma resenha?

O infográfico abaixo contém um roteiro para te ajudar



Fonte: Próprios autores (2021).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Construir o senso epistêmico em estudantes é uma grande lacuna do contexto universitário. Elaborar projetos que desenvolvam pensamentos reflexivos e críticos a alunos que advêm de uma realidade educacional empobrecida de currículos, que não contemplam o rigor da escrita, tem sido o ponto nevrálgico nas produções acadêmicas de qualidade, tanto em cursos de graduação, quanto de pós-graduação no Brasil.

Os gêneros textuais propõem uma relevante articulação entre a dimensão da construção do conhecimento de uma determinada área de saber com o domínio das formas e dos usos da linguagem específica que se configuram, na correspondência das demandas universitárias.

Na área da saúde, a resenha é um gênero textual escassamente explorado e, via de regra, restrito à análise de livro e vídeo. O potencial de aplicação das resenhas para reportar a avaliação de instrumentos, equipamentos e programas permanece por ser desbravado. O cumprimento dessa tarefa pode se valer como recurso didático para instrumentalizar a prática crítica da escrita acadêmica, assim como para difundir o conhecimento sob forma de produção científica.

A estrutura textual as resenhas não é algo rígido, mas que está sujeita a alguns pressupostos. O texto deve resumir o objeto resenhado e extrapolar esse gênero textual mediante expressão de análise crítica. Por fim, o ápice da resenha é quando o leitor se torna ciente e consubstanciado a respeito de a quem o objeto do texto se endereça.

REFERÊNCIAS

- BRAGA, S. SENEM, J. O aluno na posição de autor: uma experiência com a resenha na universidade. **Fórum Linguístico**, v. 14, n. 4, p. 2685-2702, 2017.
- COSCARELLI, C. V.; MITRE, D. **Oficina de leitura e produção de textos**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2012.
- DA SILVA, A. V. L. A produção de resenha acadêmica no ensino superior. **Revele: Revista Virtual dos Estudantes de Letras**, v. 2, p. 1-13, 2011.
- MARCUSHI, L. A. **Produção textual, análise de gêneros e compreensão**. São Paulo: Parábola, 2008.
- MENDES, R. S. A importância da adequada estruturação de resumo e resenha. **Revista Espaço Acadêmico**, v. 10, n. 114, p. 135-140, 2010.
- MOTTA- ROTH, D. **Redação Acadêmica: princípios básicos**. Santa Maria, RS: UFSM/ Imprensa Universitária, 2001.
- NARDI, A. C. F.; MALTA, D. C.; DE SOUZA, M. F. M.; DUARTE, E.; FERREIRA, H. L.; DUARTE, E. C.; ESCALANTE, J. J. C.; GARCIA, L. P. Resenha do livro

Capítulo 17

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA – GÊNERO RESENHA

Saúde Brasil 2014: uma análise da situação de saúde e das causas externas. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 4, p. 803-804, 2015.

PIETRAFESA, J. P.; BORBA, O. de F. (orgs.) **Do contexto ao texto**: Os desafios da linguagem científica. Goiânia: Kelps, 2006.

RODRIGUES, L. F. F. A construção da crítica em resenhas produzidas por alunos. **Linguagem em (Dis)curso**, v. 13, n. 2, p. 273-297, 2013.



Capítulo 18

MÉTODOS DE COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

Gênero Revisão Integrativa

ROBERTA CARNEIRO TOLEDO
CRISTIANE ALVES DA FONSECA DO ESPÍRITO SANTO
FLÁVIO MONTEIRO AYRES

1 INTRODUÇÃO

A revisão integrativa de literatura é um recurso da prática baseada em evidência (PBE) que permite a síntese do conhecimento incorporado à aplicabilidade prática nas ciências da saúde. Para isso, estudos com abordagens metodológicas heterogêneas são considerados para a integração de conhecimentos e proposição de resposta para uma pergunta considerada norteadora. Uma vez que a criteriosa avaliação de evidências científicas é um parâmetro sensível na análise interdisciplinar de produtos aplicados à saúde, o presente capítulo visa apresentar ao leitor a importância de se escrever revisões integrativas, bem como as estratégias para tal fim.

2 EM QUE CONSISTE UMA REVISÃO INTEGRATIVA E QUAL A SUA FINALIDADE

O conhecimento científico é produzido a partir de atividades científicas, envolvendo experimentação e coleta de dados, cujo objetivo é demonstrar, por argumentação, uma solução para um

problema proposto, em relação a uma determinada questão. O elevado volume e o acentuado grau de detalhamento de dados gerados pelas pesquisas científicas motivou a formulação de recursos metodológicos voltados para a análise das evidências científicas disponíveis na literatura (MENDES; SILVEIRA; GALVÃO, 2008; SOUZA; SILVA; CARVALHO, 2010).

A elaboração de conhecimentos para aplicação na prática clínica exige a identificação e uso crítico de evidências científicas, sendo esse um item basilar da PBE. Especificamente no caso da revisão integrativa, almeja-se que as evidências científicas de estudos diversificados sejam integradas no processo de tomada de decisões (MENDES; SILVEIRA; GALVÃO, 2008; SOUZA; SILVA; CARVALHO, 2010).

O estabelecimento de procedimentos metodológicos para a condução de uma revisão permite o profícuo levantamento de dados bibliográficos, criteriosa inclusão ou exclusão de referências bibliográficas e a síntese das evidências científicas sobre o tema investigado. Os métodos de revisão incluem a revisão narrativa e revisão bibliográfica sistemática. Esta última engloba a metanálise, a revisão sistemática, a revisão qualitativa e a revisão integrativa (GRUPO ANIMA EDUCAÇÃO, 2014). Por essa ótica, a revisão é um documento que deve reunir dados confiáveis sobre uma temática específica ao ponto de orientar a prática profissional na área da saúde.

3 DISTINÇÃO ENTRE A REVISÃO INTEGRATIVA E OS DEMAIS TIPOS MAIS COMUNS DE REVISÃO

As revisões narrativas são textos que abordam atualidades e discussões inovadoras, ou estado da arte, sobre um determinado tema. Por se tratar de um texto cuja seleção de conteúdo é subjetiva, as revisões narrativas envolvem a coleta de dados pela análise crítica de livros e artigos de periódicos científicos independentemente de informar um protocolo metodológico que seja reproduzí-

vel por quem lê. A estrutura do manuscrito é flexível, podendo englobar sequencialmente as seções de introdução, desenvolvimento e comentários. O desenvolvimento contempla títulos e subtítulos contextualizados à temática da revisão (GRUPO ANIMA EDUCAÇÃO, 2014; ROTHER, 2007).

A revisão sistemática, ao contrário das revisões narrativas, é uma revisão planejada para responder uma pergunta específica e que utiliza métodos explícitos e sistemáticos para identificar, selecionar e avaliar referências conforme critérios de inclusão/exclusão para posterior, extração de dados extraídos e síntese. Por outro lado, denomina-se metanálise quando a revisão sistemática envolve a aplicação de técnicas estatísticas para combinar dados primários de outros estudos e estimar o tamanho do efeito dos estudos combinados (RIBEIRO, 2014). Os trabalhos de revisão sistemática e metanálise são considerados trabalhos originais, pois, além de utilizar como fonte, dados a literatura com comprovada evidência científica sobre determinado tema, são elaborados com rigor metodológico (GRUPO ANIMA EDUCAÇÃO, 2014; ROTHER, 2007).

Por incluir dados teóricos e delineamentos experimentais diversos, a revisão integrativa viabiliza uma abordagem abrangente sobre uma temática específica (Quadro 1). Além de contemplar dados primários diversificados, esse tipo de revisão também proporciona a possibilidade de investigar tanto questionamentos sobre questões teóricas quanto sobre aspectos práticos, conforme a conveniência investigativa dos pesquisadores (MENDES; SILVEIRA; GALVÃO, 2008).

Quadro 1 – Características das modalidades de revisão

Itens	Tipo de revisão		
	Narrativa	Integrativa	Sistemática
Pergunta norteadora	Ampla	Pontual e bem delimitada	
Levantamento de dados	Exploratória	Procedimentos sistemáticos e explícitos para minimizar o viés e o erro	
Critérios de inclusão e exclusão	Não se aplica		
Avaliação	Variável	Criteriosa e reprodutível	
Tipos de estudo	Não se aplica	Experimentais Não experimentais	Preferencialmente, experimentais
Checklist	Não se aplica	Variável	PRISMA
Síntese	Qualitativa	Variável	Quantitativa

Fonte: Próprios autores (2021).

Se, por um lado, a revisão integrativa abarca o desafio de conciliar estudos heterogêneos, por outro, exige-se que o conhecimento seja compreendido de forma holística e seja considerada a complexidade dentro de uma temática bem delimitada (PAIVA *et al.*, 2016). Essa abordagem integradora de se fazer revisão permite ao profissional da saúde uma melhor tomada de decisão na prática clínica, além de apontar temáticas negligenciadas ou que carentes de novos estudos. Sem dúvida, esse é um método facilitador, pois, muitas vezes, os profissionais se deparam com hercúlea missão de realizar a leitura de centenas ou milhares de referências bibliográficas disponíveis sobre uma temática. Além do exorbitante volume de dados, a análise das referências exige criticidade do para selecionar o que é de fato uma evidência científica (CROSSETTI, 2012; MENDES; SILVEIRA; GALVÃO, 2008; PAIVA *et al.*, 2016).

4 ROTEIRO PARA EXECUÇÃO DA REVISÃO INTEGRATIVA

1ª Fase: Definição do problema com uma pergunta norteadora

Inicia-se uma revisão integrativa pela delimitação do problema investigado, bem como pela formulação de uma pergunta norteadora coerentemente fundamentada. A abordagem da temática deve ser clara e objetiva, pois é a partir da pergunta norteadora que serão tiradas conclusões ao final da revisão, preferencialmente voltada para auxiliar na tomada de decisão (GANONG, 1987; MENDES; SILVEIRA; GALVÃO, 2008).

A formulação da pergunta norteadora é uma das etapas fundamentais da revisão integrativa, pois uma questão de partida bem delimitada facilitará a escolha dos descritores e a execução da procura dos estudos. Essa etapa define subsequentemente os critérios de elegibilidade das referências bibliográficas a serem consideradas na revisão, bem como quais informações devem ser coletadas

das referências selecionadas (GANONG, 1987; MENDES; SILVEIRA; GALVÃO, 2008). Sendo assim, a pergunta é responsável por definir os participantes, as intervenções a serem avaliadas e quais resultados serão mensurados. A pergunta deve ser elaborada de forma clara e específica, incluindo teorias e raciocínios da *praxis* do pesquisador (GALVÃO; SAWADA; TREVIZAN, 2004; WHITTEMORE; KNAFI, 2005).

A pergunta norteadora pode ser delimitada utilizando-se a estratégia PICO (Quadro 2) com o objetivo de definir o problema, formular a pergunta clínica da pesquisa, definir os descritores e as estratégias de buscas nas fontes de dados. Formulada por diversos elementos, quatro deles estão relacionados no anagrama PICO: P – população alvo (pacientes); I – interesse de intervenção (ou exposição); C – comparação ou controle; O – obter resultados ou desfecho (O, *outcome*, do inglês) (SANTOS; PIMENTA; NOBRE, 2007). Às vezes, vale a pena acrescentar um quinto componente da pergunta o T – tempo ou D – desfecho ou S – é o tipo de estudo.

Quadro 2 – Componentes estratégicos para composição da pergunta norteadora

Descrição	Abreviatura	Componentes da pergunta
População	P	Quem foi estudado?
Intervenção	I	O que foi feito?
Comparação	C	Comparações entre os resultados
Resultados	O	Quais os resultados ou efeitos?
Desenho do Estudo ou Tempo	T ou D	Como é o desenho do estudo? Quanto tempo durou o estudo?

Fonte: Adaptado de Grupo Anima Educação (2014).

2ª Fase: Instrumento de busca na literatura

Subsequentemente à formulação da pergunta norteadora, recorre-se às bases de dados mediante o uso de descritores para o levantamento bibliográfico da revisão (GANONG; 1987; MENDES; SILVEIRA; GALVÃO, 2008). A estratégia de busca pode ser realizada manualmente ou eletronicamente. Quando são selecionadas as bases de dados eletrônicas para a busca, consideram-se quais são os artigos listados nestas quais as publicações indexadas, a viabilidade do acesso e a implicação de custos (GALVÃO; SAWADA; TREVIZAN, 2004; SOUZA; SILVA; CARVALHO, 2010).

Esta fase deve ser claramente documentada, incluindo os descritores utilizados, bem como suas diferentes combinações (caso haja) e os operadores booleanos utilizados, as bases de dados consultadas, as estratégias de pesquisa, os critérios de inclusão e os de exclusão, delimitados para determinar pesquisas primárias relevantes (WHITTEMORE; KNAFI, 2005).

a) Escolha das bases de dados – As bases de dados mais apropriadas são escolhidas conforme o objetivo da investigação. As bases mais difundidas na área da saúde são: *Cumulative Index of Nursing and Allied Health Literature* – CINAHL, *Cochrane Collaboration*, *The Excerpta Medica Database* – EMBASE, *International Nursing Index* – INI, *National Institute of Health* – NIH, *Literatura Internacional em Ciências da Saúde* – MEDLINE, *PubMed Central* – PMC, entre outros. O recomendado é que sejam utilizadas pelo menos duas bases de dados (KARINO; FELLI, 2012). Quanto ao período de pesquisa, costuma-se defini-lo, habitualmente, com base nos últimos cinco anos (POMPEO; ROSSI; GALVÃO, 2009).

b) Escolha dos descritores – Após escolher as bases de dados, o próximo passo é a seleção e a validação dos descritores. Os descritores podem ser validados no sítio da DeCS (Descritores Ciências da Saúde) e no sítio do MESH (*Medical Subject Headings*) (POMPEO; ROSSI; GALVÃO, 2009).

c) Operadores booleanos – Esses operadores têm a função de informar o sistema sobre determinadas combinações dos termos da pesquisa. São representados pelos termos AND (combinação restritiva), OR (combinação aditiva) e NOT (combinação excludente), que podem ser utilizados junto aos descritores. Os operadores são digitados com letra maiúscula entre os termos das pesquisas (POMPEO; ROSSI; GALVÃO, 2009).

d) Critérios de inclusão e exclusão – A definição e a aplicação desses critérios são procedimentos que exigem rigor e transparência por parte do investigador. A seleção ideal das referências bibliográficas deveria incluir todas as referências levantadas ou a aplicação de uma seleção aleatória. Fundamentalmente, cabe ao manuscrito final fornecer detalhadamente os critérios previamente planejados, assim como relatar as decisões tomadas a partir desses critérios e com as devidas justificativas. A busca e a seleção dos artigos incluídos na revisão devem ser realizadas preferencialmente por dois revisores de forma independente (MENDES; SILVEIRA; GALVÃO, 2008; SOUZA; SILVA; CARVALHO, 2010).

3ª Fase: coleta de dados

Assim como em um formulário de fichamento corriqueiro ou um banco de dados sob forma de planilha eletrônica, estabelece-se previamente um instrumento de coleta de dados direcionador de quais informações devem ser extraídas das referências selecionadas no processo de inclusão/exclusão. Esse instrumento sistematiza a coleta de dados, além de facilitar a posterior análise dos dados extraídos das seções de objetivo, materiais e métodos (por exemplo, dados amostrais, métricos e métodos analíticos), resultados, discussão e, em especial, para as evidências científicas. Dessa forma, os dados são sistematicamente registrados no instrumento para posterior conferência e uso das informações (BEYEA; NICOLL, 1998; BROOME, 2000).

4ª Fase: análise crítica dos estudos incluídos

Assim como nas demais pesquisas convencionais, a análise dos dados exige o emprego de ferramentas adequadas. Na revisão integrativa de literatura, a avaliação criteriosa, crítica e detalhada dos dados é fundamental para que a revisão chegue a uma conclusão válida. Adicionalmente, os pesquisadores envolvidos na análise devem ser experientes o suficiente para avaliar: a) a adequação metodológica; b) a confiabilidade dos resultados; c) os resultados divergentes e formular as respectivas hipóteses elucidativas e d) a aplicabilidade prática das evidências científicas ressaltadas. Quanto ao último item, a PBE pode auxiliar na escolha da melhor evidência possível, mediante hierarquização das evidências (quadro 3), por exemplo, pela análise do delineamento da pesquisa.

Quadro 3 – Hierarquia dos níveis de evidência científica

Nível	Parâmetro
1	Evidências resultantes de metanálises de diversos estudos clínicos controlados e randomizados.
2	Evidências obtidas em estudos com delineamento experimental.
3	Evidências de estudos quase-experimentais.
4	Evidências de estudos descritivos (não-experimentais) ou com abordagem qualitativa.
5	Evidências provenientes de relatos de caso ou de experiência.
6	Evidências baseadas em opiniões de especialistas.

Fonte: Galvão (2006).

5ª Fase: discussão dos resultados encontrados

Considerando-se que um referencial teórico foi apresentado logo ao início da revisão integrativa, as evidências científicas ressaltadas encontram-se suficientemente embasadas para análise, síntese

e interpretação. Esta etapa corresponde à fase de discussão dos principais resultados comum a qualquer manuscrito científico, contemplando abordagens sobre problemáticas científicas ainda não elucidadas ou perspectivas para estudos posteriores. Para que haja realmente a integração de dados e a revisão se concretize como integrativa, a discussão deve contemplar a confiabilidade das evidências científicas levantadas, considerando-se os aspectos críticos dos diversos delineamentos experimentais das referências incluídas. Igualmente, a discussão deve informar sobre os aspectos teóricos correlatos importantes, hipóteses, fragilidades, impacto no conhecimento e nos procedimentos práticos. Diante de uma ampla revisão bibliográfica, é possível identificar os possíveis vieses, fragilidades e pontos fortes dos estudos. Temáticas negligenciadas podem ser apontadas sob a forma de perspectivas direcionadas, por exemplo, para a melhoria da assistência à saúde. Não obstante, a validade da revisão integrativa depende de conclusões e inferências fundamentadas em evidências científicas (GANONG, 1987; URSI, 2005).

6ª Fase: apresentação da revisão integrativa

A proposta principal da revisão integrativa é reunir e formular as evidências que estão disponíveis na literatura. A forma como as evidências foram obtidas deve ser reproduzível a partir do detalhamento adotado na escrita da revisão. Os dados informados devem esclarecer sobre os procedimentos e processos decisórios ao longo de todas as fases de condução da revisão. Quanto mais claras forem as descrições ao longo do texto, maior será a confiabilidade da revisão na tomada de decisão pelo leitor (GANONG, 1987; MENDES; SILVEIRA; GALVÃO, 2008).

A rigorosa condução da revisão integrativa é condição essencial para que sejam superadas as limitações de analisar conjuntamente estudos com delineamentos experimentais potencialmente muito heterogêneos, ou seja, como interpretar, apresentar evidências científicas e concluir a partir de uma grande variedade de dados? Como

parte desse cuidado, os autores das revisões integrativas devem ser detalhistas ao relatar os procedimentos analíticos, cujo maior desafio é preservar a acurácia da análise, identificando-se e eliminando-se os vieses em potencial (WHITTEMORE; KNAFI, 2005). Para isso, uma análise bibliográfica estratégica previamente planejada permite:

a) a redução do volume de dados pela classificação sistematizada das informações para facilitar a análise – por exemplo, pela classificação dos estudos de acordo com o delineamento experimental, dados de incidência, parâmetros cronológicos, perfil amostral ou conceito teórico (SOUZA; SILVA; CARVALHO, 2010);

b) exposição dos dados coletados sob forma de uma apresentação sintética – organização dos dados extraídos de fontes primárias em uma única página para subsequente comparação dos dados (WHITTEMORE; KNAFI, 2005);

c) comparação crítica dados expostos sob o prisma do estado da arte – discussão dos dados organizados sob forma de gráficos, quadros e tabelas (SOUZA; SILVA; CARVALHO, 2010);

d) conferir a qualquer momento a fidedignidade dos dados coletados;

e) chegar a uma conclusão baseada em evidências científicas.

5 INDICATIVOS DE QUALIDADE PARA ARTIGOS DE REVISÃO INTEGRATIVA

O *checklist* apresentado no Quadro 4 foi proposto como uma ferramenta de apoio na elaboração e avaliação de artigos de revisão integrativa (REIS; MARTINS; LOPES, 2020), considerando-se a escala 2 para *presente*; 1 para *presente parcialmente*; e 0 para *ausente*. A função desse *checklist* é, inicialmente, estabelecer os marcos a serem seguidos integralmente nas revisões sistemáticas, não servindo, por exemplo, para julgar a qualidade do trabalho dentro de uma gradação.

Quadro 4 – Indicativos de qualidade para artigos de revisão integrativa

Estrutura do Artigo	Atributos	Pontuação		
1. Título do artigo	Descrição do tipo de estudo: Revisão integrativa ou revisão integrativa de literatura	2	1	0
	Objetivo, critérios de elegibilidade, número da amostra, síntese dos principais resultados e conclusões	2	1	0
3. Descritores/ Palavras-chave	Devem ser incluídos, pelo menos, três descritores e o seguinte termo: Revisão	2	1	0
	Descrição do problema e a justificativa da Revisão Integrativa	2	1	0
4. Introdução	Questão norteadora a ser respondida pela Revisão Integrativa	2	1	0
	Objetivo da Revisão Integrativa	2	1	0
5. Metodologia	5.1 Descrição do tipo de estudo	2	1	0
	5.2 Descrição das etapas da Revisão Integrativa, descreve em subtítulos	2	1	0
	5.3 Questão norteadora em concordância com a estratégia de busca	2	1	0
	5.4 Descrição dos critérios de inclusão e exclusão. Exemplos: idioma, resumo disponível, texto completo, população, intervenção, tempo, método, etc.	2	1	0
	5.5 Descrição da Estratégia de busca	2	1	0
	Descreve os termos escolhidos	2	1	0
	Descreve o uso de vocabulário controlado	2	1	0

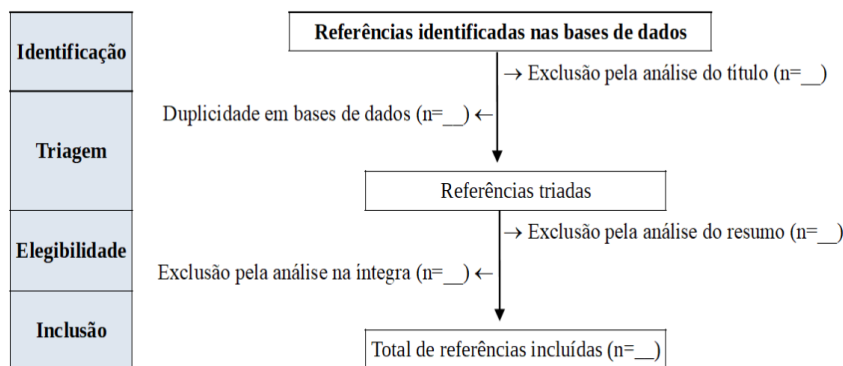
Estrutura do Artigo	Atributos			Pontuação		
	Descreve o idioma			2	1	0
	Apresenta a expressão de busca			2	1	0
	Apresenta a data da busca			2	1	0
	Quadro com fontes de informação, expressão de busca e resultados. Exemplo:					
	Fontes de Informação	Expressão de busca	Resultado	2	1	0
	5.6 Cita as fontes de informação utilizadas no quadro da estratégia de busca. Exemplos: <i>PubMed</i> , <i>Web of Science</i> , <i>Scopus</i> , <i>CINAHL</i> , <i>Lilacs</i> , <i>SciELO</i> , <i>Redalyc</i> , <i>PsycINFO</i> , <i>Physiotherapy Evidence Database (PEDro)</i> , Repositórios temáticos, Banco de teses e dissertações e outras de acordo com a especificidade do estudo			2	1	0
	5.7 Apresenta a descrição do processo de seleção			2	1	0
	Cita o total de estudos identificados			2	1	0
	Cita a exclusão de duplicatas			2	1	0
	Cita a leitura por títulos e resumos			2	1	0
	Cita a leitura por texto completo			2	1	0
	Cita a justificativa das exclusões			2	1	0
	Cita a amostra do estudo			2	1	0
	Apresenta um fluxograma			2	1	0

Estrutura do Artigo	Atributos	Pontuação		
	5.8 Descrição da análise dos dados	2	1	0
	Descreve se utilizou instrumento, categorização e outros	2	1	0
	Disponibiliza os dados da pesquisa em planilha ou em repositório de dados abertos. Exemplo: http://www.reproductive-healthjournal.com/content/11/1/71 artigo disponibiliza open data logo abaixo da descrição <i>search strategy</i> .	2	1	0
6. Resultados	Quadro de síntese da amostra selecionada. Exemplo: Referência Autor e ano de publicação, Objetivo do estudo, Desenho metodológico, população do estudo, Resultados, Recomendações ou conclusões, questão norteadora, país entre outros	2	1	0
7. Discussão	Relata as limitações da Revisão Integrativa	2	1	0
	Descreve as principais relevâncias identificadas e discute em concordância ou divergência com a literatura existente	2	1	0
	Discute as lacunas de conhecimento identificadas	2	1	0
8. Conclusões	Descreve as conclusões relacionadas ao objetivo do estudo	2	1	0
	Sinaliza pesquisas futuras, aplicabilidade na assistência, ensino, gestão etc.	2	1	0
Soma				

Fonte: Reis, Martins e Lopes (2020).

Esse indicador de qualidade se presta a cumprir a função do *checklist* do PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement*), aplicado às revisões sistemáticas e metanálises. Segundo o PRISMA, um fluxograma deve ser elaborado para representar a entrada de referências, a quantidade de referências incluídas e excluídas em cada etapa e o somatório final de referências incluídas (Figura 1). Esses parâmetros são frequentemente extrapolados para a estrutura de informação das revisões sistemáticas.

Figura 1 – Fluxograma de seleção de referências



Fonte: Modificado de PRISMA *flow diagram* (Galvão; Pansani; Harrad, 2015).

Os *checklist* e o fluxograma do PRISMA estão disponíveis para *download* como arquivo texto nos respectivos endereços eletrônicos:

- <https://www.equator-network.org/wp-content/uploads/2013/09/PRISMA-2009-Checklist-MS-Word.doc>
- <https://www.equator-network.org/wp-content/uploads/2013/09/PRISMA-2009-Flow-Diagram-MS-Word.doc>
- As explicações e documentos para elaboração estão disponíveis no endereço:

- <http://www.prisma-statement.org/PRISMAStatement/Default.aspx>

6 PUBLICANDO UMA REVISÃO INTEGRATIVA

O presente tópico se baseia em dados extraídos de 12 dos 95 periódicos científicos da área da saúde indexados no *Scientific Electronic Library Online* – SciELO (www.scielo.br). A coleta de dados foi realizada on-line no dia 17 de junho de 2020, a partir das seções de “instruções aos autores” informadas individualmente pelos periódicos, sem qualquer restrição de idioma ou escopo (Quadro 5). Dois periódicos foram excluídos da análise, pois o acesso às “instruções aos autores” era condicionado ao acesso de sítios eletrônicos externos à SciELO.

Quadro 5 – Periódicos da área da saúde indexados no SciELO que instruem sobre revisão integrativa

Periódico	ISSN Impresso/ On-line	Missão
Acta Paulista de Enfermagem	0103-2100/ 1982-0194	“Divulgar o conhecimento científico gerado no rigor da metodologia da pesquisa e da ética”
Cadernos Saúde Coletiva	1414-462X/ 2358-291X	“Contribuir para a consolidação e desenvolvimento do campo de conhecimento da Saúde Coletiva, afirmando seu caráter multidisciplinar e seu compromisso com as transformações sociais que resultem em benefícios para a saúde de populações humanas, através da divulgação de pesquisas originais de cunho teórico e/ou aplicado de interesse para a saúde pública”
Escola Anna Nery	1414-8145/ 2177-9465	“Publicar manuscritos originais de Enfermagem, do campo da saúde e outras áreas com interfaces nas ciências da Saúde e ciência de Enfermagem. Recebe manuscritos originais, desenvolvidos por métodos quantitativos, qualitativos, mistos, reflexões, ensaios e revisões sistematizadas. Esses manuscritos devem trazer contribuições diretas ou indiretas à historicidade e a prática do cuidado de enfermagem, à educação em enfermagem, ao desenvolvimento de novas metodologias e tecnologias de cuidar, de ensinar e pesquisar. Tem interesse especial pelos estudos desenvolvidos com populações vulneráveis cujos achados contribuem diretamente para ampliar a ciência de enfermagem que fundamenta o cuidar ético e humano”

Periódico	ISSN Impresso/ On-line	Missão
Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)	2237-9363/ 2317-6423	“Publicar artigos que contribuam para o aperfeiçoamento e o desenvolvimento da prática, da pesquisa e do ensino em Coloproctologia e especialidades afins”
Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano	* 1415-8426/ 1980-0037	“Divulgar conhecimentos científicos originais que contribuam para o avanço da ciência do movimento humano, com ênfase na cineantropometria nas suas vertentes morfológica e funcional, bem como os fatores condicionantes do desempenho físico”
Revista Brasileira de Enfermagem	0034-7167/ 1984-0446	“Divulgar a produção científica, de diferentes áreas do saber, que seja do interesse da Enfermagem, incluindo a que expresse o projeto político da Associação Brasileira de Enfermagem”
Revista Brasileira de Epidemiologia	* 1415-790X/ 1980-5497	“A Revista Brasileira de Epidemiologia tem por finalidade publicar Artigos Originais e inéditos, inclusive de revisão crítica sobre um tema específico, que contribuam para o conhecimento e desenvolvimento da Epidemiologia e ciências afins”
Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia	1809-9823/ 1981-2256	“Tem por objetivo publicar e disseminar a produção científica no âmbito da Geriatria e Gerontologia, e contribuir para o aprofundamento das questões atinentes ao envelhecimento humano”
Revista CEFAC	1516-1846/ 1982-0216	“Divulgar a produção científica sobre temas relevantes para a Fonoaudiologia e áreas afins”

Periódico	ISSN Impresso/ On-line	Missão
Revista Gaúcha de Enfermagem	* 0102-6933/ 1983-1447	“Contribuir para a divulgação do conhecimento na área da saúde, publicando a produção científica de interesse para a Enfermagem”
Saúde em Debate	0103-1104/ 2358-2898	“Contribuir para a produção de conhecimento na área da saúde coletiva/saúde pública, promovendo o debate através da publicação de artigos originais de interesse acadêmico, político e social”
Texto & Contexto – Enfermagem	0104-0707/ 1980-265X	“Destina-se à publicação da produção técnico-científica relacionada à área da saúde e, em especial da enfermagem”

Fonte: <https://www.scielo.br/>

* Periódicos que atualmente declaram não publicar Revisão Integrativa.

A reduzida quantidade de periódicos da área da saúde que contemplam instruções para revisões sistemáticas avança para a errônea perspectiva de que os periódicos não têm interesse nos resultados obtidos com essa ferramenta. Errônea, pois apenas três dos 95 periódicos aqui analisados declararam abertamente que não publicam revisões integrativas. Os demais 80 periódicos, possivelmente, ou ainda não atentaram para a complexidade de tipos de revisões possíveis ou preferem avaliar a situação do manuscrito mediante a submissão. O lapso de categorização dessas revisões se torna evidente pelo errático processamento dos manuscritos como artigo de revisão pela equipe editorial, enquanto o esperado seria categorizar o manuscrito como artigo original.

Dentro dos conceitos, objetivos e princípios sobre revisão integrativa inicialmente descritos no presente capítulo, os manuscritos podem ser escritos conforme normas compiladas de diversos periódicos (Quadro 6).

Quadro 6 – Compilação de parâmetros quantitativos para escrita de revisão sistemática

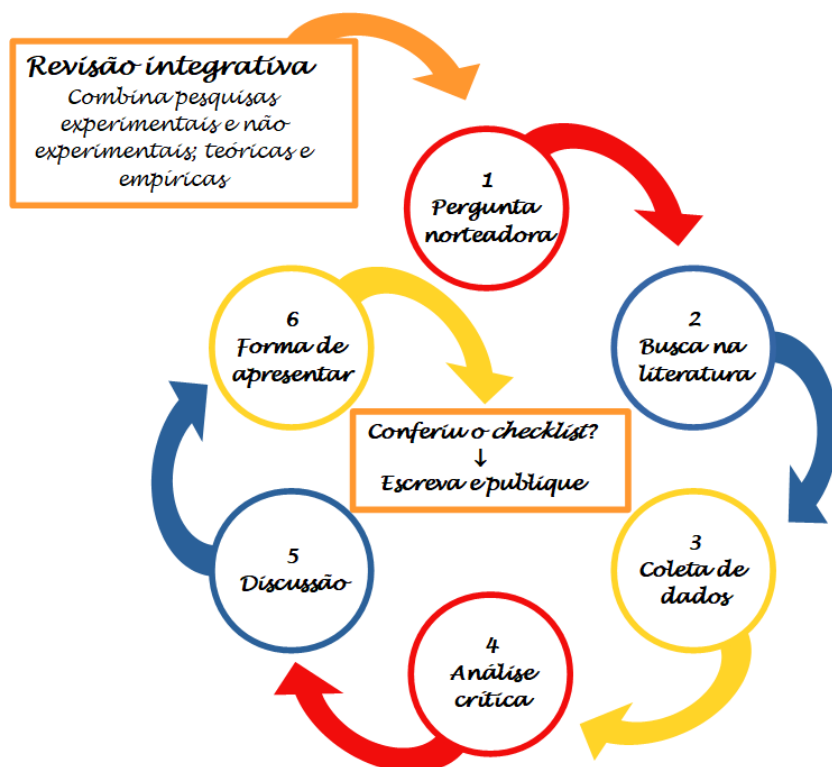
Elemento	Contemplado nas normas?	Parâmetro quantitativo
Autores	Sim	< 6
Resumo	Sim	< 200 palavras
Extensão máxima do texto principal	Sim	< 4.000 a 8.000 palavras
Período máximo para busca de referências	Sim	< 3 a 10 anos
Prazo entre a coleta de dados e a submissão do manuscrito	Sim	< 1 ano
Número de páginas	Sim	< 20
Elementos diagramados (figuras, quadros e tabelas)	Sim	< 5 a 8
Referências	Sim	< 40 a 60

Fonte: <https://www.scielo.br/>.

As instruções para elaboração de revisão integrativa pelos periódicos não seguem os mesmos parâmetros, mas exigem parâmetros que certamente trazem graus mais elevados de qualidade dos manuscritos. Essas normas incluem a adesão à iniciativa da Rede EQUATOR (*Enhancing the QUALity and Transparency Of health Research*) pelo uso de *checklist* fornecido por guias internacionais, nesse caso, o PRISMA.

Vai planejar e conduzir uma revisão integrativa?

O infográfico abaixo contém um roteiro para te ajudar



Fonte: Próprios autores (2021).

REFERÊNCIAS

BEYEA, S.C.; NICOLL, L.H. Writing an integrative review. **Association of Operating Room Nurses Journal**, v. 67, n. 4, p. 877-880, 1998.

BROOME, M.E. Integrative literature reviews for the development of concepts. *In*: RODGERS BL, KNAFL KA. **Concept development in nursing: foundations, techniques and applications**. Philadelphia (USA): W.B Saunders Company, 2000. p. 231-250.

CROSSETTI, M.G.O. Revisão integrativa de pesquisa na enfermagem o rigor científico que lhe é exigido [editorial]. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 33, n. 2, p. 8-9, 2012.

GALVÃO, C.M. Níveis de evidência. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 19, n. 2, p. VI, 2006.

GALVÃO, C.M.; SAWADA, N.O.; TREVIZAN, M.A. Revisão sistemática: recurso que proporciona a incorporação das evidências na prática da enfermagem. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 12, n. 3, p. 549-556, 2004.

GALVÃO, T.F.; PANSANI, T.S.A.; HARRAD, D. Principais itens para relatar Revisões sistemáticas e Metanálises: A recomendação PRISMA. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 2, p. 335-342, 2015.

GANONG, L.H. Integrative reviews of nursing research. **Research in Nursing & Health**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 1987.

GRUPO ANIMA EDUCAÇÃO. **Manual Revisão Bibliográfica Sistemática Integrativa: a pesquisa baseada em evidências**. Belo Horizonte: [Grupo Anima Educação], 2014. [58] p.

KARINO, M.E.; FELLI, V.E.A. Enfermagem baseada em evidências: avanços e inovações em revisões sistemáticas. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 11, n. 5, p. 11-15, 2012.

MENDES, K.D.S.; SILVEIRA, R.C.C.P.; GALVÃO, C.M. Revisão integrativa: método de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na enfermagem. **Texto & Contexto – Enfermagem**, v. 17, n. 4, p. 758-764, 2008.

PAIVA, M.R.F.; PARENTE, J.R.F.; BRANDÃO, I.R.; QUEIROZ, A.H.B. Metodologias Ativas de Ensino-Aprendizagem: Revisão Integrativa. **SANARE – Revista de Políticas Públicas**, v. 15, n. 2, p. 145-153, 2016.

POMPEO, D.A.; ROSSI, L.A.; GALVÃO, C.M. Revisão integrativa: etapa inicial do processo de validação de diagnóstico de enfermagem. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 4, p. 434-438, 2009.

Capítulo 18

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA – GÊNERO REVISÃO INTEGRATIVA

REIS, J.G.; MARTINS, M.F.M.; LOPES, M.H.B.M. **Indicativos de qualidade para artigos de Revisão Integrativa**. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/10952> Acesso em: 29 nov. 2020.

RIBEIRO, J.L.P. Revisão de investigação e evidência científica. **Psicologia, Saúde & Doenças**, v. 15, n. 3, p. 671-682, 2014.

ROTHER, E.T. Revisão sistemática X revisão narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 20, n. 2, p. v-vi, 2007.

SANTOS, C.M.C.; PIMENTA, C.A.M.; NOBRE, M.R.C. The PICO strategy for the research question construction and evidence search. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 15, n. 3, p. 508-511, 2007.

SOUZA, M.T.; SILVA, M.D.; CARVALHO, R. Integrative review: what is it? How to do it? **Einstein (São Paulo)**, v. 8, n. 1, p. 102-106, 2010.

URSI, E.S. **Prevenção de lesões de pele no perioperatório: revisão integrativa da literatura**. 2005. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

WHITTEMORE, R.; KNAFL, K. The integrative review: update methodology. **Journal of Advanced Nursing**, v. 52, n. 5, p. 546-553, 2005.



Capítulo 19

REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISES CONVENCIONAIS

Como interpretá-las

ALINE DE FÁTIMA BONETTI
LORENA LISITA INÁCIO TEODORO
LUCIANA REBELO GUILHERME

1 INTRODUÇÃO

A expressão “prática baseada em evidências” (antigamente denominada de “medicina baseada em evidências”) foi criada pelo médico norte-americano David L. Sackett na década de 1990, a qual se baseia no uso minucioso e explícito das melhores evidências disponíveis para guiar a tomada de decisões na prática clínica, integrando a experiência do profissional e as preferências do paciente (SACKETT *et al.*, 1996; SAMPAIO; MANCINI, 2007). O principal objetivo da prática baseada em evidências é alcançar os melhores resultados em saúde, potencializando os benefícios aos pacientes e minimizando condutas inseguras (MASIC; MIOKOVIC; MUHAMEDAGIC, 2008). Nesse contexto, surge o conceito de Avaliação de Tecnologias em Saúde (ATS), cujo intuito é subsidiar as decisões a respeito da utilização e financiamento de determinadas tecnologias, como medicamentos e equipamentos médico-hospitalares. Trata-se de um processo contínuo de avaliação que considera sistematicamente as consequências (médicas, organizacionais, econômicas e sociais) da implementação dessa tecnologia no sistema de saúde (BANTA, 2003).

Entretanto, nos últimos anos, as práticas baseadas em evidências tornaram-se populares em áreas diversas na saúde, uma vez que seus princípios são aplicáveis a outros cenários, como, por exemplo, nos serviços sociais, na justiça, na engenharia e na química (MASIC; MIOKOVIC; MUHAMEDAGIC, 2008).

Ademais, a prática baseada em evidências considera informações provenientes de várias fontes, as quais assumem níveis de hierarquia distintos de acordo com o desenho metodológico do estudo. Os estudos do tipo revisões sistemáticas com ou sem metanálises estão localizados no topo desta hierarquia de evidências científicas (SAMPAIO; MANCINI, 2007).

As revisões sistemáticas permitem que a informação esparsa presente nos estudos primários seja convertida a um conhecimento fundamentado, enquanto as metanálises representam a síntese quantitativa dos estudos incluídos na revisão, por meio da aplicação de métodos estatísticos adequados. Além disso, essas produções científicas representam os estudos de maior credibilidade e nível de evidência disponíveis na literatura, representando, portanto, os estudos de maior confiança para a tomada de decisões clínicas, caso sejam bem conduzidas (BANTA, 2003; CORDEIRO, 2007; HIGGINS *et al.*, 2019; MITTAL; GOYAL; MITTAL, 2017). Dessa forma, o objetivo principal deste capítulo é fornecer princípios básicos para a interpretação de revisões sistemáticas e metanálises convencionais.

2 PRINCÍPIOS BÁSICOS DA PRÁTICA DE SAÚDE BASEADA EM EVIDÊNCIAS

A Figura 1 ilustra os níveis hierárquicos de evidências científicas, os quais foram definidos de acordo com as características particulares dos diferentes desenhos metodológicos dos estudos. As opiniões de especialistas estão na base da pirâmide de evidência, constituindo as fontes com menor nível de credibilidade e confiança disponíveis, enquanto as revisões sistemáticas com ou

sem metanálises estão situadas no topo desta pirâmide (CORDEIRO, 2007; HIGGINS *et al.*, 2019).

Figura 1 – Níveis hierárquicos das evidências científicas



Fonte: Adaptado de *Centre for Evidence-Based Medicine*, OXFORD (2016) (Medicine 2016).

Legenda: MA – metanálises; RS -revisões sistemáticas.

Os relatos de caso, estudos caso-controle e de coorte são estudos observacionais, ou seja, o investigador limita-se a observar a evolução da variável do estudo, como, por exemplo, um medicamento. Os relatos de caso são estudos descritivos, cuja finalidade é narrar o que foi observado clinicamente em um grupo de pacientes. Estudos do tipo caso-controle são comparativos e analíticos (ou seja, abordam com mais profundidade as relações entre o estado de saúde e outras variáveis), nos quais grupos de pessoas com determinada doença (casos) são comparados com pessoas sem esta doença (controles). O objetivo desse tipo de estudo é avaliar a frequência relativa de uma exposição que ocorreu no passado, de modo a gerar hipóteses sobre a etiologia de uma determinada doença, portanto, é sempre retrospectivo; por exemplo: um grupo de pacientes com câncer de pulmão (caso) é comparado com um grupo de pacientes sem câncer de pulmão (controle) para verificar retrospectivamente qual exposição (ex. cigarros, exposição à gases tóxicos) pode ter contribuído para o desenvolvimento dessa patologia atualmente. Por sua vez, estudos do tipo coorte também são

observacionais analíticos, porém, possuem característica longitudinal, cujo objetivo é estabelecer uma relação causal entre o fator a que o grupo foi exposto e o desfecho final (THIESE, 2014; WHITE; BAILAR, 1956). Estudos que acompanham a evolução de um grupo de pacientes submetidos a um determinado tratamento com um grupo não tratado para comparar a incidência de um efeito são estudos do tipo coorte.

Paralelamente, os ensaios clínicos controlados randomizados (ECR) são do tipo intervencional, ou seja, o pesquisador é responsável por fornecer o objeto de estudo (um medicamento, por exemplo) a um determinado grupo de pessoas (grupo intervenção), com o intuito de compará-lo um grupo-controle. Estudos controlados possuem maior validade e são mais robustos, pois permitem a avaliação do efeito real de uma determinada tecnologia, com redução de possíveis vieses da investigação (THIESE, 2014).

Por fim, no topo da hierarquia da evidência, encontram-se as revisões sistemáticas com ou sem metanálises. As revisões sistemáticas são classificadas como estudos secundários, uma vez que agrupam e sintetizam os resultados de diversos estudos primários já publicados. O objetivo dessas revisões é avaliar criticamente os estudos primários, convertendo a informação dispersa em conhecimento fundamentado. O rigor metodológico relacionado ao processo de condução e reporte das revisões sistemáticas representa a principal diferença existente entre elas e as revisões simples de literatura (revisões narrativas), as quais estão sujeitas a importantes vieses de seleção (CORDEIRO, 2007; HIGGINS *et al.*, 2019; IOANNIDIS, 2017; UMAN, 2011).

Por sua vez, a metanálise consiste na aplicação de um método estatístico sobre os dados extraídos dos estudos primários incluídos na revisão sistemática, a fim de gerar estimativas agrupadas, conferindo, portanto, maior robustez aos resultados. Uma metanálise fornece uma única medida geral do efeito do tratamento, melhorando a interpretação clínica dos achados em vários estudos.

Dessa forma, as metanálises podem ser realizadas após a execução das revisões sistemáticas, mas não representa uma etapa obrigatória do processo (CORDEIRO, 2007; ISRAEL; RICHTER, 2011; UMAN, 2011).

Metanálises convencionais ou tradicionais (*pairwise meta-analysis*) são aquelas que comparam diretamente dois grupos (grupo intervenção *versus* grupo-controle, por exemplo), chegando-se a uma medida de efeito final que reflete a relação entre esses dois grupos. Para se construir uma metanálise, há necessidade de ao menos dois estudos primários que comparem o mesmo desfecho e os desenhos metodológicos devem ser semelhantes (HIGGINS *et al.*, 2019). Os resultados são geralmente expressos em gráficos de floresta, cujas interpretações serão exploradas na seção 2 deste capítulo.

Ressalta-se que as revisões sistemáticas com ou sem metanálises fornecem as melhores evidências, sendo as produções científicas mais confiáveis para a tomada de decisões em saúde (HIGGINS *et al.*, 2019; MITTAL; GOYAL; MITTAL, 2017). A elaboração desses estudos exige conhecimentos sobre a metodologia, bem como o cumprimento de determinadas regras, as quais serão exploradas no capítulo “Princípios básicos para a condução de revisões sistemáticas e metanálises convencionais”.

Por fim, ressalta-se que um novo formato de pirâmide de evidência foi proposto por Murad e colaboradores (2016). Segundo esses pesquisadores, é importante se considerar o mérito metodológico dos diferentes tipos de estudo. A primeira modificação foi substituir as linhas retas que separavam os níveis da pirâmide por linhas onduladas, permitindo a transitividade entre os tipos de estudo conforme sua qualidade metodológica, o cenário de avaliação e as evidências disponíveis. A segunda modificação foi considerar as revisões sistemáticas com ou sem metanálises como “lentes” através das quais os estudos primários devem ser visualizados e avaliados (MURAD *et al.*, 2016).

3 INTERPRETAÇÃO METANÁLISES CONVENCIONAIS

Para auxiliar na interpretação dos dados das metanálises, será utilizado como base um estudo hipotético que avaliou o uso de um novo medicamento para o tratamento do diabetes do tipo 2 (“Xo-açúcar”). Para tal, considerou-se a seguinte pergunta de pesquisa: o uso do medicamento “Xo-açúcar” é mais eficaz em relação à terapia padrão de primeira linha (metformina) para pacientes com diabetes do tipo 2? A fim de responder essa pergunta, os autores selecionaram os seguintes desfechos: alcance da meta de hemoglobina glicada (Figura 2), internamento por cetoacidose diabética (Figura 3) e redução da glicemia de jejum (Figura 4). Para a construção das três metanálises, os autores desse estudo hipotético incluíram 5 estudos primários, cujos resultados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados dos estudos incluídos na revisão sistemática hipotética

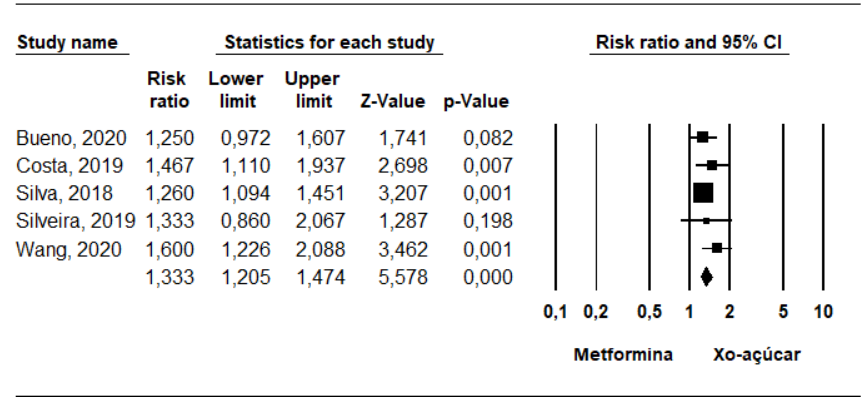
Autor, ano	N. de pacientes que alcançaram a meta de HbA1c/N. total		N. de pacientes que hospitalizaram por cetoacidose diabética/N. total		Redução de HbA1c (média e desvio padrão)	
	Grupo Xo-açúcar	Grupo metformina	Grupo Xo-açúcar	Grupo metformina	Grupo Xo-açúcar	Grupo metformina
Bueno, 2020	50/70	40/70	5/70	10/70	1,2% (1,1)	0,2% (0,7)
Costa, 2019	40/50	30/55	5/50	5/55	1,5% (2,5)	0,5% (2,7)
Silva, 2018	90/100	70/98	10/100	20/98	1,1% (2,1)	1,0% (2,3)
Silveira, 2019	20/30	15/30	2/30	5/30	1,8% (2,5)	1,0% (2,4)
Wang, 2020	45/50	27/48	3/50	7/48	1,9% (2,7)	1,0% (2,8)

Fonte: Próprios autores (2021).

Legenda: HbA1C: hemoglobina glicada, N.: número.

A partir dos dados descritos na Tabela 1, o *software* utilizado para a construção dos gráficos em floresta gera um resultado agrupado para cada desfecho de interesse juntamente com um intervalo de confiança (geralmente de 95%), representado pelo quadrado e pela linha horizontal, respectivamente (HIGGINS *et al.*, 2019). Na Figura 2, está representado o gráfico em floresta da comparação do medicamento “Xo-açúcar” e da metformina em pacientes com diabetes do tipo 2, considerando o número de pacientes que alcançaram a meta de hemoglobina glicada.

Figura 2 – Comparação do medicamento “Xo-açúcar” e da metformina em pacientes com diabetes do tipo 2 (desfecho: alcance da meta de hemoglobina glicada)



Fonte: Próprios autores (2021).

Nota: utilizado o modelo de efeitos randômicos e o método estatístico de inverso da variância no *Comprehensive Meta-Analysis v 2.2 software*. Heterogeneidade: I2= 0%, p=0,537.

A área dos quadrados está relacionada ao peso que cada estudo possui, o qual é influenciado por diversos fatores, mas, principalmente, pela quantidade de pacientes incluídos, ou seja, quanto maior a área do quadrado, maior o número de pacientes incluídos. Por sua vez, quanto maior o tamanho da linha horizontal de cada estudo, maior é o intervalo de confiança (HIGGINS *et al.*, 2019). Portanto, utilizando o exemplo hipotético deste capítulo, percebe-se que o risco relativo (*risk ratio*) do estudo de “Costa 2019” é igual

a 1,46 (representado pelo quadrado) e o intervalo de confiança de 95% (IC95%) está entre 1,10 e 1,93 (representado pela linha horizontal), ou seja, existe 95% de certeza de o resultado estar neste intervalo. A interpretação das medidas de efeito (neste caso o *risk ratio*) será explorada no tópico 2.1.

Entretanto, a principal informação a ser considerada na interpretação de um gráfico em floresta é o diamante (losango representado no final do gráfico). Se o diamante tocar na linha vertical (denominada de linha da nulidade), significa que o efeito é nulo, ou seja, não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos comparados. Entretanto, esse não é o caso do exemplo acima, uma vez que o diamante não toca a linha da nulidade. Adicionalmente, percebe-se que o diamante está posicionado para o lado que favorece o uso do medicamento “Xo-açúcar”, sugerindo, portanto, que o alcance da meta de hemoglobina glicada foi mais evidente no grupo que recebeu esta intervenção, se comparado à metformina. Dessa forma, o novo medicamento, considerando este desfecho, seria mais eficaz que a metformina.

Percebe-se, também, que alguns estudos apresentaram intervalos de confiança que cruzaram a linha da nulidade (BUENO, 2020; SILVEIRA, 2019). Portanto, tais grupos não demonstraram diferença estatisticamente significativa para este desfecho, porém, o resultado global de todos os estudos agrupados por meio de uma metanálise demonstrou um resultado diferente. Essa é uma outra vantagem das revisões sistemáticas e metanálises: resumir e demonstrar um resultado único e fundamentado acerca de um determinado assunto, considerando que na literatura científica possam existir estudos primários que favorecem a intervenção e outros que não demonstram diferenças significativas (DAWSON; PIHLSTROM; BLANCHETTE, 2016; MITTAL; GOYAL; MITTAL, 2017).

Reitera-se que os estudos que compõem uma revisão sistemática e metanálise devem possuir o mesmo desenho metodológico (HIGGINS *et al.*, 2019), ou seja, não é adequado realizar uma meta-

nálise misturando ensaios clínicos randomizados com estudos coorte, por exemplo.

2.1 Medidas de efeito

Os estudos incluídos em uma metanálise devem possuir um desfecho em comum para permitir que os resultados sejam combinados. No exemplo trazido na Figura 2, o desfecho é o alcance da meta de hemoglobina glicada. Trata-se de um desfecho dicotômico, pois o resultado de cada indivíduo é uma das duas únicas respostas categóricas possíveis: sim/não, presente/ausente (ou seja, o indivíduo pode ou não alcançar a meta de hemoglobina glicada). Existem também os desfechos contínuos, cujo resultado se refere a valores numéricos de medidas ou escalas, nos quais se visualizam dados de média e desvio padrão, como, por exemplo, valores de pressão arterial, glicemia capilar e colesterol (HIGGINS *et al.*, 2019).

Os resultados das metanálises são expressos em medidas de efeito, os quais devem ser corretamente utilizados a depender do tipo do desfecho (dicotômico ou contínuo). As medidas de efeito são construções estatísticas que comparam dados de resultados entre dois grupos de intervenção, refletindo a magnitude ou força de associação entre a exposição e o desfecho avaliado (HIGGINS *et al.*, 2019; ISRAEL; RICHTER, 2011).

As variáveis dicotômicas podem ser transformadas nas seguintes medidas de efeito: risco relativo (*risk ratio* – RR), razão de chances (*odds ratio* – OR), diferença e redução de riscos e número necessário para tratar (*number needed to treat* – NNT), sendo, as duas primeiras, as mais utilizadas nas publicações. O RR representa uma relação assimétrica da probabilidade que um indivíduo do grupo experimental tem de desenvolver aquele desfecho sobre a probabilidade de um indivíduo do grupo-controle desenvolver aquele mesmo desfecho (BRASIL, 2012). No caso do exemplo listado (Figura 2), o RR foi de 1,33 ([IC95% 1,20-1,47], $p=0,000$), ou

seja, o risco de alcançar a meta de hemoglobina glicada no grupo intervenção (pacientes que utilizaram o medicamento “Xo-açúcar”) foi 1,33 vezes maior em relação ao grupo que recebeu metformina. Porém, a partir do RR, pode-se calcular a redução do risco relativo (RRR) pela fórmula “ $100\% \times (1 - RR)$ ”, ou excesso de risco relativo (ERR), quando o resultado do RR for maior do que 1, através da fórmula “ $100\% \times (RR - 1)$ ”. Trata-se de medidas que avaliam o benefício relativo, facilitando a interpretação (HIGGINS *et al.*, 2019). Utilizando novamente o exemplo da metanálise da Figura 2, percebe-se que o ERR é igual a 33% ($100 \times (1,33 - 1) = 33\%$), ou seja, podemos inferir que o uso do medicamento “Xo-açúcar” aumentou em 33% a probabilidade de alcance da meta de hemoglobina glicada, condição que confere maior controle do diabetes do tipo 2 se comparado à metformina.

Por sua vez, o *odds ratio* (OR) refere-se à razão entre a chance de um determinado evento ocorrer pela chance de um evento não ocorrer. Como se trata de uma razão, tanto o risco relativo quanto o OR, caso o resultado seja igual a 1, significa que não há diferença quanto a ocorrência dos eventos em ambos os grupos (RIBALDONE; PETRINI, 2017). Por esse motivo, a linha da nulidade de metanálises de desfechos dicotômicos é representada pelo número 1.

As fórmulas abaixo exemplificam a diferença entre estas duas medidas de efeito, usualmente confundidas como sinônimos (ISRAEL; RICHTER, 2011). Considere a Tabela 2 para compreensão das fórmulas.

Tabela 2 – Relações entre grupos intervenção (com exposição ou tratamento) e grupo-controle (sem exposição ou tratamento) para um evento (desfecho) específico

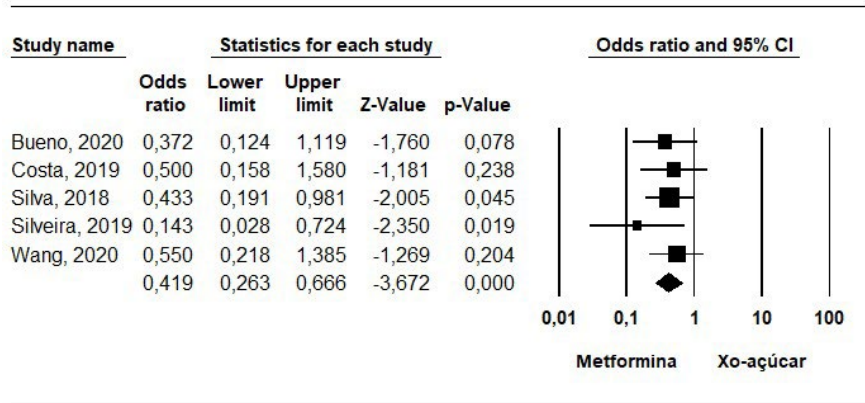
	Evento	Não evento	Total
Grupo intervenção	Ei	Ni	Ti
Grupo-controle	Ec	Nc	Tc

$$RR = \frac{\text{risco do evento no grupo intervenção}}{\text{risco do evento no grupo controle}} = \frac{Ei/Ti}{Ec/Tc}$$

$$OR = \frac{\text{chance do evento no grupo intervenção}}{\text{chance do evento no grupo controle}} = \frac{Ei/Ni}{Ec/Nc}$$

A Figura 3 traz um exemplo de uma metanálise cuja medida de efeito é o *odds ratio*. Trata-se do mesmo estudo hipotético descrito no tópico anterior, porém, considerando a avaliação do seguinte desfecho: taxa de internamento por cetoacidose diabética. Percebe-se que o grupo que recebeu o medicamento “Xô-açúcar” teve menos internamentos em relação ao grupo que recebeu metformina de maneira estatisticamente significativa, visto que o diamante não toca na linha da nulidade. A chance de admissões hospitalares por cetoacidose diabética foi 0,42 vezes maior para o grupo que recebeu metformina (OR 0,42 IC95% [0,26-0,66]), portanto, considerando esse desfecho, o medicamento “Xô-açúcar” foi mais eficaz.

Figura 3 – Comparação do medicamento “Xo-açúcar” e da metformina em pacientes com diabetes do tipo 2 (desfecho: taxa de internamento por cetoacidose diabética)



Fonte: Próprios autores (2021).

Nota: utilizado o modelo de efeitos randômicos e o método estatístico de inverso da variância no *Comprehensive Meta-Analysis v 2.2 software*. Heterogeneidade: I2= 0%, p=0,706.

Para as metanálises de desfechos dicotômicos, também é possível calcular o NNT. Trata-se de uma estimativa mais fácil de se interpretar, pois quantifica o grau de benefício a partir do número de pacientes necessário a tratar a fim de prevenir um desfecho indesejado (HIGGINS *et al.*, 2019). Quanto menor este número, maior o benefício, sendo ideal um NNT igual a 1, pois significa que todo paciente tratado se beneficia com a terapia. Já um NNT igual a 60, por exemplo, demonstra que, de 60 pacientes tratados com a intervenção de interesse, apenas um será realmente beneficiado (IALONGO, 2016). O NNT pode ser calculado da seguinte forma:

$$NNT = \frac{1}{RAR}$$
, sendo RAR = redução absoluta de risco, a qual representa a subtração do risco no grupo-controle em relação ao grupo intervenção (HIGGINS *et al.*, 2019):

$$\left(\frac{n. \text{ de eventos grupo controle}}{n. \text{ total da amostra no grupo controle}} \right) - \left(\frac{n. \text{ de eventos grupo intervenção}}{n. \text{ total da amostra no grupo intervenção}} \right)$$

Utilizando como exemplo o desfecho de internamentos por cetoacidose diabética listado neste capítulo, o NNT pode ser facilmente calculado somando o número de pacientes tiveram esse desfecho, conforme listado na Tabela 1 (25, de um total 300 indivíduos, no grupo que recebeu “Xo-açúcar” e 47, de um total de 301 indivíduos no grupo que recebeu metformina). Dessa forma, o RAR é igual a 0,07: $(\frac{47}{301}) - (\frac{25}{300}) = 0,07$.

Sendo assim, o NNT é igual a 14 (ou seja, 14 pessoas precisariam utilizar o medicamento “Xo-açúcar” para se prevenir uma hospitalização por cetoacidose diabética):

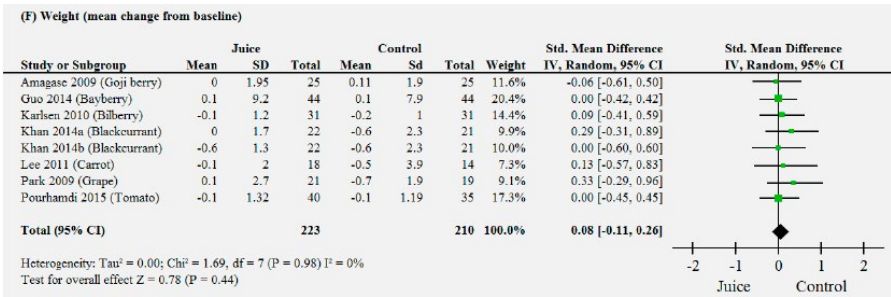
$$\text{NNT} = \frac{1}{0,07} = 14$$

Por outro lado, as variáveis contínuas podem ser sumarizadas em outras medidas de efeito como média entre os grupos, diferenças de média (*mean difference*) ou diferenças de média padronizadas (*standard mean difference*). Essa última deve ser considerada quando os estudos incluídos utilizaram métricas diferentes para avaliar o desfecho (por exemplo, diferentes escalas para mensurar a qualidade de vida do paciente), ou quando se deseja transmitir o tamanho de um efeito relativo à variabilidade na população (BROCKWELL; GORDON, 2001; ISRAEL; RICHTER, 2011). Resultados iguais a zero para metanálises de desfechos contínuos demonstram efeito nulo (ou seja, não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos), portanto, a linha da nulidade destas metanálises é o próprio zero (HIGGINS *et al.*, 2009).

A Figura 4 ilustra um gráfico em floresta de desfecho contínuo (redução da hemoglobina glicada), criado a partir do mesmo estudo hipotético supracitado. Percebe-se que o uso do medicamento “Xo-açúcar” foi mais eficaz na redução da hemoglobina glicada em comparação à metformina de maneira estatisticamente significativa, já que o diamante não toca a linha da nulidade (diferença média = 0,836 (IC95% [0,58-1,08]), $p=0,000$). Este resultado signi-

fica que o medicamento novo (“Xo-açúcar”) reduz a hemoglobina glicada 0,8% a mais em relação à metformina.

Figura 4 – Comparação do medicamento “Xo-açúcar” e da metformina em pacientes com diabetes do tipo 2 (desfecho: redução da hemoglobina glicada)

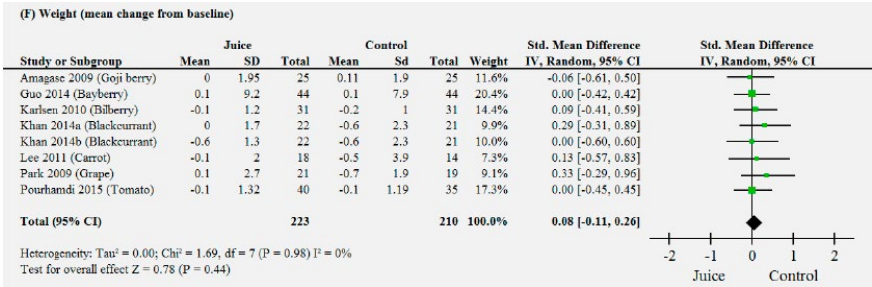


Fonte: Próprios autores (2021).

Nota: utilizado o modelo de efeitos randômicos e o método estatístico de inverso da variância no *Comprehensive Meta-Analysis v 2.2 software*. Heterogeneidade: $I^2 = 40,83\%$, $p = 0,149$.

A Figura 5 traz um exemplo de uma metanálise cuja medida de efeito é diferença média padronizada (*standardised mean difference*). Trata-se de uma revisão sistemática e metanálise que avaliou o impacto do consumo de sucos com potencial antioxidante na prevenção de desfechos oxidativos e no ganho de peso. Para esse último desfecho, percebe-se que não houve diferença entre os grupos, uma vez que o diamante tocou na linha da nulidade, que, nesse caso, é o zero (SMD 0,08, IC95% [-0,11; 0,26], $p = 0,44$). O estudo optou por utilizar esta medida de efeito, pois os artigos incluídos utilizaram diferentes escalas para mensurar este desfecho (TONIN *et al.*, 2015).

Figura 5 – Efeito do consumo de sucos com potencial antioxidante no peso corporal



Fonte: Tonin *et al.* (2015).

Reitera-se que as medidas de efeito, juntamente com os seus intervalos de confiança, são calculadas automaticamente pelos *softwares* de metanálises. Porém, cabe ao pesquisador escolher qual medida de efeito será utilizada.

Além das medidas de efeito, o leitor precisa se atentar ao intervalo de confiança, pois esse dado pode fornecer informações sobre a precisão das medidas de efeito calculadas a partir dos estudos incluídos. O intervalo de confiança descreve a incerteza inerente a qualquer estimativa. Geralmente, aplica-se um intervalo de confiança de 95%, indicando que há 95% de chance de o verdadeiro resultado estar naquela faixa. Um intervalo de confiança mais amplo pode ocorrer devido ao pequeno tamanho amostral, bem como à imprecisão na medição. Estudos com uma menor quantidade de indivíduos fornecem resultados menos precisos, a não ser que esses estudos menores tenham pouca variação. Intervalos de confiança estreitos sugerem que o resultado global é mais preciso (HIGGINS *et al.*, 2019; ISRAEL; RICHTER, 2011).

2.2 Heterogeneidade

A combinação dos resultados dos estudos de forma estatística não garante a obtenção de resultados válidos e confiáveis. Faz-se necessário avaliar a heterogeneidade da metanálise. Trata-se de um

termo utilizado para descrever a variabilidade usada entre os estudos, a qual pode ser atribuída a diversos fatores, tais como: natureza metodológica, vieses dos estudos, variações relacionadas à randomização e características clínicas dos pacientes (idade, sexo, comorbidades), discrepâncias entre as intervenções terapêuticas e os desfechos avaliados. Estudos com falhas metodológicas e com tamanhos amostrais pequenos podem superestimar os efeitos do tratamento e contribuir para a heterogeneidade (ISRAEL; RICHTER, 2011; LAU; IOANNIDIS; SCHMID, 1997; UMAN, 2011).

Para a quantificação da heterogeneidade entre os estudos, usualmente, utiliza-se o teste de inconsistência relativa ou índice I-quadrado (*I-squared* – I^2), expressos em porcentagens que variam de 0 a 100%, sendo reportado juntamente com o seu valor de p (*p-value*; significação $<0,05$). De maneira geral, valores de I^2 menores ou iguais a 25% indicam que os estudos possuem baixa heterogeneidade – entre 26 a 50% –, sugerem uma heterogeneidade moderada e acima de 50%, o que significa que a heterogeneidade entre os estudos é elevada (KNAPP; BIGGERSTAFF; HARTUNG, 2006). Metanálises com alta heterogeneidade comprometem a robustez e a confiabilidade dos resultados. Nos exemplos das Figuras 2, 3 e 5, percebe-se que a heterogeneidade foi igual a 0%, revelando que os estudos incluídos não são heterogêneos entre si. Outros parâmetros de heterogeneidade podem ser também reportados, embora sejam menos comumente utilizados (*chi-squared*, Q de Cochrane, τ , *tau-squared*) (HIGGINS *et al.*, 2019; RIBALDONE; PETRINI, 2017).

Atenção especial deve ser dada às metanálises que demonstram favorecimento de alguma intervenção, porém, à custa de uma heterogeneidade elevada. Nesse caso, os resultados devem ser interpretados com cautela e os autores devem considerar a heterogeneidade na formulação das conclusões e recomendações.

No entanto, apesar da existência de testes estatísticos para calcular a heterogeneidade, não existe um consenso acerca da confiabilidade da metanálise, ficando a critério do autor determi-

ná-la como apropriada ou não (ISRAEL; RICHTER, 2011). Porém, caso o I^2 seja elevado, especialmente acima de 50%, as razões que puderam contribuir para a heterogeneidade devem ser sempre exploradas e reportados nos estudos. Análises de sensibilidade, meta-regressão, análises de subgrupo e cálculo do intervalo de predição podem ser realizados (DAWSON; PIHLSTROM; BLANCHETTE, 2016; HIGGINS *et al.*, 2019; MITTAL; GOYAL; MITTAL, 2017). Tais estratégias são utilizadas para justificar a elevada heterogeneidade, as quais serão exploradas no capítulo “Princípios básicos para a condução de revisões sistemáticas e metanálises convencionais”, melhora a confiabilidade dos resultados da metanálise.

2.3 Modelos e métodos estatísticos

Os termos *fixos* (*fixed*) ou *randômicos* (*random*) descritos, usualmente, na parte superior direita dos gráficos em floresta (como na Figura 5) ou, ainda, na legenda da figura (como nas Figuras 2, 3 e 4), referem-se aos modelos estatísticos empregados para a construção das metanálises. O pesquisador deve apenas eleger no *software* qual método ele deseja utilizar. Adicionalmente, “IV”, destacado na Figura 5, refere-se ao método estatístico utilizado (IV: inverso da variância). Nas Figuras 2, 3 e 4, essa informação está representada na legenda. Caso o gráfico em floresta não descreva os métodos e modelos estatísticos, o autor do estudo deve reportá-los na seção referente aos métodos do seu artigo.

Para a integração dos resultados dos estudos primários em uma metanálise, podem ser utilizados os modelos matemáticos fixos ou randômicos (aleatórios). Apesar de os pressupostos de cada modelo diferirem, eles geram resultados semelhantes quando a heterogeneidade é baixa. No caso dos efeitos fixos, assume-se que não há variação entre os estudos além daquela atribuída ao acaso. Para calcular um intervalo de confiança para uma metanálise de efeito fixo, geralmente é assumido que o verdadeiro efeito da inter-

venção (em magnitude e direção) é o mesmo valor em todos os estudos (isto é, fixo nos estudos). Essa suposição implica que as diferenças observadas entre os resultados do estudo se devam apenas ao jogo do acaso (ou seja, que não há heterogeneidade estatística). Dessa forma, esse modelo pode ser utilizado quando existir uma heterogeneidade baixa ($I^2 < 30\%$) (DAWSON; PIHLSTROM; BLANCHETTE, 2016; ISRAEL; RICHTER, 2011; MITTAL; GOYAL; MITTAL, 2017; RIBALDONE; PETRINI, 2017).

Por outro lado, modelos randômicos são mais conservadores e mais comumente recomendados pois assume-se que o efeito não é o mesmo em todos os estudos. Os pesos dos estudos são ajustados estatisticamente para permanecerem semelhantes. Em vez de assumir que os efeitos da intervenção são os mesmos, considera-se que eles seguem uma distribuição normal. A suposição implica que as diferenças observadas entre os resultados do estudo se devam a alguma variação genuína nos efeitos da intervenção. Quando a heterogeneidade está presente, o modelo de efeitos randômicos ponderará os estudos que compreendem a metanálise de maneira semelhante, portanto, esse modelo torna-se recomendável. Por outro lado, quando a heterogeneidade é baixa, o resultado gerado das metanálises construídas pelos modelos fixos e randômicos fornece resultados semelhantes (DAWSON; PIHLSTROM; BLANCHETTE, 2016; ISRAEL; RICHTER, 2011; MITTAL; GOYAL; MITTAL, 2017; RIBALDONE; PETRINI, 2017).

Com relação aos métodos estatísticos utilizados para a construção das metanálises, destacam-se: Mantel-Haenszel, Peto e inverso da variância. O primeiro torna-se vantajoso quando se agregam vários estudos com amostras pequenas e quando se empregam modelos de efeitos fixos. Por sua vez, o método o Peto representa uma alternativa recomendável quando um ou mais estudos apresentam zero eventos em pelo menos um dos grupos comparados, demonstrando-se útil apenas para combinar *odds ratio*. Já o inverso da variância é assim denominado porque o peso atribuído a cada estudo é escolhido para

ser o inverso da variância da estimativa de efeito (ou seja, 1 sobre o quadrado do seu erro padrão). Assim, estudos maiores, que possuem erros padrão menores, ganham mais peso do que estudos menores. Essa escolha de pesos minimiza a imprecisão (incerteza) da estimativa do efeito combinado. Adicionalmente, para metanálises de desfechos contínuos, o método estatístico de escolha é o inverso da variância (BROCKWELL; GORDON, 2001; DERSIMONIAN; KACKER, 2007).

Reitera-se que cabe ao autor da metanálise escolher qual método e modelo estatístico vai utilizar, os quais devem estar reportados na metodologia do estudo, de modo a garantir a transparência e confiabilidade dos seus resultados.

4 GRAU DE RECOMENDAÇÃO E NÍVEL DE EVIDÊNCIAS

Apesar de uma etapa não obrigatória, todas as revisões sistemáticas e metanálises deveriam fornecer informações sobre a força da evidência gerada. O sistema recomendado para essa avaliação é o GRADE (*Grading of Recommendations Assessment*), cujo nível de evidência pode ser alto, moderado, baixo ou muito baixo (vide próximo capítulo para mais detalhes). Cabe ao pesquisador que realizou a metanálise aplicar o sistema GRADE e fornecer estas informações (BRASIL, 2014).

Adicionalmente, as diretrizes e os protocolos fundamentam-se em todas as evidências disponíveis para recomendar determinados tratamentos ou intervenções relacionadas a alguma doença específica. Dependendo da qualidade dos estudos e de seus desenhos metodológicos, determinadas terapias podem ou não ser indicadas. Dessa forma, classes de recomendação e níveis de evidência para a respectiva intervenção devem compor as diretrizes e protocolos (vide Tabela 3), as quais serão definidas pela equipe pesquisadora responsável pela redação destes documentos (MERLIN; WESTON; TOOHER, 2009; PETRISOR; KEATING; SCHEMITSCH, 2006).

Tabela 3 – Nível de evidência científica e grau de recomendação por tipo de estudo

GR E NE	Significado clínico	Exemplo
1 ^a	RS de ECCR com homogeneidade	Aspirina e clopidogrel pós-AVCi (KHEIRI <i>et al.</i> , 2019).
1B	ECCR com Intervalo de Confiança Estreito	Acarbose para retardar o diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 em pacientes pré-diabéticos (CHIASSON <i>et al.</i> , 2002).
1C	Resultados Terapêuticos do tipo “tudo ou nada” (quase todos os pacientes submetidos a intervenção sobreviveram, enquanto o desfecho esperado para todos era desfavorável)	Situações em que todos os pacientes morriam antes de o transplante tonar-se disponível e. Agora, alguns conseguem sobreviver graças ao tratamento (MERLIN; WESTON; TOOHER, 2009).
2 ^a	RS de estudos de Coorte com homogeneidade	Inibidores da bomba de prótons para o tratamento de esofagite eosinofílica (LUCENDO; ARIAS; MOLINA-INFANTE, 2016).
2B	Estudo de Coorte individual ou ensaios clínicos randomizados com menor qualidade	A clindamicina é preferível para infecções osteoarticulares na infância frente a metilina (PELTOLA <i>et al.</i> , 2012)
2C	Estudos Ecológicos	Aumento da mortalidade por SARS em pacientes que habitam locais com elevada poluição (CUI <i>et al.</i> , 2003).

GR E NE	Significado clínico	Exemplo
3 ^a	RS Estudos Caso-Controlle com homogeneidade	Vacinas contra a gripe fornecem proteção contra hospitalizações associadas à influenza entre adultos (RONDY <i>et al.</i> , 2017)
3B	Estudo Caso-Controlle individual	Fumantes são mais propensas a desenvolverem síndrome pré-menstrual (FERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2019).
4	Relato de Casos ou estudos do tipo coorte ou caso-controlle de menor qualidade	Terapia antirretroviral altamente ativa reduziu o número de morte por HIV-1 na Europa (MOCROFT <i>et al.</i> , 2003).
5	Opinião desprovida de avaliação crítica, baseada em matérias básicas: estudo fisiológico ou com animais	Creme de fenitoína reduz a dor neuropática (KOPSKY; KEPPEL HESSELINK, 2018).

Fonte: Adaptado de Merlin, Weston e Tooher (2009) e Petrisor, Keating e Schemitsch (2006).

Legenda: AVC: acidente vascular cerebral isquêmico; GR: Grau de Recomendação; NE: Nível de Evidência; SARS: Síndrome Respiratória Aguda Grave.

REFERÊNCIAS

- BANTA, D. The development of health technology assessment. **Health Policy Journal**, v. 63, n. 2, p. 121-132, 2003.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. **Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos randomizados**. 1. ed. Brasília, Brasil: Ministério da Saúde, 2012.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. SECRETARIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Diretrizes metodológicas: Sistema GRADE – Manual de graduação da qualidade da evidência e força de recomendação para tomada de decisão em saúde**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BROCKWELL, S. E.; GORDON, I. R. A comparison of statistical methods for meta-analysis. **Stat Medical**, v. 20, n. 6, p. 825-840, 2001.
- CHIASSON, J. L.; JOSSE, R. G.; GOMIS, R.; HANEFELD, M.; KARASIK, A.; LAAKSO, M. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. **The Lancet**, v. 359, n. 9323, p. 2072-2077, 2002.
- CORDEIRO, A. M. Revisão sistemática: uma revisão narrativa. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 34, p. 428-431, 2007.
- CUI, Y.; ZHANG, Z. F.; FROINES, J.; ZHAO, J.; WANG, H.; YU, S. Z.; DETELS, R. Air pollution and case fatality of SARS in the People's Republic of China: an ecologic study. **Environmental Health**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2003.
- DAWSON, D. V.; PIHLSTROM, B. L.; BLANCHETTE, D. R. Understanding and evaluating meta-analysis. **Journal of the American Dental Association**, v. 147, n. 4, p. 264-270, 2016.
- DERSIMONIAN, R.; KACKER, R. Random-effects model for meta-analysis of clinical trials: an update. **Contemporary Clinical Trials**, v. 28, n. 2, p. 105-114, 2007.
- FERNÁNDEZ, M. del M.; MARTINÉZ, A. M.; LAMAS, M. P.; MÉNDEZ, C. R.; TAKKOUCHE, B. Tobacco consumption and premenstrual syndrome: A case-control study. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. e0218794, 2019.
- HIGGINS, J. P. T.; THOMAS, J.; CHANDLER, J.; CUMPSTON, M.; LI, T.; PAGE, M. J.; WELCH, V. A. **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.0**. Cochrane, 2019. Disponível em: www.training.cochrane.org/handbook. Acesso em: 20 jul. 2020.
- IALONGO, C. Understanding the effect size and its measures. **Biochemia Medica (Zagreb)**, v. 26, n. 2, p. 150-163, 2016.

IOANNIDIS, J. P. Meta-analyses Can Be Credible and Useful: A New Standard. **JAMA Psychiatry**, v. 74, n. 4, p. 311-312, 2017.

ISRAEL, H.; RICHTER, R. R. A guide to understanding meta-analysis. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 41, n. 7, p. 496-504, 2011.

KHEIRI, B.; OSMAN, M.; ABDALLA, A.; HAYKAL, T.; SWAID, B.; AHMED, S.; CHAHINE, A.; HASSAN, M.; BACHUWA, G.; QASMI, M.; BHATT, D. Clopidogrel and aspirin after ischemic stroke or transient ischemic attack: an updated systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 47, n. 2, p. 233-247, 2019.

KNAPP, G.; BIGGERSTAFF, B. J.; HARTUNG, J. Assessing the amount of heterogeneity in random-effects meta-analysis. **Biometrical Journal**, v. 48, n. 2, p. 271-285, 2006.

LAU, J.; IOANNIDIS, J. P.; SCHMID, C. H. Quantitative synthesis in systematic reviews. **Annals of Internal Medicine**, v. 127, n. 9, p. 820-826, 1997.

LUCENDO, A. J.; ARIAS, Á.; MOLINA-INFANTE, J. Efficacy of proton pump inhibitor drugs for inducing clinical and histologic remission in patients with symptomatic esophageal eosinophilia: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 1, p. 13-22. e11, 2016.

MASIC, I.; MIOKOVIC, M.; MUHAMEDAGIC, B. Evidence based medicine – new approaches and challenges. **Acta Informatica Medica**, v.16, n. 4, p. 219-225, 2008.

MERLIN, T.; WESTON, A.; TOOHER, R. Extending an evidence hierarchy to include topics other than treatment: revising the Australian levels of evidence. **BMC Medical Research Methodology Journal**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2009.

MITTAL, N.; GOYAL, M.; MITTAL, P. K. Understanding and Appraising Systematic Reviews and Meta-Analysis. **Pediatric Dentistry Journal**, v. 41, n. 5, p. 317-326, 2017.

MURAD, M. H.; ASI, N.; ALSAWAS, M.; ALAHDAB, F. New evidence pyramid. **Evidence-based Medicine**, v. 21, n. 4, p. 125-127, 2016.

PELTOLA, H.; PAAKKONEN, M.; KALLIO, P.; KALLIO, M. J. T. Clindamycin vs. first-generation cephalosporins for acute osteoarticular infections of childhood – a prospective quasi-randomized controlled trial. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 6, p. 582-589, 2012.

PETRISOR, B. A.; KEATING, J.; SCHEMITSCH, E. Grading the evidence: levels of evidence and grades of recommendation. **Injury**, v. 37, n. 4, p. 321-327, 2006.

RIBALDONE, D. G.; PETRINI, E. How to interpret meta-analysis results. **Panminerva Medica Journal**, v. 59, n. 3, p. 274, 2017.

Capítulo 19

REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE – COMO INTERPRETÁ-LAS

RONDY, M., N., OMEIRI, N. E.; THOMPSON, M. G.; LEVEQUE, A.; MOREN, A.; SULLIVAN, S. G. Effectiveness of influenza vaccines in preventing severe influenza illness among adults: A systematic review and meta-analysis of test-negative design case-control studies. **Journal of Infection**, v. 75, n. 5, p. 381-394, 2017.

SACKETT, D. L., ROSENBERG, W. M.; GRAY, J. A.; HAYNES, R. B.; RICHARDSON, W. S. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. **British Medical Journal**, v. 312, n. 7023, p. 71-72, 1996.

SAMPAIO, R. F.; MANCINI, M. C. Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 11, n. 1, p. 83-89, 2007.

THIESE, M. S. Observational and interventional study design types; an overview. **Biochemia Medica (Zagreb)**, v. 24, n. 2, p. 199-210, 2014.

TONIN, F. S.; STEIMBACH, L. M.; WIENS, A.; PERLIN, C. M.; PONTAROLO, R. Impact of Natural Juice Consumption on Plasma Antioxidant Status: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22146-22156, 2015.

UMAN, L. S. Systematic reviews and meta-analyses. **Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 57-59, 2011.

WHITE, C.; BAILAR, J. C. Retrospective and prospective methods of studying association in medicine. **American Journal of Public Health**, v. 46, n. 1, p. 35-44, 1956.

YASSERI, S. Evidence-based practice in subsea engineering. **Underwater Technology**, v. 32, n. 4, p. 231-244, 2015.



Capítulo 20

PRINCÍPIOS BÁSICOS PARA A CONDUÇÃO DE REVISÕES SISTEMÁTICAS E METANÁLISES CONVENCIONAIS

ALINE DE FÁTIMA BONETTI
AMANDA SCHMALTZ
LUCIANA REBELO GUILHERME

1 INTRODUÇÃO

No capítulo anterior, foram explorados os princípios fundamentais relacionados à interpretação de revisões sistemáticas com ou sem metanálises, bem como conceitos importantes acerca da prática baseada em evidências. A compreensão prévia desses princípios torna-se imprescindível para a correta elaboração dessas produções científicas.

O Handbook da colaboração Cochrane é um documento que auxilia as execuções de revisões sistemáticas e metanálises, sendo o mais utilizado mundialmente (HIGGINS *et al.*, 2019). Entretanto, outras diretrizes também têm sido amplamente utilizadas pela comunidade científica, como as da organização *Joanna Briggs Institute* (JBI) (AROMATARIS; MUNN, 2020) e as do Ministério da Saúde deste país (BRASIL, 2012, 2014a). Todas elas são semelhantes no que diz respeito a conceitos, interpretações e processos que guiam a condução desses tipos de estudos, portanto, cabe ao pesquisador decidir qual diretriz utilizar. Entretanto, quando se almeja uma publicação internacional, recomenda-se utilizar manuais internacionais.

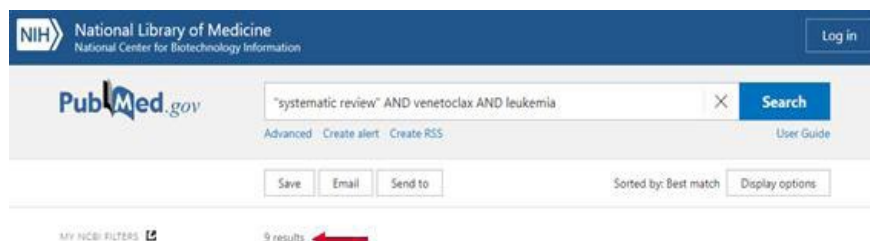
Dessa forma, neste capítulo, serão abordadas todas as etapas necessárias para a realização de revisões sistemáticas e metanálises convencionais. Reitera-se que o uso dos manuais supracitados é de fundamental importância, de modo a complementar as informações contidas neste capítulo.

2 LOCALIZAÇÃO DAS REVISÕES SISTEMÁTICAS E METANÁLISES NA LITERATURA CIENTÍFICA

Antes de realizar uma revisão sistemática com ou sem metanálises acerca de um determinado assunto, os pesquisadores devem localizar a existência de estudos semelhantes já publicados ou até mesmo em fase de publicação, de modo a evitar a elaboração de estudos não inovadores.

Para localizar revisões sistemáticas e metanálises sobre um tema específico na literatura científica, basta realizar pesquisas rápidas em alguma base de dados. O buscador mais comumente utilizado é o *PubMed*, o qual inclui as bases *PubMed Central* e *Medline* (MITTAL; GOYAL; MITTAL, 2017). Outras bases, como *Scopus*, *Web of Science*, *Science Direct*, *PsycInfo* e *CINAHL* (*Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature*) também podem ser utilizadas. Cabe aos pesquisadores escolher quais bases irão utilizar dependendo da área de interesse. Um exemplo de busca rápida está ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – Exemplo de uma busca rápida por revisões sistemáticas no *PubMed*



Fonte: <https://pubMed.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Esta busca sugere que existem 9 revisões sistemáticas sobre o medicamento venetoclax para o tratamento da leucemia. Destaca-se que os termos de interesse (“*systematic review*”, venetoclax e *leukemia*) foram combinados pelo operador AND, uma vez que esses termos precisariam estar presentes concomitantemente nos estudos. Reitera-se que essa é uma busca rápida, portanto, o pesquisador deve verificar estas nove publicações para certificar-se de que elas tratam sobre o tema de interesse. Além disso, estudos que publicaram algo semelhante, porém, utilizando outros termos, como por exemplo *venclaxta* (nome comercial do venetoclax), não foram capturados por esta busca, portanto, o pesquisador pode realizar buscas mais refinadas, a fim de localizar mais estudos de interesse.

Adicionalmente, toda revisão sistemática com ou sem metanálises deve possuir um protocolo prévio (HIGGINS *et al.*, 2019), usualmente publicado na plataforma PROSPERO. Trata-se de uma plataforma criada pela Universidade de York, da Inglaterra, responsável por registrar as revisões sistemáticas e metanálises. Sendo assim, o pesquisador deve localizar previamente uma pesquisa semelhante, procurando por protocolos publicados nesta plataforma.

3 ETAPAS PARA CONDUÇÃO DE UMA REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE

Inicialmente, o pesquisador principal deve publicar o protocolo da revisão sistemática com ou sem metanálise. Conforme citado na seção anterior, a plataforma PROSPERO é a mais utilizada para o registro destes protocolos. Essa etapa é fundamental, pois permite que o pesquisador não selecione os resultados de interesse ao final do estudo, uma vez que todas as etapas da sua revisão sistemática devem ser transparentes e discriminadas previamente nesse protocolo. Cabe aos pesquisadores manterem esse registro sempre atualizado, conforme a progressão da execução das etapas. Adicionalmente, a plataforma PROSPERO gera um código para o protocolo, o qual deverá ser mencionado no artigo final.

Destaca-se também a declaração PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*), uma ferramenta de 27 domínios relacionados à condução e ao reporte de revisões sistemáticas e metanálises (MOHER *et al.*, 2009). Recomenda-se que os autores utilizem essa ferramenta e mencionem o seu uso no artigo final, de modo a melhorar a qualidade de reporte de suas revisões sistemáticas e metanálises (BONETTI *et al.*, 2020; IOANNIDIS, 2017; TONIN *et al.*, 2018).

No Quadro 1, estão descritas todas as etapas necessárias para a elaboração de revisões sistemáticas com ou sem metanálises. Ressalta-se que a descrição completa dessas etapas deve estar presente no artigo final, de modo a proporcionar transparência e garantir a reprodutibilidade do estudo (BONETTI *et al.*, 2020; IOANNIDIS, 2017; TONIN *et al.*, 2018).

Quadro 1 – Etapas de uma revisão sistemática com ou sem metanálise

Etapa	Descrição
Registro do protocolo	Toda revisão sistemática deve ter seu protocolo previamente registrado, sendo a plataforma PROSPERO a mais utilizada.
Formulação da pergunta	A pergunta a ser respondida deve ser bem definida e, usualmente, é baseada no acrônimo PICOS (população, intervenção, controle/comparador, <i>outcomes</i> e <i>study design</i>).
Localização dos estudos primários	Duas bases de dados eletrônicas, pelo menos, devem ser utilizadas para a localização dos estudos. Buscas manuais e na literatura cinza também devem ser realizadas para complementar a busca.
Seleção dos estudos	Os critérios de inclusão e exclusão devem ser bem definidos pelos pesquisadores. Esta fase inclui duas etapas, as quais devem ser realizadas por dois revisores independentes: leitura de títulos e resumos (triagem) e leitura na íntegra dos estudos selecionados. Caso haja discordâncias quanto à inclusão ou exclusão dos estudos, um terceiro revisor deve ser contatado.

Capítulo 20

PRINCÍPIOS DE REVISÕES SISTEMÁTICAS E METANÁLISES

Etapa	Descrição
Extração dos dados	Os estudos incluídos na etapa anterior devem ter seus dados de interesse extraídos, como: características do estudo, dos participantes, intervenções e desfechos.
Avaliação da qualidade metodológica e risco de viés	Os estudos incluídos devem ser submetidos à avaliação crítica da qualidade e do risco de viés, por meio de instrumentos específicos, como: RoB 2 para a avaliação do risco de viés de ECR e ROBINS I para ECNR, ambos da colaboração Cochrane.
Síntese dos dados e análises adicionais.	A partir dos dados extraídos dos estudos incluídos, faz-se necessária a realização de uma síntese qualitativa. A síntese quantitativa (metanálise) é opcional, porém, recomendável, quando há possibilidades de agrupamento dos dados para desfechos semelhantes. Análises adicionais são recomendadas, tais como: análises de sensibilidade, avaliação do viés de publicação e da qualidade da evidência pelo sistema GRADE.

Fonte: Adaptado de Higgins *et al.* (2019).

Legenda: ECNR: Ensaio clínico não randomizado; ECR: ensaio clínico randomizado; GRADE: *Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation*. RoB 2: *revised tool for Risk of Bias in randomized trials*; ROBINS I: *Risk Of Bias In Non-randomized Studies of Interventions*.

3.1 Formulação da pergunta

As revisões sistemáticas e metanálises devem responder a questões claramente definidas e específicas, diferentemente de revisões narrativas cujas perguntas são genéricas e abrangentes (HIGGINS *et al.*, 2019; MOHER *et al.*, 2009; UMAN, 2011). Para facilitar a formulação da pergunta de pesquisa, alguns acrônimos podem ser utilizados, sendo o PICOS (população, intervenção, controle/comparador, *outcomes*, *study design*), o mais comumente conhecido (AROMATARIS; MUNN, 2020; BRASIL, 2012; HIGGINS *et al.*, 2019). Para esclarecer essa questão, a seguinte pergunta de pesquisa será utilizada como exemplo: O esomeprazol é mais efetivo em relação aos demais inibidores da bomba de prótons para o tratamento da doença do refluxo gastroesofágico

(DRGE)? Aplicando o acrônimo PICOS, essa pergunta de pesquisa seria desmembrada da seguinte forma:

- P (população): pacientes com DRGE;
- I (intervenção): esomeprazol;
- C (comparador): outros inibidores da bomba de prótons (ex: omeprazol, lansoprazol, pantoprazol);
- *Outcome* (desfecho): cura clínica;
- *Study desing* (desenho de estudo): ensaios clínicos randomizados (ECR).

Percebe-se que a pergunta foi focada e direcionada para uma determinada intervenção e patologia. Reitera-se que o desenho de estudo a ser selecionado deve ficar a critério do pesquisador, a depender, principalmente, dos objetivos da pesquisa e dos desfechos. Nesse caso, foram escolhidos ECR, uma vez que são desenhos metodológicos que respondem melhor ao desfecho de interesse (cura clínica, neste caso) (BRASIL, 2012). Para revisões sistemáticas cuja finalidade é explorar fatores de risco de determinadas doenças, estudos do tipo coorte ou caso-controle podem ser escolhidos (BRASIL, 2014a).

3.2 Localização dos estudos primários

Para localizar os estudos primários referentes à pergunta da pesquisa, estratégias de busca devem ser montadas para as respectivas bases eletrônicas de dados (*PubMed*, *Scopus*, *Web of Science*, *Science Direct*, por exemplo). Cada base de dados possui uma particularidade específica no que tange à construção das estratégias de busca, as quais usualmente estão descritas em seus respectivos endereços eletrônicos. Montar a estratégia de busca representa a etapa mais importante de uma revisão sistemática, pois, caso ela seja mal executada, estudos de interesse podem não ser localizados. Dessa forma, a construção de uma estratégia de busca requer domí-

nio do assunto de pesquisa e merece uma atenção especial de modo que ela seja específica, mas, principalmente, sensível (MCGOWAN; SAMPSON, 2005).

Adicionalmente, a estratégia de busca deve incluir os termos relacionados a população de interesse (“P” do acrônimo PICOS), a intervenção (“I” do PICOS) e aos desenhos de estudo (“S” do PICOS). Não se recomenda a inclusão dos desfechos de interesse na estratégia de busca, pois estudos relevantes podem não ser localizados (BRASIL, 2012, 2014a; HIGGINS *et al.*, 2019; LAM *et al.*, 2018).

No exemplo utilizado na formulação da pergunta de pesquisa, as seguintes estratégias poderiam ser combinadas na busca avançada do *PubMed* (Quadro 2).

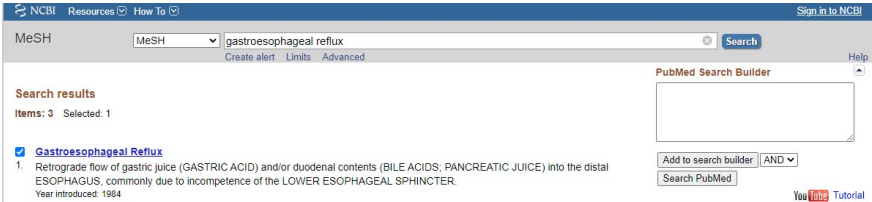
Quadro 2 – Exemplo de estratégias de busca a ser utilizada no *PubMed*

Tópico de interesse	Estratégia de busca
Referente à população	#1: “Gastroesophageal Reflux”[Title/Abstract] OR “Gastroesophageal Reflux”[MeSH Terms] OR “Gastric Acid Reflux” [Title/Abstract] OR “Acid Reflux, Gastric” [Title/Abstract] OR “Reflux, Gastric Acid” [Title/Abstract] OR “Gastric Acid Reflux Disease” [Title/Abstract] OR “Gastro-Esophageal Reflux” [Title/Abstract] OR “Gastro Esophageal Reflux” [Title/Abstract] OR “Reflux, Gastro-Esophagea” [Title/Abstract] OR “Gastroesophageal Reflux Disease” [Title/Abstract] OR GERD [Title/Abstract] OR “Reflux, Gastroesophageal” [Title/Abstract] OR “Esophageal Reflux” [Title/Abstract] OR “Gastro-oesophageal Reflux” [Title/Abstract] OR “Gastro oesophageal Reflux” [Title/Abstract] OR “Reflux, Gastro-oesophageal” [Title/Abstract].
Referente à intervenção	#2: esomeprazole [MeSH Terms] OR esomeprazole [Title/Abstract] OR “Esomeprazole Sodium” [Title/Abstract] OR “Esomeprazole Strontium” [Title/Abstract] OR “Strontium, Esomeprazole” [Title/Abstract] OR “Esomeprazole Magnesium” [Title/Abstract] OR Nexium [Title/Abstract] OR “Esomeprazole Potassium” [Title/Abstract] OR “Esomeprazole Strontium Anhydrous” [Title/Abstract].

Tópico de interesse	Estratégia de busca
Referente ao desenho de estudo	# 3: ((clinical[Title/Abstract] AND trial[Title/Abstract]) OR clinical trials as topic[MeSH Terms] OR clinical trial[Publication Type] OR random*[Title/Abstract] OR random allocation[MeSH Terms] OR therapeutic use[MeSH Subheading]).
Estratégia completa	#1 AND #2 AND #3

Foram definidas três buscas (#1 para a população de interesse, #2 para a intervenção e #3 para os desenhos de estudo), as quais tiveram seus sinônimos combinados com o operador booleano “OR”. Quando se trata de um termo composto, devem-se utilizar aspas. Ademais, após cada termo, recomenda-se inserir a expressão “Title/Abstract”, uma vez que a busca direciona a localização do respectivo termo apenas nos títulos e resumos. Quando há termos MeSH (*Medical Subject Headings*) para determinadas expressões, recomenda-se incluí-lo também como sinônimo. Trata-se de um vocabulário controlado específico para a indexação de artigos no *PubMed*, os quais facilmente podem ser localizados em seu endereço eletrônico, conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2 – Localização de termos MeSH no *PubMed*



Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/>.

Para a localização dos desenhos de estudo de interesse (representado pela busca #3 do exemplo anterior), existem estratégias já validadas disponíveis no próprio *PubMed*.

Por fim, como o objetivo deste exemplo é buscar ECR que tratam do uso do esomeprazol em pacientes com DRGE, faz-se necessário combinar as três estratégias acima com o operador booleano “AND” na busca avançada do *PubMed*, conforme descrito no Quadro 2. Adicionalmente, as estratégias de busca deverão ser replicadas para as demais bases de dados selecionadas pelo pesquisador, respeitando as particularidades de cada uma. Reitera-se que, para mais detalhes a respeito da construção da estratégia de busca, os manuais da Colaboração Cochrane, JBI e do Ministério da Saúde devem ser consultados (AROMATARIS; MUNN, 2020; BRASIL, 2012, 2014a; HIGGINS *et al.*, 2019).

Recomenda-se também realizar a busca manual, por meio da leitura das referências bibliográficas dos artigos incluídos na revisão sistemática e na literatura cinza (como, por exemplo: diretrizes, teses de doutorado e resumos de conferência), de modo a capturar estudos relevantes que eventualmente não foram recuperados pelas estratégias de busca (AROMATARIS; MUNN, 2020; BRASIL, 2012, 2014a; HIGGINS *et al.*, 2019).

3.3 Seleção dos estudos

Após a busca sistemática realizada nas bases de dados, os estudos de interesse deverão ser selecionados com base nos critérios de elegibilidade pré-estabelecidos pela equipe de pesquisa (AROMATARIS; MUNN, 2020; BRASIL, 2012, 2014a; HIGGINS *et al.*, 2019). Reitera-se que muitos estudos estão indexados em diversas bases de dados, portanto, cabe ao pesquisador eliminar os artigos duplicados previamente. Plataformas atualmente disponíveis podem ser utilizadas para a exclusão das duplicatas, bem como para a realização da exportação dos estudos localizados nas bases de dados e seleção daqueles de interesse, como, por exemplo, o EndNote® e o Mendeley®.

A fase de seleção dos estudos compreende duas etapas importantes, as quais devem ser realizadas por dois revisores de maneira

independente: triagem e leitura na íntegra dos estudos. A triagem dos estudos é realizada por meio da leitura dos títulos e resumos, considerando, para inclusão, os artigos que atendam aos critérios de elegibilidade previamente estabelecidos pela equipe de pesquisa. Os critérios de inclusão representam as determinações do acrônimo PICOS (AROMATARIS; MUNN, 2020; BRASIL, 2012, 2014a; HIGGINS *et al.*, 2019); no caso do exemplo listado neste capítulo, os pesquisadores deveriam incluir apenas ECR que comparam o uso do esomeprazol com outros inibidores da bomba de prótons para o tratamento da DRGE. Sendo assim, outros desenhos de estudo (como, por exemplo, coorte, caso-controle, estudos de caso, artigos de revisão) seriam excluídos e outras patologias nas quais se utiliza o esomeprazol (úlceras gástricas ou duodenais, por exemplo) também seriam excluídos. Outros critérios de exclusão devem ser considerados pelos pesquisadores, de acordo com os objetivos da pesquisa, como, por exemplo: idade da população, uso de terapias combinadas para a DRGE, presença de comorbidades, artigos publicados em caracteres não romanos, dentre outros. Quando o revisor tem dúvidas sobre a inclusão ou exclusão do artigo na etapa de triagem, recomenda-se incluí-lo.

Reitera-se também que não é aconselhado limitar a pesquisa por período de publicação, uma vez que revisões sistemáticas bem elaboradas devem incluir todos os artigos disponíveis na literatura científica desde o princípio até o momento da busca. Adicionalmente, não é recomendado restringir a inclusão de estudos publicados em idiomas específicos (HIGGINS *et al.*, 2019; KUNG *et al.*, 2010; WHITINGA *et al.*, 2016). Entretanto, é bastante comum os autores limitarem, erroneamente, o período de publicação, bem como incluírem estudos publicados apenas em inglês (BONETTI *et al.*, 2020; IOANNIDIS, 2017, 2016).

Os estudos selecionados na etapa de triagem deverão ser lidos na íntegra, utilizando os mesmos critérios de elegibilidade, para que, finalmente, todos os artigos de interesse sejam incluídos na revisão

sistemática. Os dois revisores devem se reunir para realizar o consenso, tanto na triagem quanto na etapa de leitura na íntegra e, em casos de discordância sobre a inclusão ou não dos artigos, um terceiro revisor deverá ser contatado. Reitera-se que os motivos que justificaram a exclusão de artigos na etapa de leitura na íntegra devem ser registrados e disponibilizados como material suplementar na publicação final (HIGGINS *et al.*, 2019; KUNG *et al.*, 2010; WHITINGA *et al.*, 2016).

3.4 Extração dos dados

Os estudos incluídos na fase de seleção deverão ter seus dados extraídos. Recomenda-se extrair os dados basais, tais como: nome do autor, ano de publicação do estudo, presença de conflito de interesses, país de publicação, período do estudo, tempo de seguimento, número de participantes, características das intervenções e comparadores (como os regimes posológicos, tempo de tratamento), dentre outros. Adicionalmente, dados relacionados aos desfechos de interesse também devem ser extraídos, como: número de pacientes curados e número total de pacientes em cada grupo. Cabe aos pesquisadores definir quais dados devem ser extraídos, de acordo com os objetivos da pesquisa (AROMATARIS; MUNN, 2020; BRASIL, 2012, 2014a; HIGGINS *et al.*, 2019; KUNG *et al.*, 2010; WHITINGA *et al.*, 2016).

3.5 Avaliação da qualidade metodológica e risco de viés

Os estudos incluídos na revisão sistemática deverão ser submetidos à avaliação da qualidade metodológica e risco de viés. Os manuais da colaboração Cochrane e da JBI disponibilizam diversos instrumentos para esta avaliação (AROMATARIS; MUNN, 2020; HIGGINS *et al.*, 2019), os quais variam de acordo com o desenho do estudo, como, por exemplo:

- RoB (*Risk of bias*): instrumento criado pela colaboração Cochrane para avaliação da qualidade metodológica e risco de viés de ensaio clínico randomizado;

Capítulo 20

PRINCÍPIOS DE REVISÕES SISTEMÁTICAS E METANÁLISES

- ROBINS (*risk of bias tool to assess non-randomized studies of interventions*): instrumento criado pela colaboração Cochrane para avaliação da qualidade metodológica e risco de viés de ensaios clínicos não randomizados;
- *Newcastle-Otawa*: instrumento destinado para a avaliação da qualidade metodológica de estudos observacionais;
- Escala de Jadad: instrumento para avaliação da qualidade metodológica de ensaio clínico randomizado.

Outros instrumentos estão disponibilizados nos manuais supracitados. Recomenda-se que o pesquisador estude a aplicação do instrumento de escolha previamente, a fim de realizar uma avaliação apropriada e crítica dos estudos incluídos. Esta fase também requer que dois revisores participem de maneira independente e, em casos de discordância, um terceiro revisor deverá ser contatado (AROMATARIS; MUNN, 2020; BRASIL, 2012, 2014a; HIGGINS *et al.*, 2019).

3.6 Síntese dos dados e análises adicionais

Os pesquisadores devem sintetizar qualitativamente os principais achados de maneira crítica e objetiva. Caso os dados possam ser agrupados quantitativamente, as metanálises podem ser realizadas (vide capítulo anterior para compreender quando uma metanálise pode ser construída).

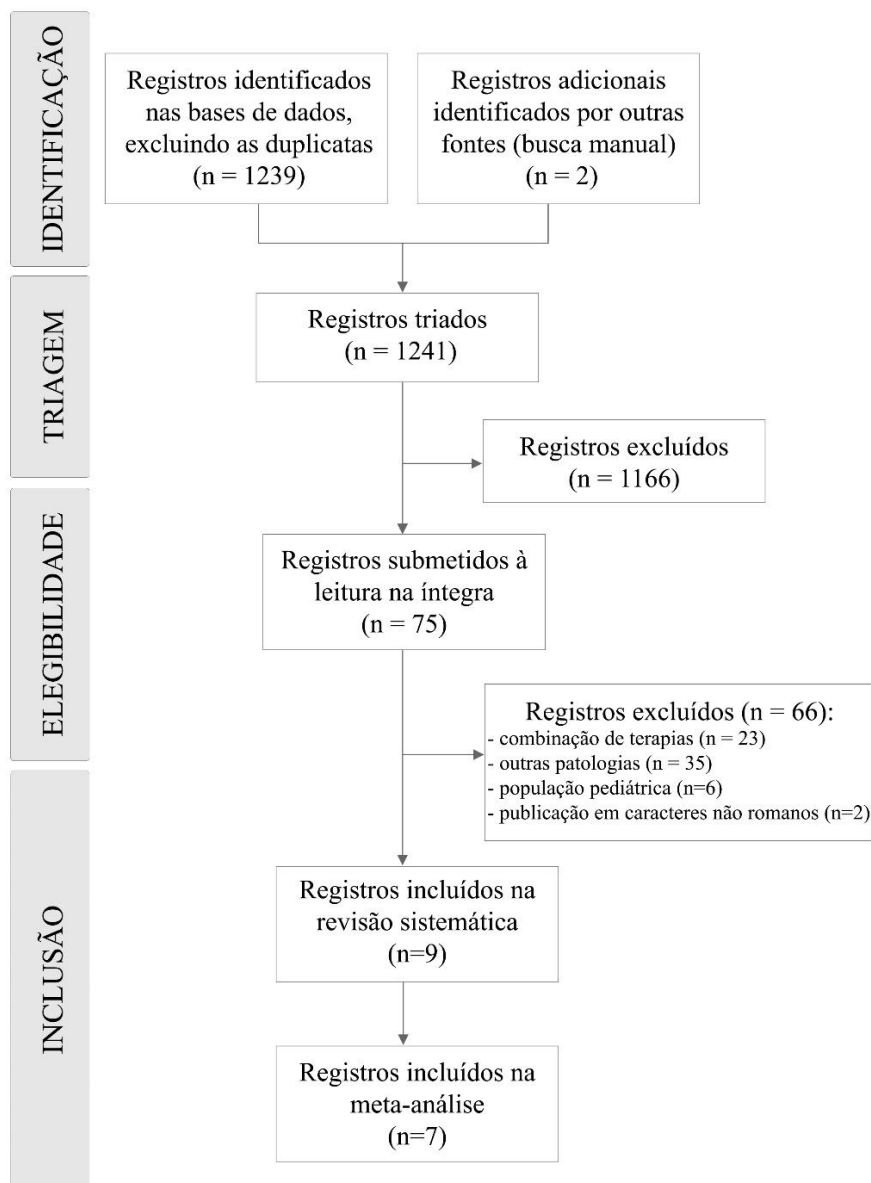
Para a realização de metanálises existem *softwares* específicos, como, por exemplo, o Review Manager® (gratuito), CMA (*Comprehensive Meta-analysis*®) e RStudio®. Os tutoriais devem ser acessados pelos pesquisadores a fim de facilitar a compreensão quanto a utilização destes *softwares*.

Para desfechos dicotômicos, como é o caso da cura clínica (exemplo utilizado neste capítulo), o risco relativo ou o *odds ratio*

poderiam ser escolhidos como medida de efeito. Dessa forma, para a geração destes resultados, faz-se necessário coletar o número de pacientes que curaram e o número total de pacientes submetidos a avaliação deste desfecho em ambos os grupos. Porém, quando se trata de desfechos contínuos, como valores de pressão arterial, outras medidas de efeito devem ser escolhidas, como, por exemplo, diferença média. Neste caso, os valores médios de pressão arterial com seus respectivos desvios padrões devem ser coletados para a geração das estimativas de efeito (vide capítulo anterior para obtenção de maiores detalhes a respeito das medidas de efeito). Dessa forma, os estudos que não trazem os dados necessários para a construção da metanálise acabam sendo incluídos apenas na revisão sistemática.

No exemplo utilizado neste capítulo, considera-se que, hipoteticamente, nove ECR tiveram seus dados extraídos, pois cumpriam os critérios de elegibilidade definidos pelos pesquisadores. Portanto, estes nove ECR compõem a revisão sistemática. Entretanto, supõe-se que, nestes nove estudos, dois deles não trouxeram o número total de pacientes em algum dos grupos (grupo “esomeprazol” ou “outro inibidor da bomba de prótons”). Dessa forma, apenas sete estudos poderiam ser submetidos a metanálise. Adicionalmente, recomenda-se que o autor disponibilize em seu artigo final o fluxograma de seleção dos estudos (MOHER *et al.*, 2009), conforme o exemplo da Figura 3.

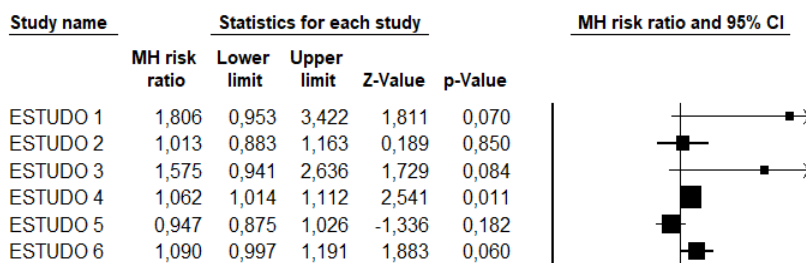
Figura 3 – Exemplo hipotético de fluxograma de seleção dos estudos



Fonte: Próprios autores (2020).

Considere a Figura 4 como um exemplo hipotético dos dados extraídos dos sete ECR, os quais estão descritos no *software* CMA®.

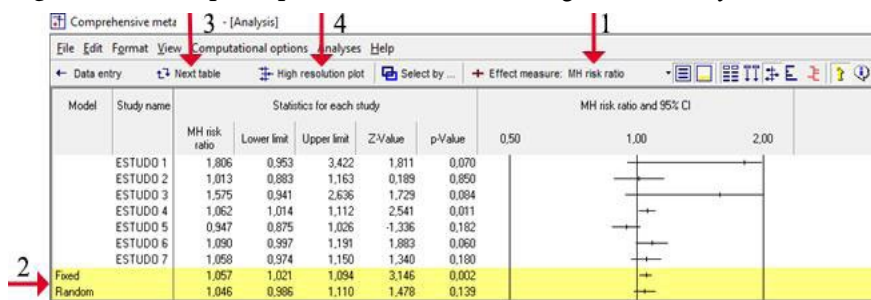
Figura 4 – Exemplo hipotético de plotagem dos dados extraídos no *software* CMA®



Fonte: Próprios autores (2020).

Ao clicar em *Analyses* e *Run analyses*, o seguinte resultado ilustrado na Figura 5 é gerado.

Figura 5 – Exemplo hipotético dos resultados gerados no *software* CMA®



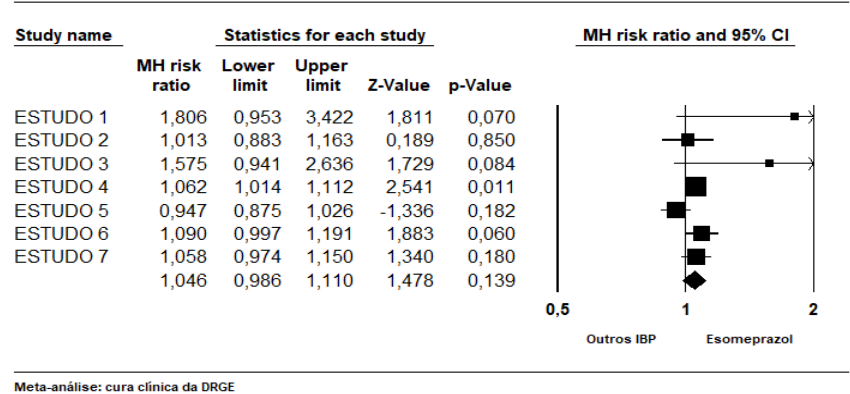
Fonte: Próprios autores (2020).

De acordo com a Figura 5, percebe-se que a medida de efeito escolhida foi risco relativo (*risk ratio*) e o método estatístico foi Mantel-Haenszel (descrito pela letra MH), conforme destacado pela seta 1. Adicionalmente, nas duas linhas na parte inferior da Figura 5, como indicado pela seta 2, estão descritos os resultados referentes aos modelos fixos (RR 1,057 [IC 95% 1,021-1,094]) e randômicos (RR 1,046 [IC95% 0,986-1,110]). Ressalta-se que, para a metanálise de

efeitos fixos, o intervalo de confiança não tocou no 1, sugerindo, portanto, que **há diferença estatística** entre os grupos (neste caso, o esomeprazol seria melhor em relação aos outros IBP para a DRGE, considerando a cura clínica como desfecho). No entanto, quando se utiliza efeitos randômicos, percebe-se que o IC (intervalo de confiança) toca na linha da nulidade, revelando, portanto, que **não haveria diferença estatística** entre os grupos considerando o desfecho em questão. Nesse caso, recomenda-se utilizar a metanálise de efeitos randômicos, pois o I^2 foi igual a **54,35%**, revelando que existe uma heterogeneidade considerável entre os estudos incluídos. Para acessar o resultado da heterogeneidade e de outros parâmetros estatísticos, basta clicar em “*Next table*”, indicado pela seta 3 da Figura 5. Para maiores informações sobre as diferenças de métodos e modelos estatísticos, faz-se necessário consultar o capítulo anterior.

Adicionalmente, ao clicar em *High resolution plot*, conforme descrito na seta 4 da Figura 5, o gráfico em floresta será gerado (Figura 6), o qual poderá ter suas legendas editadas pelo pesquisador.

Figura 6 – Exemplo hipotético do gráfico em floresta gerado pelo *software* CMA®



Fonte: Próprios autores (2020).
Nota: Essa Figura deverá estar disponibilizada no artigo final, juntamente com o resultado da heterogeneidade. Recomenda-se que os estudos sejam descritos pelo sobrenome do primeiro autor e ano de publicação, dispostos em ordem alfabética.

Considerando a existência de uma heterogeneidade substancial no exemplo supracitado, torna-se imprescindível a realização de análises adicionais. A colaboração Cochrane recomenda que as seguintes intervenções sejam realizadas quando a metanálise apresenta de moderada a elevada heterogeneidade:

- a) Rever a extração dos dados;
- b) Não conduzir a metanálise, especialmente quando houver alteração da medida de efeito e quando a heterogeneidade for demasiadamente elevada;
- c) Utilizar modelo de efeitos randômicos;
- d) Explorar a heterogeneidade por meio de:
 - análises de subgrupos;
 - meta-regressão (extensão das análises de subgrupos que permite que os efeitos de múltiplos fatores sejam investigados simultaneamente, porém, não recomendada quando há menos de dez estudos incluídos);
 - análises de sensibilidade (por meio da exclusão hipotética de cada estudo para verificar qual deles foi responsável pela elevada heterogeneidade, por exemplo).

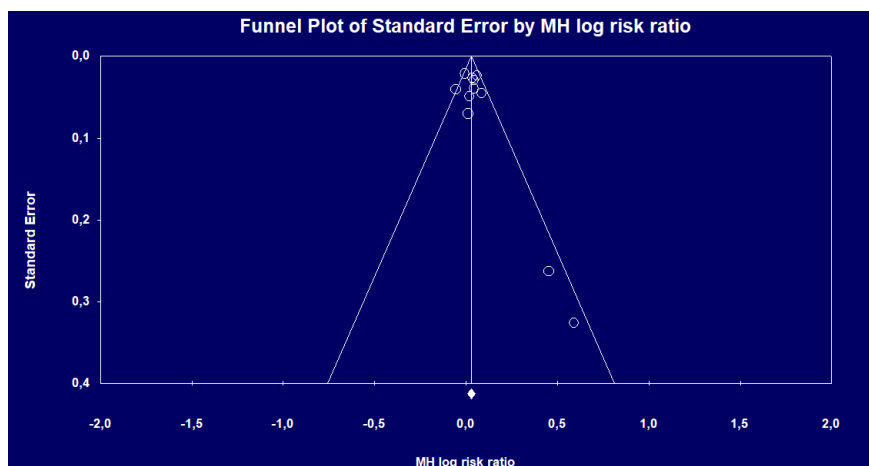
Ao realizar a retirada de cada um dos sete estudos incluídos nesse exemplo, percebeu-se que, com a ausência do ESTUDO 5 na análise, o I^2 caiu para 11%. Dessa forma, é possível inferir que esse estudo foi o responsável pela elevada heterogeneidade encontrada na metanálise. Não é aconselhado retirar esse estudo da metanálise, porém, o autor deve discutir acerca dos resultados da análise de sensibilidade e avaliar criticamente o porquê de esse estudo ter sido responsável pela heterogeneidade. Análises adicionais como essa aumentam a robustez e a confiabilidade dos resultados (AROMATARIS; MUNN, 2020; BRASIL, 2012, 2014a; HIGGINS *et al.*, 2019; KUNG *et al.*, 2010; WHITINGA *et al.*, 2016).

O cálculo adicional de intervalos de predição (*prediction intervals*) também tem sido recomendado por especialistas, pois permite que inferências mais informativas sobre as metanálises sejam produzidas, principalmente quando há elevada heterogeneidade entre os estudos. O reporte desse resultado torna-se fundamental quando metanálises revelam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados (ou seja, quando o diamante não toca na linha da nulidade), porém, à custa de uma elevada heterogeneidade. Usualmente, esse intervalo é mais largo que o intervalo de confiança (IC). Adicionalmente, esse cálculo considera o número de estudos, o efeito médio, o IC e a distribuição dos tamanhos reais de efeitos entre estudos (tau-quadrado) em unidades logarítmicas, os quais são disponibilizados pelo próprio *software* (ao clicar em “Next Table” da Figura 5) (BORENSTEIN *et al.*, 2017; INTHOUT *et al.*, 2016).

Por fim, os autores das revisões sistemáticas e metanálises devem realizar a avaliação do viés de publicação. Estudos primários que revelam resultados positivos são mais facilmente publicados em relação àqueles com resultados negativos. Dessa forma, o viés de publicação representa um dos principais vieses encontrados em uma revisão sistemática (AROMATARIS; MUNN, 2020; BRASIL, 2012, 2014a; HIGGINS *et al.*, 2019).

Inúmeros testes estatísticos podem ser realizados para identificar a existência desse tipo de viés, sendo o gráfico de funil o método mais amplamente conhecido (BRASIL, 2012). Para visualizar o gráfico em funil pelo *software* CMA®, basta clicar em *Analysis* (descrito na barra superior da Figura 5) e *Publication bias*. No caso do exemplo listado neste capítulo, essa análise não pôde ser concluída, uma vez que a colaboração Cochrane recomenda que ela seja realizada apenas quando há 10 estudos ou mais (HIGGINS *et al.*, 2019). O poder desse método para detectar viés é baixo quando existem poucos estudos na metanálise (BRASIL, 2012). Na Figura 7, está representado um exemplo hipotético de gráfico em funil.

Figura 7 – Gráfico de funil hipotético



Fonte: Próprios autores (2020).

Esse gráfico apresenta, na escala horizontal, a medida de efeito e, na escala vertical, alguma medida que reflete o tamanho de amostra ou precisão dos estudos individuais (representados pelos pontos dispersos no gráfico). Na ausência de viés de publicação, os estudos estarão dispersos em formato de funil invertido. Na base, estariam os estudos com menores tamanhos amostrais, que podem apresentar variações nas tendências da estimativa do efeito simplesmente devido ao acaso, uma vez que não possuem poder, tampouco precisão suficientes para demonstrar uma estimativa confiável. Dessa forma, conforme os estudos maiores são publicados, a estimativa de efeito tende a permanecer semelhante e cada vez mais precisa, configurando a ponta do funil. Se na base do funil não existirem pontos, sugere-se que os estudos de resultados negativos não foram publicados, portanto, a assimetria do gráfico configuraria um viés de publicação, o qual deve ser discutido pelo pesquisador em seu artigo final. Outras análises estatísticas utilizadas para avaliação do viés de publicação, como teste de regressão de Egger's e o método trim e fill, estão disponíveis nos manuais da colaboração Cochrane, JBI e nas diretrizes do Ministério da Saúde

(AROMATARIS; MUNN, 2020; BRASIL, 2012, 2014a; HIGGINS *et al.*, 2019).

Por fim, embora não seja uma etapa obrigatória, manuais recentes recomendam que os autores das revisões sistemáticas e metanálises realizem a avaliação da qualidade da evidência gerada, por meio do sistema GRADE – *Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation* (BRASIL, 2014b; HIGGINS *et al.*, 2019). Trata-se de um sistema abrangente e transparente para a avaliação da qualidade da evidência e para a formulação de recomendações, representando uma ferramenta útil na elaboração de diretrizes em saúde que auxilia o processo de tomada de decisão. Entretanto, é um sistema complexo, necessitando de treinamento prévio dos pesquisadores, assim como um conhecimento em epidemiologia clínica. A avaliação da qualidade da evidência pelo sistema GRADE é realizada por desfecho incluído na metanálise, cujo nível de evidência será classificado em alto, moderado, baixo ou muito baixo (Quadro 3). Para a correta utilização desse sistema, recomenda-se a leitura do manual específico do Ministério da Saúde (BRASIL, 2014b).

Quadro 3 – Níveis de evidências de acordo com o sistema GRADE

Nível	Definição	Implicações	Fontes de informação
Alto	Há forte confiança de que o verdadeiro efeito esteja próximo daquele estimado pelo estudo	É improvável que trabalhos adicionais irão modificar a confiança na estimativa do efeito	-Ensaio clínicos bem delineados, com amostra representativa -Em alguns casos, estudos observacionais bem delineados*
Moderado	Há confiança moderada no efeito estimado	Trabalhos futuros poderão modificar a confiança na estimativa de efeito, podendo, inclusive, modificar a estimativa	-Ensaio clínicos com limitações leves** -Estudos observacionais bem delineados, com achados consistentes*
Baixo	A confiança no efeito é limitada	Trabalhos futuros provavelmente terão um impacto importante sobre a confiança na estimativa de efeito	-Ensaio clínicos com limitações moderadas** -Estudos observacionais comparativos: coorte e caso-controle
Muito baixo	A confiança na estimativa de efeito é muito limitada	Qualquer estimativa de efeito é incerta	-Ensaio clínicos com limitações graves** -Estudos observacionais comparativos com de limitações** -Séries e relatos de casos -Opinião de especialistas

Fonte: Adaptado das diretrizes metodológicas do sistema GRADE (Brasil, 2018).

*Estudos de coorte sem limitações metodológicas, com achados consistentes.

**Vieses no delineamento do estudo, inconsistência nos resultados, desfechos substitutos ou validade externa comprometida.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o processo de condução e reporte de revisões sistemáticas e metanálises exija um rigor metodológico, muitos autores não seguem as recomendações de diretrizes e manuais mundialmente conhecidos, situação que compromete a qualidade, a transparência, a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados (BONETTI *et al.*, 2020; IOANNIDIS, 2017, 2016; TONIN *et al.*, 2018).

Estudos prévios demonstraram a existência de uma grande quantidade de revisões sistemáticas e metanálises de áreas biomédicas conduzidas de maneira inadequada (BONETTI *et al.*, 2020; IOANNIDIS, 2017, 2016; TONIN *et al.*, 2018). Ioannidis e colaboradores (2017) revelaram que uma em cada três metanálises relacionadas às ciências da saúde é redundante ou desnecessária e aproximadamente metade das demais apresenta falhas metodológicas importantes (IOANNIDIS, 2016).

Algumas ferramentas podem ser utilizadas para que o autor se certifique da qualidade metodológica de sua revisão sistemática e metanálise, como, por exemplo, o R-AMSTAR (*Revised Assessment of Multiple Systematic Reviews*). Trata-se de um instrumento de 11 domínios, nos quais uma pontuação de 1 a 4 deve ser atribuída de acordo com o cumprimento de determinados itens relacionados ao processo metodológico e ao reporte das informações. Quanto maior a pontuação gerada pelo R-AMSTAR, maior é a qualidade metodológica do estudo, sendo o escore máximo igual a 44 pontos (KUNG *et al.*, 2010). Por sua vez, uma ferramenta denominada ROBIS (*Risk of Bias in Systematic Reviews*) foi recentemente publicada, cuja finalidade é verificar o risco de viés das revisões sistemáticas com ou sem metanálises (WHITINGA *et al.*, 2016). Nela, quatro domínios são avaliados, os quais definirão o risco global de viés do estudo (baixo, incerto ou alto). Reitera-se que tais instrumentos servem apenas para que os pesquisadores verifiquem a qualidade de suas produções, não sendo necessário reportá-los no artigo final.

Nesse contexto, considera-se importante que os pesquisadores dominem as diretrizes e manuais disponíveis para a condução e reporte de revisões sistemáticas e metanálises previamente a realização das mesmas (AROMATARIS; MUNN, 2020; BRASIL, 2012, 2014a; HIGGINS *et al.*, 2019; KUNG *et al.*, 2010; MOHER *et al.*, 2009; WHITINGA *et al.*, 2016), uma vez que falhas no processo metodológico podem comprometer a interpretação dos resultados

REFERÊNCIAS

- AROMATARIS, E.; MUNN, Z. JBI Manual for Evidence Synthesis. **Joanna Briggs Institute**, 2020. Disponível em: <https://synthesismanual.jbi.global>. Acesso em: 20 jul. 2020.
- BONETTI, A. F.; ROCCA, A. M. D.; LUCCHETTA, R. C.; TONIN, F. S.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; PONTAROLO, R. Mapping the characteristics of meta-analyses of pharmacy services: a systematic review. **International Journal of Clinical Pharmacy**, v. 42 n. 5, p. 1252-1260, 2020.
- BORENSTEIN, M.; HIGGINS, J. P. T.; HEDGES, L. V.; ROTHSTEIN, H. R. Basics of meta-analysis: I^2 is not an absolute measure of heterogeneity. **Research Synthesis Methods**, v. 8, n. 1, p. 5-18, 2017.
- BRASIL. **DIRETRIZES METODOLÓGICAS: Elaboração de revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos randomizados**. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. 1. ed. Brasília: MS, 2012.
- BRASIL. **DIRETRIZES METODOLÓGICAS: Elaboração de revisão sistemática e metanálise de estudos observacionais comparativos sobre fatores de risco e prognóstico**. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. 1. ed. Brasília: MS, 2014a.
- BRASIL. **DIRETRIZES METODOLÓGICAS: Sistema GRADE – manual de graduação da qualidade da evidência e forma de recomendação para tomada de decisão em saúde**. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. 1. ed. Brasília: MS, 2014b.
- HIGGINS, J. P. T.; THOMAS, J.; CHANDLER, J.; CUMPSTON, M.; LI, T.; PAGE, M. J.; WELCH, V. A. **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.0**. Cochrane, 2019. Disponível em: www.training.cochrane.org/handbook. Acesso em: 20 jul. 2020.

INTHOUT, J.; IOANNIDIS, J. P. A.; ROVERS, M. M.; GOEMAN, J. J. Plea for routinely presenting prediction intervals in meta-analysis. **British Medical Journal Open**, v. 6, n. 7, p. 1-6, 2016.

IOANNIDIS, J. P. A. Meta-Analyses Can Be Credible and Useful A New Standard. **JAMA Psychiatry**, v. 74, n. 4, p. 311-312, 2017.

IOANNIDIS, J. P. A. The Mass Production of Redundant, Misleading, and Conflicted Systematic Reviews and Meta-analyses. **The Milbank Quarterly**, v. 94, n. 3, p. 485-514, 2016.

KUNG, J.; CHIAPPELLI, F.; CAJULIS, O. O.; AVEZOVA, R.; KOSSAN, G.; CHEW, L.; MAIDA, C. A. From Systematic Reviews to Clinical Recommendations for Evidence-Based Health Care: Validation of Revised Assessment of Multiple Systematic Reviews (R-AMSTAR) for Grading of Clinical Relevance. **The Open Dentistry Journal**, v. 4, n. 1, p. 84-91, 2010.

LAM, M. T.; LONGHI, C. D.; TURNBULL, J.; LAM, H. R.; BESA, R. Has Embase replaced MEDLINE since coverage expansion? **Journal of the Medical Library Association**, v. 106, n. 2, p. 217-234, 2018.

MCGOWAN, B. J.; SAMPSON, M. Systematic reviews need systematic searchers. **Journal of the Medical Library Association**, v. 93, n. 1, p. 74-80, 2005.

MITTAL, N.; GOYAL, M.; MITTAL, P. K. Understanding and Appraising Systematic Reviews and Meta-Analysis. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 41, n. 5, p. 317-326, 2017.

MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D. G.; GROUP, T. P. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. **PLOS Medicine**, v. 6, n. 7, p. 1-7, 2009.

TONIN, F. S.; STEIMBACH, L. M.; MENDES, A. M.; BORBA, H. H.; PONTAROLO, R.; FERNANDEZ-LLIMOS, F. Mapping the characteristics of network meta-analyses on drug therapy: A systematic review. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1-16, 2018.

UMAN, L. S. Systematic Reviews and Meta-Analyses. **Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 57-59, 2011.

WHITING, P.; SAVOVIC, J.; HIGGINS, J. P. T.; CALDWELL, D. M.; REEVES, B. C.; SHEA, B.; DAVIES, P.; KLEIJNEN, CHURCHILL, R.; GROUP, the R. ROBIS: A new tool to assess risk of bias in systematic reviews was developed. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 69, n. 1, p. 225-234, 2016.



Capítulo 21

CIENCIOMETRIA

O que é e como fazer

ELIZABETH DE FÁTIMA LOPES DA ROCHA
IARA BARBOSA CABRAL
FLÁVIO MONTEIRO AYRES

1 INTRODUÇÃO

1.1 A ciência da informação e a bibliometria

A comunicação pode se apresentar de formas diversificadas em diferentes contextos, sempre com o objetivo de transmitir a mensagem de maneira assertiva. A produção científica destaca-se por disseminar informações por meio de publicações (PARRA, 2019). Todo esse acervo contém bem mais que relevantes resultados, trata-se de um conhecimento acessível para uso comum de forma permanente, que passa por atualizações e reformulações, inclusive quanto aos indicadores de avaliação da produção científica. Esse constante aperfeiçoamento permite compreender o atual contexto da aferição e mapeamento da atividade científica, proporcionando que a sociedade se aproprie do conhecimento produzido por instituições de pesquisa e mantenha-se a par do direcionamento desses estudos (SANTOS; KOBASHI, 2009).

A ciência tem por objetivo levar o pesquisador à investigação de algo, à busca por respostas e à elaboração de novos conhecimentos que possam ser compartilhados e que demonstrem seu valor

através de publicações em periódicos e eventos científicos (ARAÚJO, 2009). Dentro do contexto da ciência e da produção científica, temos a parte que trata sobre a ciência da informação, que é um extenso grupo que engloba estudos como a informetria, bibliometria e a cientometria ou “cienciometria”, que é o foco deste estudo (FREIRE; GARCIA, 2002; VELHO, 1997;).

Em meados da Segunda Guerra Mundial, houve o surgimento da ciência da informação que, posteriormente, sofreu inúmeras modificações até se tornar o que é hoje: parte da ciência responsável por medir, qualificar e quantificar determinados tipos de informações a que o pesquisador se propõe a estudar. Dentro desse contexto, o presente trabalho se propõe a apresentar uma revisão de literatura metodológica, enfatizando que as análises cienciométricas permitem a compreensão multidisciplinar inerente ao campo das ciências da saúde, sem restringir perspectivas futuras e agregando conhecimentos nos passos da ciência atual (SERACEVIC, 1996).

O aumento dos estudos bibliométricos e cienciométricos pode ser contabilizado nas áreas da Medicina, Genética, Bioquímica, Biologia Molecular, Ciências Sociais, Enfermagem e Ciências da Computação corroborando a interdisciplinaridade do conhecimento. O interesse dos pesquisadores da área das Ciências da Saúde pela cienciometria, segundo registros da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), é demonstrado pela própria estrutura do tipo de estudo, visto que propõe métodos de pesquisa quantitativa e de aplicação social no registro do conhecimento humano (BACAL, 2009).

Este capítulo visa fornecer orientações simplificadas para a realização de estudos cienciométricos. Trata-se de um estudo com coleta de dados realizada por levantamento bibliográfico, buscando enfatizar a relevância da abordagem cienciométrica para a literatura científica e o delineamento de seu processo metodológico. A presente pesquisa teve início em 1 de julho de 2020 e término no dia 15 do referido mês, utilizando as bases de dados *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) e Literatura Latino-Americana

e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS). Os critérios de inclusão definidos para a seleção dos artigos foram: artigos publicados em português, inglês e espanhol; artigos na íntegra que retratassem a temática referente à cienciometria e artigos publicados e indexados nos referidos bancos de dados sem limite de período de publicação. Foram encontrados 150 estudos publicados no *SciELO* e 64 no LILACS. Com a aplicação dos filtros “Indicadores de produção científica, Ciências da Saúde, Indicadores bibliométricos, Bibliometria, Ciência da Informação, Atividades Científicas e Tecnológicas” alcançou-se um total de 19 artigos no LILACS. No *SciELO*, os filtros “Ciência da Informação” e “Ciências da Saúde” resultaram em 37 artigos. Para a composição do presente trabalho foram utilizados 18 estudos, dos quais extraiu-se parte da metodologia, a fim de destacar a relevância da cienciometria e as etapas da construção metodológica.

Dentro do campo da ciência e da produção científica, existe um extenso grupo conhecido por “ciência da informação” que engloba estudos como a informetria, a bibliometria e a cienciometria. A informetria é um termo que se popularizou há pouco mais de uma década, podendo abranger, ou não, as áreas da bibliometria e cienciometria. É o estudo dos aspectos quantitativos da informação em qualquer formato, e não apenas registros catalográficos ou bibliografias, referente a qualquer grupo social, e não apenas aos cientistas (GLANZEL; SCHOEPFLIN, 1993; VANTI, 2011).

O termo bibliometria foi usado pela primeira vez em 1969 por *Alan Pritchard*. Em 1992, *Tague-Sutcliff* conceituou que bibliometria é o estudo dos aspectos quantitativos da produção, disseminação e uso das informações registradas. Modelos matemáticos e métricas são desenvolvidos para esses processos e os resultados são usados para elaborar previsões e tomada de decisões (PARRA, 2019).

A avaliação da literatura científica, como precursora da cienciometria, remonta ao começo do século XX. O termo cienciometria surgiu na antiga URSS e na Europa Oriental. Entre os primeiros

autores a utilizá-lo estão Dobrov & Karennoi, em uma publicação do *All-Union Institut for Scientific and Technical Information (VINITI)*. Em 1963, a criação do *Science Citation Index (SCI)* trouxe luz para todos os que buscavam medir a ciência usando métodos quantitativos e objetivos (MACIAS-CHAPULA, 1998; NONATO, 2003).

Podemos dizer que a cienciometria é a parte da ciência que trata a pesquisa quantitativa de forma objetiva, analisando tanto a produção científica quanto quem a produz. Por meio de ferramentas específicas, é possível identificar a quantidade de estudos publicados sobre um mesmo tema, bem como os autores, periódicos, idiomas e períodos de publicação. Sendo assim, observa-se que a ciência pode ser retratada pelos resultados que alcança nas abordagens cienciométricas. Tais resultados se baseiam na noção de que a essência da pesquisa científica é produzir conhecimento e que a literatura científica é um componente essencial desse conhecimento (SANTOS; KOBASHI, 2009).

No Quadro 1, é possível observar a identificação e classificação dos componentes de cada tipo de estudo relacionando-os com os objetivos, variáveis, métodos e objetos (MCGRATH, 1989).

A aplicação da técnica cienciométrica é utilizada na condução de análises da literatura científica, possibilitando a identificação de parâmetros como ano de publicação de determinado assunto, autores, fator de impacto dos periódicos, agências de fomento etc. Essa técnica fornece dados sobre a orientação e a dinâmica científica de forma global ou localizada (países, regiões). As redes científicas estabelecem conexões que detectam e revelam os elos entre países, instituições e pesquisadores, assim como elucidam o impacto de programas e organizações. Por fim, a cienciometria evidencia a estrutura das disciplinas científicas e como elas se relacionam (SPINAK, 2001).

Quadro 1 – Tipologia de definição e classificação da bibliometria, cienciometria e informetria

Tipologia	Bibliometria	Cienciometria	Informetria
Objetos estudados	Documentos, livros, artigos, usuários, revistas e autores.	Disciplinas, assuntos e áreas.	Documentos, palavras, bases de dados.
Variáveis	Número de citações, frequência de citações de palavras...	Revistas, autores e documentos; forma como os cientistas se comunicam; fatores de diferenciação entre disciplinas e subdisciplinas.	Mede a recuperação, a relevância e revocação.
Métodos	Frequência, ranking e distribuição.	Análise de conjunto e correspondência.	Modelos booleanos de recuperação e probabilísticos, linguagem de processamento e abordagens baseadas no conhecimento.
Objetivos	Alocação de recursos: dinheiro, tempo...	Identificar onde os assuntos se concentram.	Promover a melhoria da eficiência da recuperação.

Fonte: Adaptado de Macias-Chapula (1998).

2 DESCRIÇÃO DO PERCURSO METODOLÓGICO

Etapas necessárias para a construção e desenvolvimento de uma cienciometria:

1º passo: Determinar a pergunta norteadora

A pergunta norteadora deverá ser clara pois, a investigação da problemática gerada, delimitará uma conclusão concisa.

2º passo: Eleger as bases de dados

As bases de dados científicos são acervos eletrônicos que compreendem vasta gama de informações dispostas de forma estruturada e de fácil consulta. Algumas dessas bases são multidisciplinares ou específicas de uma área. Em Ciências da Saúde, a *PubMed* é um exemplo especializado em literatura médica e biomédica (PUBMED, 2020).

Poucas bases de dados incluem livros e capítulos de livros, sendo que a maioria não incorpora a assim chamada literatura cinzenta, que engloba teses, dissertações, conferências, relatórios técnicos etc. A necessidade de se incluírem estudos oriundos da literatura cinzenta em uma pesquisa depende, em grande parte, da disciplina, assunto, abordagem metodológica e recursos usados. No campo de ciências médicas e da saúde, tradicionalmente, há a tendência em se usarem apenas estudos revisados por pares, enquanto, em outros campos como ciências da engenharia e agricultura, a literatura cinzenta tende a predominar (BOTELHO; OLIVEIRA, 2015).

Listando alguns exemplos de bases de dados aplicáveis para a pesquisa, com os respectivos endereços eletrônicos, temos:

- *PubMed*: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

Primeiro sistema de pesquisa para a informação em saúde da U.S. *National Library of Medicine* (NLM). Disponível gratuitamente (PUBMED, 2020).

- *SciELO*: <https://scielo.org/>

Scientific Electronic Library Online é um portal eletrônico que reúne uma coleção selecionada de periódicos científicos brasileiros. Possui acesso gratuito (SCIELO, 2020).

- LILACS: <https://lilacs.bvsalud.org/>

Literatura Latino – Americana e do Caribe em Ciências da Saúde, trata-se de uma importante biblioteca virtual gratuita, especializada na área da saúde, abrangendo literatura técnica e científica (LILACS, 2020).

- *Google Scholar*: <https://scholar.google.com.br/>

Plataforma de pesquisa de acesso livre que abarca um acervo diversificado de publicações de conteúdo científico (GOOGLE, 2020).

- Periódicos Capes: <https://www.periodicos.capes.gov.br/>

Portal brasileiro de informação científica ofertado de forma gratuita para as instituições participantes (CAPES, 2020).

As bases de dados *Web of Science* (<https://login.webofknowledge.com/>) e SCOPUS (<https://www.scopus.com/>) apresentadas no Quadro 2, são consideradas as maiores coleções de arquivos científicos. Ambas solicitam o vínculo institucional do pesquisador para ter acesso ao acervo (SCOPUS, 2020; WOS, 2020).

Quadro 2 – Apresentação das bases de dados *Web of Science* e *SCOPUS*

Web of Science	Scopus
• Atualizado semanalmente; • Conta com mais de 34.502 periódicos, livros, procedimentos, patentes e conjuntos de dados que fornece acesso a índices de citação multidisciplinares e regionais, de família de patentes, e para conjuntos de dados científicos; • Oferece uma vasta visão da produção científica mundial.	• Atualizado diariamente; • Cobre todas as áreas do conhecimento oferecendo mais de 18.000 periódicos especializados de mais de 5.000 editores, 23 milhões de patentes em cinco escritórios de patentes; • Maior base de dados de resumos e citações.

Fonte: SCOPUS (2020); WOS (2020).

3º passo: elaborar e aplicar a estratégia de busca de referências bibliográficas

O desenvolvimento da estratégia de busca de referências bibliográficas é um fator fundamental para o êxito dos resultados. Palavras-chave, unitermos ou descritores são palavras selecionadas para classificar informações, facilitando a pesquisa bibliográfica (PEREIRA, 2011). O DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) desenvolvido com base no MeSH (*National Library of Medicine* (NLM) *Medical Subject Titles*) permite a pesquisa em vários idiomas, usando terminologia comum, oferecendo um método consistente de recuperação de informações. Pode ser acessado, irrestritamente, pelo endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br/>.

Os operadores booleanos (AND, OR, NOT) podem atuar ampliando ou restringindo o acervo de dados, assim como o uso do asterisco, aspas e parênteses. O asterisco considera todas as possíveis terminações da palavra, incluindo o plural. As aspas e os parênteses alocam os vocábulos que devem ser pesquisados de forma conjunta. Embora sejam ferramentas bastante utilizadas, podem mudar a função de acordo com a base de dados em uso. Exemplo:

- (“Dipteryx alata” AND “cerrado fruit*”) OR baru NOT “human health”

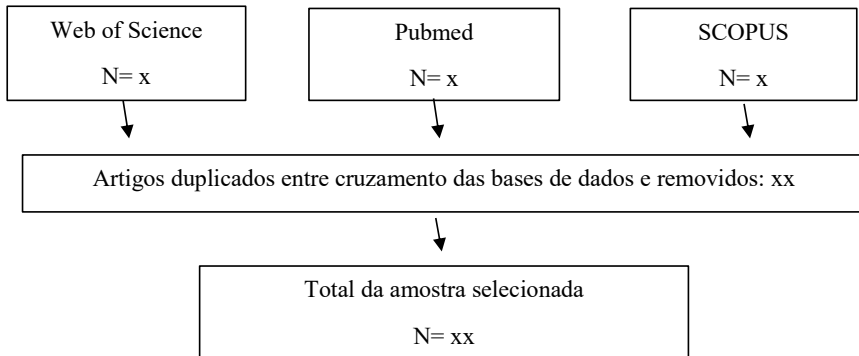
A plataforma *PubMed* apresenta um recurso particular denominado “tiab” na aba de pesquisa avançada. Esse termo procura nos títulos e resumos os descritores selecionados. Exemplo:

- “Dipteryx alata” [tiab] “cerrado fruits” [tiab]

4º passo – Registro das referências bibliográficas encontradas

Todas as referências bibliográficas devem ser organizadas e contabilizadas, preferencialmente, em um modelo de fluxograma, como mostra a Figura 1. Não há necessidade de cegamento para os pesquisadores participantes.

Figura 1 – Fluxograma de identificação das publicações nas bases de dados



Fonte: Próprios autores (2021).

5º passo: Seleção das referências bibliográficas

Após as referências serem contabilizadas, inicia-se a leitura de títulos e resumos, obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão determinados para a condução da pesquisa. Esses critérios podem estar relacionados quanto aos aspectos éticos, tipos de estudos, número de registro em plataformas, objetivos e resultados, como detalha o Quadro 3.

Quadro 3 – Razões para inclusão ou exclusão dos artigos

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
Artigos em português, inglês, francês e espanhol; Texto integral disponível; Objetivos claros.	Artigos em idiomas de difícil compreensão; Apenas resumo disponível; Metodologia pouco detalhada.

Fonte: Marziale (2011).

6º passo: Extração dos dados

Os textos selecionados serão lidos na íntegra e será feita a coleta de dados por intermédio de um fichamento, como demonstrado no Quadro 4. Ficará a critério do pesquisador estabelecer quais os tópicos que irão compor o fichamento.

Quadro 4 – Modelo de distribuição dos artigos incluídos de acordo com o formato, título, autores, ano de publicação, periódico e fator de impacto

Formato	Título	Autores	Ano	Periódico	Fator de impacto
Artigo	Demographic history and the low genetic diversity in <i>Dipteryx alata</i>	RG Colevatti, MPC Telles, JC Nabout, LJ Chaves, TN Soares	2013	Heredity	3.436

Fonte: Marziale (2011).

7º passo: Análise dos dados extraídos

A partir da fichamento, as informações obtidas poderão ser tabuladas, separadamente, em planilhas de *softwares* como o Excel. A síntese e interpretação dos dados permitirá identificar os tipos de publicações (artigos, *papers*, revisões), analisar as áreas do conhecimento relacionadas ao tema pesquisado, listar os periódicos que publicaram sobre o assunto e os respectivos fatores de impacto, listar os autores e as palavras-chave utilizadas para a indexação dos artigos, quantificar o número de citações, levantar o período em que houve mais publicações sobre o tema, entre outros (VANTI, 2002). A escolha do *software* estatístico que irá avaliar os dados dependerá da quantidade dos mesmos e da preferência do pesquisador, pois alguns programas são gratuitos e outros dependem da

aquisição da chave de licença. Entre os *softwares* mais utilizados, estão o Bioestat, SPSS, STATISTICA e Minitab.

Com a aplicação de estatística descritiva, será possível determinar valores como média e desvio padrão entre as variáveis estabelecidas. Já com a estatística inferencial, poderá haver comparação de médias, análise da variância ou verificação de correlação entre os dados, desde que seja escolhido o teste adequado (paramétricos ou não-paramétricos). Os testes comumente aplicados em trabalhos cienciométricos são o de correlação linear de Pearson, correlação de Spearman, teste de Kolmogorov-Smirnov e teste de Shapiro-Wilk (NORMANDO; TJADERHANE; QUINTAO, 2010).

As análises de correlação possibilitam verificar o grau de associação entre duas ou mais variáveis. A correlação de Pearson avalia reações lineares, enquanto a correlação de Spearman avalia relações monotônicas. Quando uma mudança em uma variável está relacionada a uma mudança proporcional em outra variável, a relação é linear. Quando as variáveis tendem a mudar juntas, não obrigatoriamente em uma taxa constante, a relação é monotônica. Os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk fornecem uma estatística para avaliar se uma amostra tem distribuição normal (AYRES, 2007).

8º passo: Apresentação da cienciométrica

O trabalho cienciométrico deverá ser claro e sucinto, de modo a facilitar a compreensão do leitor. É de essencial importância que todas as etapas sejam bem redigidas, atendendo de forma fiel os dados que foram extraídos da literatura científica. A ilustração dos resultados com o uso de gráficos, quadros e tabelas enriquece a escrita, propiciando melhor entendimento do conteúdo abordado. Ao autor é entregue a responsabilidade de evidenciar dados confiáveis e legítimos dentro da comunidade científica (VANTI, 2011).

9º passo: Discussão dos resultados e conclusão

O significado dos resultados, as comparações com os achados da pesquisa, discrepâncias ou perspectivas devem ser relatadas de forma imparcial. O autor estabelecerá uma conexão entre os diversos resultados e o sentido geral das questões envolvidas, culminando em uma conclusão coerente com os objetivos da pesquisa realizada. É de suma importância a divulgação da relevância do estudo cienciométrico para a comunidade científica, compreendendo o poder de identificar, impactar ou direcionar tendências (NONATO, 2003).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cienciométrica é definida como a expressão mais direta e acessível à síntese do conhecimento científico de um determinado tema, aferindo os resultados do empenho acadêmico sobre a produção científica sem a restrição monetária de investimentos. Assim sendo, torna possível compreender as peculiaridades metodológicas de uma análise macro de qualquer assunto em questão.

O dinamismo conceitual no campo das ciências da saúde entrelaça a malha de conhecimentos multidisciplinares históricos. Assim, a cienciométrica torna-se uma ferramenta útil e aplicável para ampliar e complementar compreensões à cerca da ciência.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, C. A. A. Correntes teóricas da ciência da informação. **Ciência da Informação**, Brasília, DF, v. 38, n. 3, p.192-204, 2009.
- AYRES, M; AYRES JÚNIOR, M; AYRES D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat: Aplicações estatísticas na área de ciências biomédicas**. 4. ed. Belém, 2007.
- BACAL, F. Impacto das publicações científicas brasileiras nos recentes avanços científicos na Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 6, p. 581-583, 2009.
- BOTELHO, R. G.; OLIVEIRA, C. C. Literaturas branca e cinzenta: uma revisão conceitual. **Ciência da Informação**, Brasília, DF, v. 44, n. 3, p. 501-513, set./dez.

2015. Disponível em: <http://revista.ibict.br/ciinf/article/view/1804/3251>. Acesso em: 4 jul. 2020.

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Brasília, DF. Disponível em: <https://www.periodicos.capes.gov.br/>. Acesso em: 4 jul. 2020.

DESCRIPTORES EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: DeCS. 2020. ed. rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS / OMS, 2017. Disponível em: <http://decs.bvsalud.org>. Acesso em: 10 jul. 2020.

FREIRE, G. H.; GARCIA, J. C. R. Avaliação científica: a visão do pesquisador. Repositório Brapci – **Informação e Sociedade: Estudos, Rio Grande do Sul**, v. 12, n. 2, p. 253-268, 2002.

GLANZEL, W.; SCHOEPLIN, U. Little scientometrics, big scientometrics... and beyond? In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIBLIOMETRICS, SCIENTOMETRICS AND INFORMETRICS, 1993, Berlin. **Fourth International Conference...** Berlin: [s.n.], 1993.

GOOGLE SCHOLAR, 2020. Disponível em: <https://scholar.google.com.br/>. Acesso em: 10 jul. 2020.

LILACS – Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde. São Paulo: Bireme. Disponível em: <https://lilacs.bvsalud.org/>. Acesso em: 1 jul. 2020.

MACIAS-CHAPULA, C. A. O papel da informetria e da cienciometria e sua perspectiva nacional e internacional. **Ciência da Informação**, Brasília, v. 27, n. 2, 1998.

MARZIALE, M. H. P. Indicadores da produção científica iberoamericana. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 19, n. 4, jul./ago. 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/rlae/v19n4/pt_01.pdf. Acesso em: 5 jul. 2020.

MCGRATH, W. What bibliometricians, scientometricians and informetricians study; a typology for definition and classification; topics for discussion. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIBLIOMETRICS, SCIENTOMETRICS AND INFORMETRICS, 1989, Ontario. **Second Conference...** Ontario: The University of Western Ontario, 1989.

NONATO, R. M. S. Produção científica: por que medir? O que medir? **Revista Digital de Biblioteconomia e Ciência da Informação**, v. 1, n. 1, p. 22-38, 2003.

NORMANDO, D.; TJADERHANE, L.; QUINTAO, C. C. A. Um guia baseado em PowerPoint® para auxiliar na escolha do teste estatístico adequado. **Dental Press Journal of Orthodontics**, Maringá, v. 15, n. 1, p. 101-106, fevereiro de 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S217694512010000100012&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 15 jul. 2020.

PARRA, M. R.; COUTINHO, R. X.; PESSANO, E. F. C. Um breve olhar sobre a cienciometria: origem, evolução, tendências e sua contribuição para o ensino de ciências. **Contexto & Educação**, v. 34, n. 107, p.126-141, 2019.

PEREIRA, M. G. **Artigos científicos: como redigir, publicar e avaliar**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2011.

PUBMED – Bethesda: US National Library of Medicine. Disponível em: <http://pubmed.gov>. Acesso em: 10 jul. 2020.

PRITCHARD, A. Statistical bibliography or bibliometrics? **Journal of Documentation**, n. 25, p. 348-9, 1969.

TAGUE-SUTCLIFFE, J. An introduction to informetrics. **Information Processing & Management**, v. 28, n. 1, p. 1-3, 1992.

SANTOS, R. N. M.; KOBASHI, N. Y. Bibliometria, cientometria, informetria: conceitos e aplicações. **Tendências da Pesquisa Brasileira em Ciência da Informação**, v. 2. n. 1, p. 155-172, 2009.

SERACEVIC, T. Ciência da informação: origem, evolução e relações. **Ciência da Informação**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 41-62, 1996.

SCIELO – Scientific Electronic Library Online. São Paulo: Bireme. Disponível em: <https://scielo.org/>. Acesso em: 8 jul. 2020.

SCOPUS – SciVerse Scopus. Elsevier. Disponível em: <https://www.scopus.com/>. Acesso em: 8 jul. 2020.

SILVA, J. A.; BIANCHI, M. L. P. Cienciometria: a métrica da ciência. **Revista Paideia**, v. 11, n. 20, p. 5-10, 2001.

SPINAK, E. Indicadores cienciométricos. **Ciência da Informação**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 141-148, 1998.

SPINAK, E. Indicadores cienciométricos. **ACIMED**, Supl. 4, p. 16-18, 2001.

VELHO, E. A ciência e seu público. **Transinformação**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 15-32, 1997.

VANTI, N. A. Da bibliometria à webmotria: uma exploração conceitual dos mecanismos utilizados para medir o registro da informação e a difusão do conhecimento. **Ciências da Informação**, v. 31, n. 2, p. 152-162, 2002.

VANTI, N. A. A cienciometria revisitada à luz da expansão da ciência, da tecnologia e da inovação. **Ponto de Acesso**, v. 5, n. 3, p. 05-31, 2011.

WOS – Web of Science. Clarivate Analytics: E.U.A. Disponível em: <https://www.webofknowledge.com/>. Acesso em: 12 jul. 2020.



Capítulo 22

LEITURA E ANÁLISE CRÍTICA DE ARTIGOS CIENTÍFICOS

CIBELLE KAYENNE MARTINS ROBERTO FORMIGA
FLÁVIO MONTEIRO AYRES

1 INTRODUÇÃO

Com a evolução e a agilidade de informações que temos presenciado nos últimos anos, o tempo tem sido um atributo nobre na vida de qualquer pessoa. Usar o tempo de maneira produtiva está diretamente aplicável na vida do pesquisador e do cientista. Destacamos aqui a importância de ter as ferramentas necessárias para usar o tempo e o conhecimento em favor da leitura de artigos científicos.

A leitura é uma capacidade importante, desenvolvida desde o processo de formação educacional das pessoas. Por meio da leitura, nos tornamos críticos e reflexivos para adotar posicionamentos, tomar decisões sobre a vida e sobre o mundo ao nosso redor. No âmbito da pesquisa científica, estamos cada vez mais em contato com informações, publicações e um volume sempre maior de artigos científicos são publicados por dia nas bases de dados em pesquisa. É humanamente impossível o pesquisador solitário acompanhar a velocidade de tanta informação e, para isso, é necessário saber o que ler, como ler e o que é necessário filtrar e priorizar.

Apesar de ser requerida em todas as etapas da fundamentação científica, a leitura crítica de artigos científicos raramente é objeto específico de ensino formal em sala de aula no ensino superior. Por isso, comumente, o aluno se expõe à leitura no decorrer da formação acadêmica, sendo familiarizado ao acaso com os artigos científicos no percurso de formação. Nas Ciências da Saúde, conteúdos de outros domínios do conhecimento (como a biologia, física e a química) e saberes empíricos são apropriados em uma trama interdisciplinar para a obtenção de recursos inovadores para a saúde. Mesmo havendo um contexto de interdisciplinaridade, o raciocínio que estrutura os estudos científicos na área da saúde se baseia em premissas próprias e que, por consequência, remetem a requisitos específicos de avaliação crítica dos artigos científicos.

Este capítulo tem o objetivo de ajudar profissionais e pesquisadores em Ciências da Saúde que desejam ingressar ou já ingressaram na carreira acadêmica para desmistificar como realizar a leitura crítica de um artigo científico e identificar os pontos mais importante para avaliar a qualidade metodológica do trabalho. Alguns questionamentos, o nosso leitor pode vir a ter ao longo dessa leitura. Portanto, deixaremos aqui algumas perguntas para a reflexão: será que tudo que está publicado em revista é de boa qualidade? Todo artigo científico é válido e deve ser citado na pesquisa ou levantamento bibliográfico? Tenho que ler quantos artigos para demonstrar que tenho conhecimento aprofundado sobre determinado assunto? Um projeto de pesquisa tem um número mínimo de referências que devem ser citadas?

Este capítulo não tem o objetivo de ensinar o passo a passo de como escrever um artigo científico para publicação. Apesar disso, ao aprender a ler artigos científicos, o profissional pode desenvolver sobremaneira a habilidade de como escrever melhor os artigos científicos de sua própria autoria. Convidamos os nossos leitores a ingressar conosco nessa leitura e aprender com as nossas experiências enquanto professores e pesquisadores. O capítulo não tem a

pretensão de esgotar todas as possibilidades de leitura crítica de artigos, mas sim dar um ponto de partida para os jovens pesquisadores que desejam aprender e aprofundar seus conhecimentos na pós-graduação e na carreira acadêmica.

2 TIPOS DE PESQUISA CIENTÍFICA NA ÁREA DA SAÚDE

Na área das Ciências da Saúde, existem diversos tipos de delineamentos de pesquisa e cada tipo atende diferentes propósitos para responder questões dos pesquisadores. O profissional de saúde deve saber identificar os tipos de pesquisa para analisar quais os elementos básicos e necessários para cada tipo de pesquisa na formulação do objetivo e na estruturação dos métodos de pesquisa. De forma geral, podemos dividir as pesquisas na área da saúde em dois grandes grupos: Pesquisas Observacionais e Pesquisas Clínicas ou Experimentais (GREEMHALGH, 2015).

No primeiro grupo, estão todas as pesquisas em que os pesquisadores não interferem na variável pesquisada e apenas observa e registra os fatos e acontecimentos com uma determinada amostra em um período determinado de tempo. São estudos científicos com o objetivo de examinar a distribuição das variáveis preditoras e de desfecho em uma população (descritivo) e caracterizar as associações entre essas variáveis (analítico) (FLETCHER; FLETCHER, 2014; HULLEY *et al.*, 2015).

No segundo grupo, estão todas as pesquisas em que os pesquisadores desenvolvem uma sistemática de organização de variáveis para avaliar o efeito de determinado tratamento ou intervenção no desfecho ou resultado de uma determinada amostra ou grupo de pessoas em um período determinado no tempo.

Cada um dos tipos de pesquisa apresenta vantagens e desvantagens, custos e benefícios e critérios de avaliação diferenciados. O Quadro 1 sintetiza os diferentes tipos de pesquisa e suas características.

Quadro 1 – Tipos de pesquisa em Ciências da Saúde e principais características

Tipo de Pesquisa	Características	Vantagens
Estudos Observacionais		
Transversal ou <i>Cross-sectional</i>	Descrevem variáveis e seus padrões de distribuição. Verificam associações sem estabelecer causa-efeito. Estimam prevalência de uma determinada condição (número de casos em um período de tempo).	São estudos mais rápidos e de baixo custo. Pode ser o primeiro estudo antes de estabelecer um estudo de coorte ou ensaio controlado aleatorizado (ECA). Exemplos: estudos de levantamento populacionais; estudos que examinam associações entre fatores de risco.
Coorte	Estabelecem a sequência temporal das variáveis, fortalecendo a inferência causal. Estimam incidência (número de casos que desenvolve uma condição clínica ao longo do tempo). Devem ter um bom controle do seguimento dos participantes Devem medir as variáveis de desfecho durante o seguimento.	São estudos mais eficientes para desfechos dicotômicos e desfechos contínuos. Exemplos: estudos sobre fatores de risco; estudos de predição de risco para determinados desfechos.

MÉTODOS E TÉCNICAS APLICADOS NA PESQUISA INTERDISCIPLINAR EM SAÚDE

Capítulo 22

LEITURA E ANÁLISE CRÍTICA DE ARTIGOS CIENTÍFICOS

Tipo de Pesquisa	Características	Vantagens
Caso-Control	São estudos que invertem a sequência temporal, pois começam com a seleção dos pacientes com o desfecho. São estudos retrospectivos, pois investigam as variáveis preditoras que podem explicar o desenvolvimento da doença.	São estudos mais simples, mais rápidos e de baixo custo. Possuem eficiência para desfechos raros quando bem delineado. As amostras podem ser pequenas, são úteis para gerar hipóteses. Exemplos: estudos sobre avaliação de determinado desfecho em um grupo de indivíduos saudáveis e infectados por COVID-19.
Ensaios Clínicos		
Ensaio Controlado Aleatorizado (aspectos gerais)	Estudos delineados para testar o efeito e a segurança de uma intervenção em seres humanos. Os sujeitos são distribuídos aleatoriamente nos grupos experimental e controle. Observa-se a relação causal entre a intervenção e um ou mais desfechos clínicos.	São estudos prospectivos, com intervenções previamente planejadas e de execução controlada. Aplicam-se às questões de pesquisa amadurecidas o suficiente para justificar altos gastos, tempo longo, questão restrita e os potenciais risco aos participantes.
Ensaio Controlado Aleatorizado em Paralelo	Delineamento Clássico, constituído pelo grupo sob intervenção comparado com um grupo-controle.	Exemplo: estudo de eficácia e segurança da vacina contra o Corona Vírus, em comparação com um placebo. Também, determinar a dose que maximize a eficácia com o menor risco de efeito adverso.

Tipo de Pesquisa	Características	Vantagens
Ensaio Controlado Aleatorizado de Grupos Cruzados ou <i>Cross-over</i>	Delineamento em que o participante é submetido a duas ou mais intervenções, incluindo uma intervenção considerada controle. As intervenções do grupo experimental e do grupo-controle devem ser reversíveis. O participante é parte tanto do grupo experimental quanto do grupo-controle.	Maior poder estatístico que o ensaio em paralelo. As hipóteses são testadas com menor número de participantes. Exemplo: um grupo de participantes é submetido a sequência de intervenção controle, seguido de <i>washout</i> e intervenção experimental. Concomitantemente, um outro grupo é submetido sequencialmente à intervenção experimental, seguido de <i>washout</i> e intervenção controle.

Fonte: Adaptado de Hulley (2015) e Souza (2009).

3 DEZ PASSOS PARA A LEITURA CRÍTICA DE ARTIGOS CIENTÍFICOS

Para facilitar a leitura e compreensão deste capítulo, organizamos a análise crítica em 10 passos fáceis e práticos para um pesquisador iniciante na vida acadêmica ou que deseja aperfeiçoar a sua capacidade de leitura crítica de artigos científico.

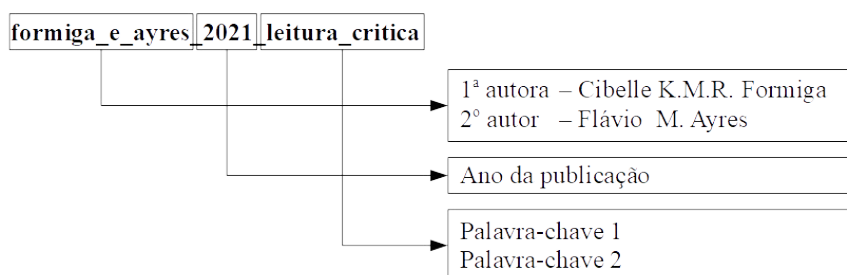
PASSO 1

Organize os artigos em PDF em pastas digitais

A leitura de artigos científicos com a finalidade de compor um levantamento bibliográfico traz a implícita necessidade de se implantar um portfólio bibliográfico. A forma como essa implementação ocorre depende das preferências do leitor ou da equipe que usa o portfólio (FERENHOF, 2016).

Os arquivos podem ser organizados em uma pasta do computador, cujos nomes são sistematizados (Figura 1). Isso permite a ordenação dos arquivos por ordem alfabética e cronológica, bem como a busca de arquivos por palavras-chave. Os portfólios podem ser convenientemente distribuídos em pastas separadas por disciplinas, cursos, manuscritos, produtos finais de curso (TCC, dissertação e tese), temas e outros. Acervos com grande volume de portfólios e arquivos podem ser previamente catalogados em planilhas eletrônicas, inclusive para a devida distinção das referências bibliográficas e demais referências nos formatos de áudio, imagens e vídeo.

Figura 1 – Exemplo de nome sistematizado para referência com dois autores



Fonte: Próprios autores (2021).

Pastas digitais bem organizadas cumprem a função da biblioteca física que encontramos nas nossas casas ou ambientes profissionais. Há, adicionalmente, a vantagem de arrastar as pastas digitais com o cursor do *mouse* para plataformas de computação em nuvem. Esse recurso nos permite acessar os portfólios em dispositivos variados (celular, computador, tablet e outros), de forma remota e ainda compartilhá-los de forma seletiva com outras pessoas. Os serviços nuvem foram inicialmente oferecidos por empresas como a Amazon, Oracle, Google, IBM e Microsoft, atingindo uma enorme diversidade de plataformas hoje em dia.

Alternativamente, *softwares* organizadores de bibliografia podem ser utilizados, como: EndNote®, BookEnds®, Mendeley® e Zotero®. Esses *softwares* agilizam de forma automatizada a citação das referências bibliográficas, além do arquivamento, buscas, filtros e contagens (FERENHOF, 2016).

PASSO 2

Faça marcações e anotações no texto

No artigo impresso ou na tela de um dispositivo digital, as reações ao artigo devem ser registradas sob forma de marcações e anotações (Quadro 2). A palavra **reação** foi escolhida propositalmente aqui, pois representa o vínculo emocional criado entre o leitor e o artigo consumido. Ao argumentar, o leitor enfatiza algo em que acredita e, portando, fixado na memória. Essa estratégia auxilia a recuperação de raciocínios quando o artigo for relido com mais maturidade e clareza do conteúdo. Veja bem: um texto desinteressante e sem qualquer novidade é facilmente lido sem que se faça comentário algum. A ausência de reação durante a leitura é o prenúncio de um artigo que não será consumido novamente (FORTES, 2020).

As marcações podem indicar conteúdos desconhecidos para posterior pesquisa ou mesmo trechos que são particularmente interessantes para extração de dados. Por outro lado, as anotações no decorrer da leitura descrevem conteúdos verbais formulados a partir do artigo. As reações podem variar conforme o propósito da leitura. Quando se trata de um artigo sobre temáticas ainda desconhecidas, as reações são mais extensas e volumosas, ao contrário de temáticas já exaustivamente lidas.

Quadro 2 – Como reagir de forma crítica ao artigo científico

Motivos para reagir	O que marcar ou anotar
1. Questionar	– Qual é a mensagem repassada pelos autores? – Qual o propósito dessa mensagem? – As evidências levantadas no artigo suportam a conclusão? – Como aplicar as conclusões do artigo no seu próprio trabalho?
2. Facilitar a compreensão	– Rascunho de esquemas e conferência de cálculos – Explicações do conteúdo com as próprias palavras – Ligar dados que evidenciam correlação entre resultados – Ressaltar informações para aproveitar depois – Documentar o que deve ser compreendido rapidamente na releitura do artigo
3. Destacar	– Ideia central do artigo – Raciocínios inovadores – Definições e significados importantes – Exemplos esclarecedores – Citações interessantes para leitura – Informações que complementam outras referências – Informações a serem pesquisadas
4. Criticar	– Afirmações duvidosas – Aspectos de objeção – Uso indevido de citações
5. Extrapolar ideias	– Aplicação as informações do artigo a outros exemplos – Identificação de outros exemplos que se encaixam no contexto do artigo – Pontos de adesão entre o artigo e seus conhecimentos prévios
6. Resumir	– Pontos principais – Itens para fichamento – O que foi feito, como foi feito, por que foi feito e o que encontraram?

Fonte: Adaptado de Fortes (2020)

PASSO 3**Procure o significado de conteúdo ou expressões desconhecidas**

Dentre as razões para valorizar a leitura de artigos científicos, podemos citar a atualização do conhecimento, obtenção de informações confiáveis e fonte de ideias para novas pesquisas. Ler artigos, entretanto, não faz sentido sem a compreensão correta do texto. Por isso, o passo 2 sobre marcar e anotar no texto ressalta que devemos destacar as informações a serem pesquisadas. Após tirar todas as dúvidas destacadas no artigo, o texto deve ser relido até se confiar que o texto foi compreendido corretamente (FORTES, 2020).

Mesmo pesquisadores experientes se deparam com definições novas e que, por vezes, são de difícil compreensão, por representarem raciocínios complexos. As dúvidas também podem surgir quando o texto menciona localidades, nomes comerciais, produtos químicos, siglas e uma infindável gama de outros termos. A descoberta do significado de conteúdos e expressões ainda desconhecidos nem sempre consiste em consultar o dicionário ou um sítio eletrônico. Muitas vezes, a leitura de outros artigos e capítulos de livros é necessária. Quando não raro, nós temos que recorrer aos autores do artigo para obter esclarecimentos mais precisos. O contato direto com autores para tirar dúvidas só é adequado quando essa for a única forma de se obter a informação e deve ser feito com muito bom senso.

Relato: JAM test é um método quantitativo de detecção de apoptose e que envolve o uso do análogo radiativo da base nitrogenada timina. A definição do termo JAM não foi descrita pelos criadores do método, que ao serem perguntados pessoalmente sobre isso, responderam: JAM não corresponde a uma abreviatura propriamente dita, mas a “*Just Another Method*”. Essa explicação só foi obtida pelo contato direto com os autores do artigo e, provavelmente, jamais foi descrita na literatura científica.

Se tratando de termos técnicos em outros idiomas, geralmente o inglês, o ideal é consultar a definição no idioma original. Para isso, diversos dicionários técnicos e glossários estão disponíveis on-line. Adicionalmente, os falsos cognatos podem nos levar a uma compreensão errônea do texto. Em inglês, por exemplo, *pattern* significa padrão e não paterno, o que leva o leitor a traduzir o texto de forma tão truncada que uma única palavra torna improvável a compreensão correta do artigo.

Um cuidado especial deve ser tomado ao interpretar figuras e tabelas, pois esses elementos diagramados destacam as informações que os autores consideram mais relevantes para transmitir ao leitor. Nesse caso, as dúvidas marcadas no artigo podem dizer respeito a elementos gráficos e representações que exigem leitura detalhada sobre o assunto. Tanto no corpo do texto quanto nos elementos diagramados, a elucidação de termos desconhecidos leva à citação correta dos dados do artigo, além de evitar constrangimentos em apresentação pública de seminários ou em eventos científicos.

PASSO 4

Verifique a coerência entre título-objetivo-conclusão

Após a busca bibliográfica e a organização dos artigos para leitura em pastas, o pesquisador passa para uma análise mais técnica dos artigos científicos. Essa análise inclui um maior senso crítico para verificar se os autores do texto realmente responderam às perguntas ou questões de pesquisa que os levaram a escrever aquele trabalho.

Um elemento essencial para o profissional que está realizando a análise crítica é verificar a coerência entre o título, objetivo e a conclusão do artigo. Se o título promete muito, é necessário ler o objetivo e a conclusão para saber se o objetivo foi respondido ou se é apenas um título chamativo para fins de publicação (VOLPATO; BARRETO, 2014).

PASSO 5**Extraia os dados mais importantes – a importância do fichamento**

Extraair os dados mais importantes do artigo é uma tarefa trabalhosa, porém, necessária. Alguns profissionais podem afirmar que o fichamento é algo superado e que atualmente não se faz esse tipo de prática. De certa forma, o fichamento como era realizando há 30 anos não é mais usado do ponto de vista de praticidade e economia de tempo. Os pesquisadores usavam fichas compradas em papelaria para fichar manualmente cada artigo científico ou realizaram essa tarefa construindo fichas próprias em seus cadernos e anotações. Contudo, com o advento da informática e dos recursos de programas de computadores, ficou mais fácil fazer o fichamento de artigos usando recursos do Word, planilhas de Excel ou de programas de computador específicos para armazenamento de um grande volume de dados.

É importante ressaltar, aqui, que o fichamento é essencial para os pesquisadores que desejam realizar estudos de revisão bibliográfica da literatura, pois auxilia a extração dos dados dos artigos que serão trabalhados e discutidos na pesquisa. A seguir (Quadro 3), daremos um modelo clássico de como fazer um fichamento de artigo usando o recurso do Word.

Quadro 3 – Modelo básico de como realizar o fichamento para extração de dados dos artigos

Nº do Artigo	Colocar o código ou número do artigo
Referência completa do artigo	Colocar a referência completa e pode ser usado algum programa computacional para auxiliar (ex: Mendeley ou Endnote)
País de origem da pesquisa	Importante para realizar comparações entre pesquisas

Nº do Artigo	Colocar o código ou número do artigo
Objetivo do estudo	Transcrever o objetivo conforme descrito no artigo
Tipo de estudo	Descrever (Verificar o Quadro 1)
Descrição da amostra estudada	Descrever conforme o artigo
Instrumentos usados para coleta de dados	Colocar os testes, experimentos e medições realizadas
Principais resultados encontrados	Colocar em tópicos os resultados (valores e dados)
Conclusão do artigo	Sintetizar a conclusão principal do artigo
Pontos metodológicos fortes do artigo	Citar os itens que valorizam o artigo
Pontos metodológicos fracos do artigo	Citar as limitações que enfraquecem o artigo

Fonte: Próprios autores (2021).

PASSO 6

Resumos não devem ser usados para interpretação dos resultados

Pela experiência como docentes em cursos de graduação e pós-graduação na Universidade, percebemos que é muito comum entre os estudantes realizarem a busca bibliográfica e interpretação de artigos a partir de resumos que são reportados pelos autores. É importante destacar, aqui, que cada revista científica possui regras próprias para a redação do resumo. Portanto, o autor deve se adequar as normas daquela revista. Nem sempre é possível informar todos os resultados de uma pesquisa em um resumo de um artigo científico pela quantidade de palavras necessárias para a construção. Independentemente do fato de o resumo ser estruturado ou não estruturado, com 250, 300 ou 500 palavras, ele não deve ser usado como fonte para a interpretação dos resultados daquela pesquisa.

Nesse sentido, é necessário que o pesquisador faça o *download* do artigo completo e realize toda a leitura do artigo para captar de forma adequada a mensagem trazida pela pesquisa apresentada.

PASSO 7

A introdução não representa os achados (cuidado com citações indevidas)

A introdução é um texto retrospectivo, escrito em forma de “cone invertido”. Em outras palavras, a introdução tem abordagem do conteúdo mais amplo para o conteúdo mais específico, sendo esse conteúdo obtido de obras consultadas pelos autores do artigo. Entende-se, dessa forma, que, ao ler um artigo científico, a introdução reflete uma produção intelectual alheia (AQUINO, 2010).

Para deixar essa situação mais contextualizada, considere, hipoteticamente, que os atores Formiga & Ayres escreveram um artigo e a introdução desse artigo cita as três Leis de Newton descritas por Isaac Newton no livro *Philosophiae Naturalis Principia Mathematica* (1687). A citação indevida nesse contexto seria usar Formiga & Ayres como referência para as três leis de Newton.

Se a introdução do artigo citar dados relevantes e de acesso restrito, então, se pode fazer a citação da citação. Esse é um recurso considerado pouco elegante e que deve ser evitado ao máximo, por denunciar uma possível falta de esforço para consultar a referência principal. A citação de citação é composta, por exemplo, assim: {Conforme o “Nome_do_Autor_1” (1917) *apud* “Nome_do_Autor_2 (2020), ...}, que significa o aproveitamento da citação do Autor 1 em um artigo do Autor 2. A referência do Autor 1 é citada no rodapé da página, enquanto o Autor 2 é listado entre as referências ao final do texto (AQUINO, 2010).

Ao citar um artigo científico, faça-o para os achados descritos nos resultados ou para interpretações inovadoras dos resultados, mesmo que descritas na discussão. Em casos específicos, podem-se citar,

também, inovações e modificações em procedimentos descritos nos “Materiais e Métodos”. Dessa forma, os dados mais interessantes estão centrados nos métodos e resultados (SOUZA; COTA, 2016).

PASSO 8

Leia sempre o artigo completo

A leitura do artigo científico tem início pelo título e, em seguida, pelo resumo. Com essas informações preliminares, o leitor tem noção de “o que o autor fez” e se a continuidade da leitura será útil ou não. Como em um fluxograma, o indicativo de que a leitura será útil leva o leitor a ler todo o artigo. Caso o título e o resumo indiquem que o artigo não será útil, o artigo pode ser arquivado para uma posterior reavaliação ou descartado definitivamente (FORTES, 2020).

O que se espera de um artigo bem escrito é que, ao ler o resumo, se tenha como bônus um artigo completo com igual teor de conteúdo e qualidade, ou seja, que, ao avaliar o resumo, tenha-se avaliado uma miniatura de todo o artigo. Entretanto, essa avaliação é apenas preliminar e, lamentavelmente, não assegura que o artigo vai corresponder às expectativas criadas até aqui. Uma vez lida a introdução, a leitura crítica do artigo permite avaliar parcialmente a coerência interna do TRIO – Título, Resumo, Introdução e Objetivo. Na etapa seguinte da leitura, os Materiais e Métodos, Resultados e Discussão são lidos em nível de detalhamento e de profundidade inacessíveis pela leitura apenas do resumo (AQUINO, 2010).

Atente-se para o fato de um espantoso número de artigos apresentar discrepância entre o resumo e os resultados descritos no texto completo. Por esse motivo, apenas use um artigo como referência bibliográfica após ler o texto na íntegra e jamais pela leitura do resumo.

PASSO 9**Avalie pontos críticos: tipo de estudo e tríade objetivo-método-desfecho**

Diversos pesquisadores da área de saúde, especialmente aqueles com experiência na pesquisa e Prática Baseada em Evidências (PBE), costumam dizer que a parte principal de um artigo científico são os tópicos da metodologia e resultados. Obviamente, essa é a parte mais autoral de qualquer pesquisa científica, pois a introdução é apenas um texto de abertura do que o autor pretende abordar no trabalho, a discussão é a conversa do autor com a própria literatura. Portanto, a parte mais instigante é a descrição detalhada de toda a pesquisa e os resultados encontrados, especialmente a interpretação dos gráficos e tabelas.

Muitos profissionais e pesquisadores erram muito em ler apenas a introdução e discussão dos artigos, pois cada autor escreve e defende aquilo que mais convém para a sua área e para atender também os requisitos daquela revista científica ou daqueles avaliadores que examinam e opinaram para a apreciação ou aprovação daquele artigo. Agora, a leitura e a interpretação da metodologia e dos resultados são puramente do leitor. Portanto, o leitor é responsável por fazer entender os resultados e verificar se realmente aquelas informações fazem sentido naquela área ou temática da pesquisa (PEREIRA, 2014)

Se um artigo científico informa que o objetivo do estudo é descrever, o leitor já vai compreender que o tipo de estudo é descritivo e provavelmente observacional ou relato de caso. Se o artigo informa no objetivo que avaliou a eficácia de determinado medicamento em uma doença específica, a metodologia mais adequada para esse objetivo é um ensaio controlado aleatorizado ou o popularmente conhecido “ensaio clínico”. Portanto, avaliar a coerência entre o objetivo, tipo de estudo e resultado encontrado é função do leitor. Se o artigo não possui coerência entre esses três pontos críticos, é alta a probabilidade de o artigo possuir qualidade duvidosa ou baixa qualidade científica (VOLPATO, 2013).

PASSO 10

Considerar critérios ou *checklist* de avaliação de qualidade metodológica

Para avaliar a qualidade metodológica dos artigos, é necessário compreender os tipos de estudos e as características de cada tipo para verificar se o artigo que está sendo estudado atende os critérios essenciais de qualidade de acordo com o método científico. Na literatura, existem diversos *checklists* usados para diferentes propósitos. Podemos citar a escala *Physiotherapy Evidence Database* (PEDro) para análise de ensaios clínicos (SHIWA *et al.*, 2011) e a escala *Assessment of Multiple Systematic Reviews* (AMSTAR) para avaliar a qualidade de estudos de revisão sistemática da literatura (COSTA *et al.*, 2015). O importante é o pesquisador adotar um critério aceito pela comunidade científica ou que possua coerência e compromissos com o rigor científico.

A seguir, apresentamos um *checklist* elaborado para guiar o profissional iniciante na leitura crítica de artigos científicos (Quadro 4). O *checklist* é formado por 20 itens e para cada item é atribuída uma pontuação de 0,5 pontos. Ao final, o artigo recebe uma nota de avaliação ou *escore*, que é analisado da seguinte forma: Alta qualidade (9 a 10 pontos); Média qualidade (7 a 8 pontos); Baixa qualidade (≤ 6 pontos). É importante ressaltar que o *checklist* é melhor aplicado para artigos oriundos de estudos observacionais.

Quadro 4 – Checklist de avaliação crítica de artigos em saúde

Nº	Item do artigo	Descrição do item	SIM	NÃO	NA
1	Título	É informativo, atrativo, objetivo e reflete o conteúdo do estudo			
2	Resumo	Contém todos os elementos (objetivo, tipo de estudo, descrição dos métodos básicos, principais resultados e conclusão)			
3	Introdução	Apresenta de forma clara, do geral para o específico, a justificativa do estudo, o que é conhecido e na literatura, a lacuna existente, a hipótese e o objetivo do estudo.			
4	Material e Métodos	Descreve adequadamente as condições e os procedimentos da pesquisa, de forma a garantir a reprodutibilidade do estudo			
5	População e Amostra	Descreve população alvo, local de alocação, características de seleção da amostra (critérios de inclusão e exclusão) e processo de alocação.			
6	Cálculo da Amostra	Descreve o cálculo para a obtenção e qual o N da amostra incluída na pesquisa. Apresenta perdas amostrais do recrutamento inicial.			
7	Aspectos Éticos	Descreve os aspectos éticos da pesquisa e cita a aprovação em algum tipo de comitê de ética			

Capítulo 22

LEITURA E ANÁLISE CRÍTICA DE ARTIGOS CIENTÍFICOS

Nº	Item do artigo	Descrição do item	SIM	NÃO	NA
8	Tipo de Estudo	Descreve claramente o tipo de estudo adotado na pesquisa. O tipo de estudo é coerente com o objetivo proposto do artigo			
9	Instrumentos da Pesquisa	Descreve os instrumentos de coleta dos dados da pesquisa (índices, questionários, testes, exames etc.) e os parâmetros de avaliação usados			
10	Treinamento e Calibração de Avaliadores	Descreve o nível de confiabilidade dos examinadores da equipe de pesquisa, calibração de avaliadores ou de aparelhos, instrumentos, testes de confiabilidade etc. Existe cegamento dos avaliadores para intervenções.			
11	Análise Estatística	Descreve de maneira clara os testes estatísticos usados no tratamento dos dados, indicando quais variáveis serão usadas nas análises e desfechos			
12	Resultados	Descreve os resultados de acordo o objetivo proposto no início do artigo e possui coerência com a sequência dos métodos usados			
13	Tabelas e Figuras	As tabelas e/ou figuras descrevem e sintetizam de maneira adequada os resultados, são autoexplicativas e organizadas			
14	Discussão	Realça os achados importantes do estudo e confronta com os achados de outros artigos anteriores descrevendo os mecanismos clínicos envolvidos			

Nº	Item do artigo	Descrição do item	SIM	NÃO	NA
15	Limitações do Estudo	Descreve as principais limitações do estudo e/ou possíveis lacunas que não foram possíveis de serem respondidas na pesquisa			
16	Pontos Fortes do Estudo	Descreve os pontos fortes do estudo e a possível aplicabilidade para a área de interesse. O estudo fornece alguma novidade ou conhecimento novo			
17	Validade Interna e Externa do Estudo	O estudo possui coerência entre objetivo-método-resultados alcançados e está adequado à amostra pesquisada e/ou outros grupos amostrais. O estudo possui implicações para a prática de profissionais/pesquisadores			
18	Conclusões	Responde de forma clara e resumida o objetivo do estudo e a expectativa apontada na introdução do artigo			
19	Referências	As referências são atualizadas e coerentes com o tema abordado na pesquisa e estão listadas de forma adequada			
20	Ausência de Conflito de Interesse	Os autores do trabalho citam claramente a ausência de conflito de interesse com a pesquisa realizada.			
	TOTAL	(Para cada item SIM ou NA atribuir nota 0,5)			

Nota: Ranking da Qualidade do Artigo: 9 a 10 (Alta), 7 a 8 (Média), ≤ 6 (Baixa).

Fonte: Próprios autores (2021).

Para melhor direcionar o leitor, o Quadro 5 sumariza os 10 passos para a leitura crítica de artigos científicos.

Quadro 5 – Lembrete com a síntese dos principais itens para a leitura crítica de artigos científicos

Nº	Item a considerar na leitura crítica de artigos científicos
1	Organize os artigos em PDF em uma pasta digital
2	Faça marcações e anotações no texto
3	Procure o significado de conteúdo e expressões desconhecidas
4	Verifique a coerência entre título – objetivo – conclusão
5	Extraia os dados mais importantes do artigo – aprenda a fazer o fichamento
6	Resumos não devem ser usados para interpretação dos resultados
7	A introdução dos artigos não representa os achados da pesquisa
8	Leia sempre o artigo completo
9	Avalie pontos críticos do artigo: tipo de estudo e tríade objetivo – método – desfecho
10	Considerar critérios ou checklist de avaliação de qualidade metodológica

Fonte: Próprios autores (2021).

4 APLICAÇÕES PRÁTICAS DA ANÁLISE CRÍTICA DE ARTIGOS CIENTÍFICOS

A compreensão da importância e dos principais elementos necessários para a análise crítica de artigos científicos possui algumas aplicações práticas para os profissionais que desejam ingressar e se manter na vida acadêmica. Destacamos, na Figura 2, algumas aplicações práticas.

Figura 2 – Aplicações práticas da análise crítica de artigos científicos

Redação	Consultoria	Tomada de Decisão
Auxilia a redação de artigos científicos	Auxilia a emissão de parecer <i>ad hoc</i>	Auxilia a tomada de decisão clínica sobre tratamento
Auxilia a elaboração de projetos de pesquisa	Auxilia a avaliação de artigos de revistas	Auxilia a avaliação da qualidade de estudos novos

Fonte: Próprios autores (2021).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A leitura crítica de artigos científicos é um processo construído ao longo da vida acadêmica e um árduo desafio para o aluno da pós-graduação. Nesse contexto, abreviar a familiarização com a leitura realmente produtiva é uma das formas de aproximar o pesquisador com o objeto de estudo que lhe é essencial: a literatura científica. Neste caso, os artigos científicos foram o foco da abordagem deste capítulo, mas o conjunto de informações aqui expostas podem facilmente ser extrapoladas para outros gêneros da literatura científica.

O aguçamento da criticidade do leitor é requisito para a formação de pesquisadores perspicazes e capazes de delimitar problemáticas com o pragmatismo necessário para a produção científica qualificada. Nessa esteira, o leitor tem que ser capaz de triar pelo título, e depois pelos resumos, os artigos científicos de interesse. Sequencialmente, forma-se um portfólio bibliográfico com fichamentos e registros analíticos quanto à coerência interna entre os tópicos do artigo. Por fim, resta ao pesquisador o refinamento individual enquanto responsável pela avaliação da própria produção científica, dos pares e aplicação desse conhecimento na rotina de comunicação e divulgação científica.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, I. S. **Como escrever artigos científicos**. 7. ed. São Paulo: Saraiva, 2010.
- COSTA, A. B.; ZOLTOWSKI, A. P. C.; KOLLER, S. H.; TEIXEIRA, M. A. P. Construção de uma escala para avaliar a qualidade metodológica de revisões sistemáticas. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 20, n. 8, p. 2441-2452, 2015.
- FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W. **Epidemiologia Clínica. Elementos essenciais**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2014.
- FERENHOF, H. A.; Fernandes, R. F. Desmistificando a revisão de literatura como base para redação científica: método SSF. **Revista ACB: Biblioteconomia em Santa Catarina**, n. 21, p. 550-563, 2016.
- FORTES, R. P. M. **Leitura Eficiente de Artigos Científicos**, 2020. Disponível em: <https://sites.icmc.usp.br/renata/Leitura4.PDF>. Acesso em: 25 nov. 2020.
- FORMIGA, C. K. M. R.; AYRES, F. M. **Checklist de Avaliação Crítica de Artigos em Saúde**. Material da Disciplina Metodologia de Pesquisa: Avaliação Crítica de Delineamentos de Pesquisa em Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde, Universidade Estadual de Goiás, 2020.
- GREEMHALGH, T. **Como ler artigos científicos**. Fundamentos da medicina baseada em evidências. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2015.
- HULLEY, S. B.; CUMMINGS, S. R.; BROWNER, W. S.; GRADY, D. G.; NEWMAN, T. B. **Delineando a pesquisa clínica**. Uma abordagem epidemiológica. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2015.
- PEREIRA, M. G. **Artigos Científicos: como redigir, publicar e avaliar**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- SHIWA, S. R.; COSTA, L. O. P.; MOSER, A. D. L.; AGUIAR, I. C.; OLIVEIRA, L. V. F. PEDro: a base de dados de evidências em fisioterapia. **Fisioterapia em Movimento**, v. 24, n. 3, p. 523-533, 2011.
- SOUZA, M. R.; COTA, G. F. Como interpretar um artigo científico? **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 26, e-1781, 2016.
- SOUZA, R. F. O que é um estudo clínico randomizado? **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 42, n. 1, p.3-8, 2009.
- VOLPATO, G. **Ciência: da filosofia à publicação**. 6. ed. Botucatu: Best Writing, 2013.
- VOLPATO, G.; BARRETO, R. E. **Elabore projetos científicos competitivos: biológicas, exatas e humanas**. Botucatu: Best Writing, 2014.



Capítulo 23

A ARTE CIENTÍFICA NA PRODUÇÃO ACADÊMICA

ANDREIA JULIANA RODRIGUES CALDEIRA
FRANCISCO JÚNIOR SIMÕES CALAÇA
FLÁVIO MONTEIRO AYRES

1 INTRODUÇÃO

A arte científica é uma importante forma de apresentação e tratamento da informação científica, incluindo: fotografia, desenho, gráficos, animação, vídeo e outros. O recurso da ilustração é utilizado como forma de facilitar a compreensão do leitor sobre o que foi descrito sob forma de texto escrito. A representação do conhecimento é uma abordagem inter e multidisciplinar que permite, também, a documentação visual de dados para posterior reconhecimento comparativo imediato quando consultado. O presente capítulo visa apresentar ao leitor a importância de se formularem ilustrações científicas de boa qualidade, bem como as estratégias, materiais e métodos para tal fim.

2 O QUE É A ARTE CIENTÍFICA?

A **arte científica** (AC) é um recurso artístico e científico, amplamente usado em todas as categorias de **difusão científica**, quer seja por meio da **disseminação científica**, que representa a comunicação entre especialistas, via periódicos especializados, ou

ainda através da **divulgação científica**, que transforma o discurso científico em uma linguagem “palatável” para a sociedade (BUENO, 1984; JUCAN; JUCAN, 2014; MACÍAS-CHAPULA, 2012). Desse modo, o presente capítulo discorrerá sobre a AC em disseminação científica, que é um conjunto de técnicas utilizadas para ilustrar, representar, sintetizar ou apresentar informações de cunho científico (CORREIA, 2012)

AC deve ser vista como uma unidade do conhecimento com bases tanto na **arte**, quanto nas **ciências naturais**. Embora haja discussão se a união de **arte** e **ciência** deve ser considerada estritamente como “**arte**” ou “**ciência**”, é impossível dissociar uma da outra, de forma que, neste capítulo, AC será considerada uma ferramenta científica, com profunda dependência das artes plásticas (MOURA; SILVA; SANTOS, 2016). A integração das diversas possibilidades artísticas, como, por exemplo, a ilustração, usada em trabalhos acadêmicos ou de **disseminação científica**, facilita a compreensão do tema abordado e deixa o texto mais atrativo e didático. Como definido por Correia (2012), a ilustração científica, termo aqui substituído por **AC**, “é um domínio gráfico que trabalha em um campo de intervenção vasto, diversificado e motivador, que concilia a **ciência** e a **arte** num único modelo de comunicação”. A comunicação visual pode, portanto, assumir independência do texto principal, sem perder a conexão, uma vez que uma arte de cunho científico pode conter riquezas de detalhes que, se fossem transcritos, poderiam estender muito o texto, deixando a leitura e a compreensão comprometidos. Por conseguinte, é de extrema importância a adoção do uso de **elementos diagramados** na elaboração de trabalhos que visem à disseminação científica.

3 ARTE CIENTÍFICA SOB FORMA DE ELEMENTOS DIAGRAMADOS

A seção de resultados expõe os dados de uma pesquisa sob forma de **textos escritos**, apoiados por **linguagens não verbais**. No

presente capítulo, o termo **textos escritos** será representado pela palavra **texto**, enquanto **elementos diagramados** designará o conjunto diverso e heterogêneo de linguagens não verbais, tais como: desenho, diagrama, esquema, E-vídeo, figura, fluxograma, fotografia, gráfico, gravura, ilustração, imagem, imagem com movimento, imagem de satélite, mapa, organograma, planta, quadro, questionário, radiografia, retrato, tabela, vídeo, dentre outros. O **texto** e a **diagramação** devem ser complementares entre si, além de serem autoexplicativos. Enquanto o **elemento diagramado** se destina à comunicação não verbal de um conjunto completo de informações, de modo a facilitar a compreensão de evidências científicas obtidas mediante sistemática coleta e análise de dados para testar uma mesma hipótese, o **texto** se destina à discussão dessas informações e ao detalhamento dos materiais e métodos.

O uso de AC em textos acadêmicos (*e.g.* trabalhos de conclusão de curso, dissertações, teses, artigos científicos) é um suporte à informação. Os elementos diagramados podem ser combinados para compor uma arte ou utilizados de forma separada, de acordo com a necessidade ou para atendimento de normas específicas, para determinado texto acadêmico. Dentre os elementos diagramados, a) as fotografias devem ser utilizadas para mostrar a realidade, ou seja, “a verdade”; b) as ilustrações gráficas, para interpretar ou construir representações da verdade, destacar resultados mais relevantes e resumir relações complexas; e c) a conversão de dados numéricos em gráficos, para facilitar o entendimento de tabulações muito extensas, por exemplo.

Deve-se, ainda, levar em consideração que a leitura em dispositivos eletrônicos é crescente e que a necessidade de alternar entre janelas de figuras ampliadas e textos é uma tarefa, por vezes, desgastante. Por mais esse motivo, os elementos diagramados devem ser legíveis na tela de dispositivos e entendidos sem a necessidade de consultar o texto alternadamente. Por outro lado, se o texto e a diagramação se repetem, o manuscrito se torna redundante. Um

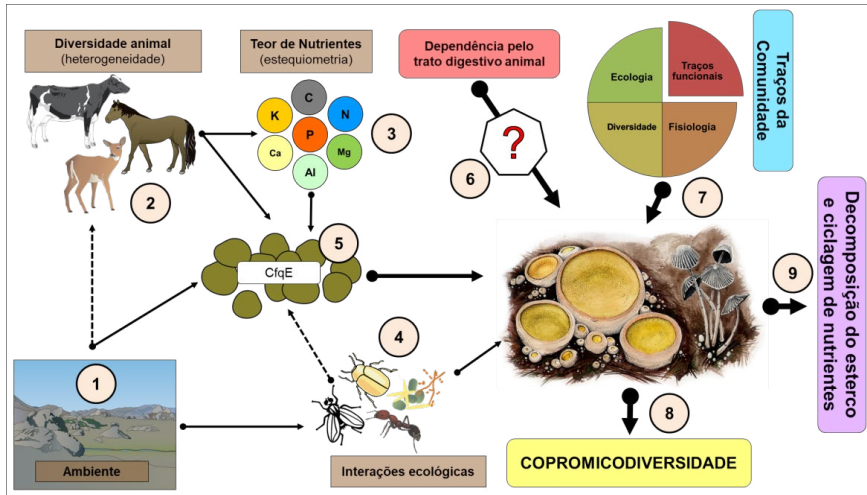
importante aspecto adicional é que os elementos diagramados devem ser simples, mesmo que tenham que ser fragmentados para isso. O desejável é que os elementos diagramados sintetizem igual ou maior teor de informações que longos e cansativos parágrafos.

4 TIPOS DE ELEMENTOS DIAGRAMADOS

Esquemas: são aqueles que combinam, obrigatoriamente, pelo menos uma técnica artística e um tipo de grafia (texto) (Figura 1). Como o termo **esquema** possui vários significados, dependendo da disciplina em que é aplicado, na AC, será designado como uma representação gráfica, que utiliza uma técnica artística, como, por exemplo, o desenho, mais o texto para representar um processo biológico, físico ou químico, uma ideia abstrata ou etapas do desenvolvimento de um projeto qualquer. Na psicologia, são utilizados como forma de organização do pensamento e representação de ideias, principalmente no campo da cognição, na chamada psicologia cognitiva (DRIVER, 1986). No entanto, a aplicação de esquemas é comumente usada nas mais diversas áreas do conhecimento, principalmente nas seções de “Material e Métodos” ou “Resultados”, geralmente, com a função de sintetizar uma informação, tornando-a mais simples e compreensível.

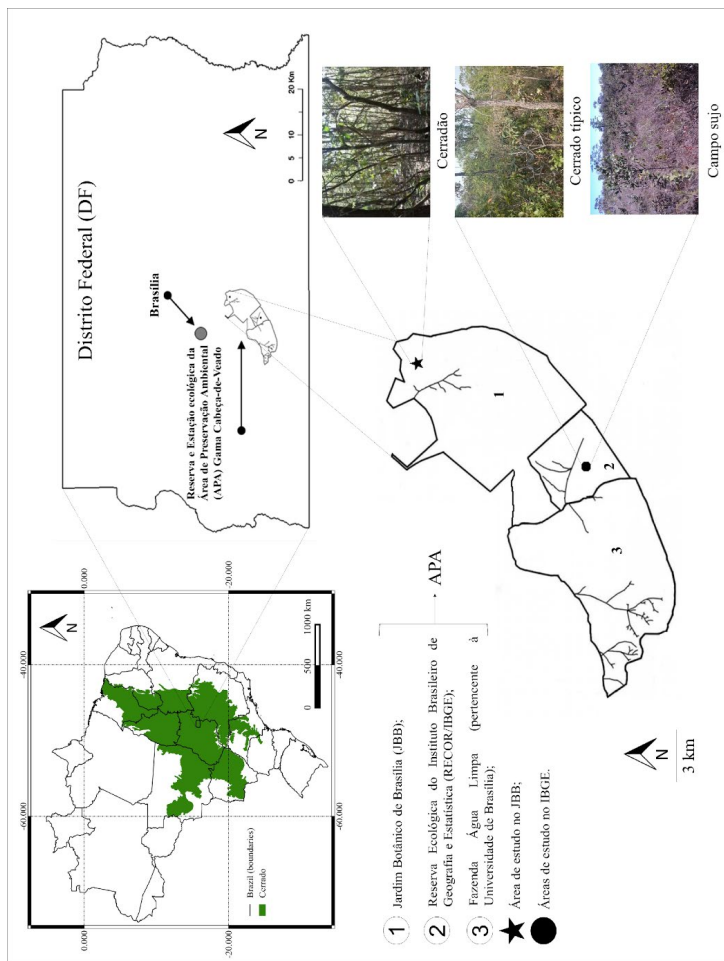
Figuras: são todo tipo de imagem produzida por utilização de técnicas de ilustração (e.g. ilustração digital, a mão livre, vetorial) após a digitalização, fotografia ou produzidas por algum instrumento, como microfotografias geradas por microscópios eletrônicos (Figura 2). Como um elemento diagramado extremamente versátil, podem ser utilizadas em conjunto com outras técnicas na produção de praticamente qualquer outro elemento, como os esquemas, gráficos, vídeos e outros. Vale ressaltar que figuras são imagens digitalizadas, desse modo, artes científicas ainda no estado físico, *i.e.*, no papel, enquadram-se como ilustração.

Figura 1 – Exemplo de um esquema apresentando a relação de um grupo de fungos com o ambiente e hospedeiros



Fonte: Calaça *et al.* (2017).

Figura 2 – O mapa de localização de uma área de estudo qualquer é um exemplo simples de utilização do elemento diagramado caracterizado como Figura. Perceba as várias possibilidades de composição, o que torna o trabalho de informar mais simples e intuitivo



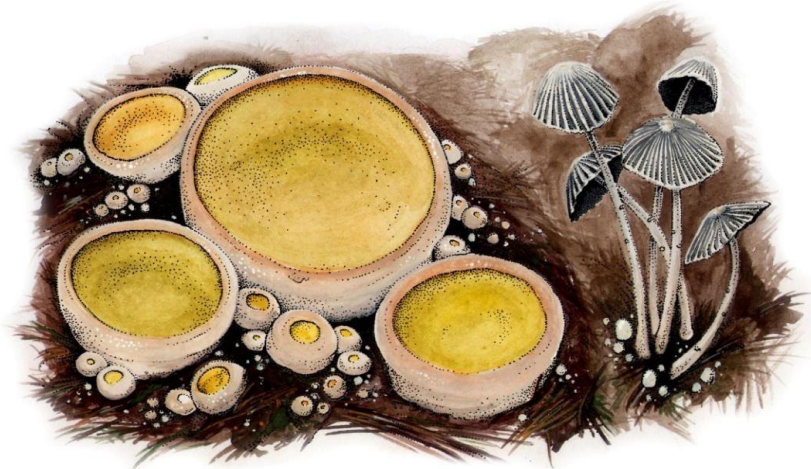
Fonte: Calaça (2018).

Gráficos: segundo Jensen e Anderson (1990), gráficos são formas de representação visual de dados e valores numéricos. Devido a essa característica, os gráficos são elementos diagramados muito comuns em textos acadêmicos, principalmente aqueles que tratam de dados e valores estatísticos. Em artigos científicos, estes elementos diagramados possuem exigências específicas, dependendo do periódico que se objetiva. Inclusive, alguns periódicos determinam gráficos como um tipo de figura, o que é basicamente uma variação do entendimento de um e outro elemento diagramado. No entanto, devido às peculiaridades e características de representar em imagem dados numéricos, é preferível definir gráfico como um elemento à parte de figura.

Ilustrações: são todas as representações visuais que objetivam explicar, representar ou destacar uma informação utilizando diferentes técnicas, tanto clássicas, como a ilustração científica tradicional, que utiliza o papel, grafite e/ou tinta nanquim, como técnicas mais avançadas, como a ilustração digital e, mesmo a fotografia (Figura 3). Dentro desse contexto, a ilustração científica, merece papel de destaque pois é, sem dúvidas, a mais antiga forma de ilustração e que passou por mais alterações ao longo do tempo. A representação do mundo por meio de ilustrações (ou desenhos), remota aos humanos primitivos, por meio das conhecidas pinturas rupestres (SANTOS-SILVA, 2015). Antes da era da informática, o uso da ilustração científica foi vital para ilustrar os trabalhos desenvolvidos, como aqueles observados em estudos antigos e pioneiros, principalmente os de enfoque taxonômico ou da área médica, como os estudos anatômicos de Leonardo da Vinci, primorosamente desenhados à mão e que sobrevivem até hoje em seus cadernos (ISAACSON, 2018). Um material interessante que apresenta a descrição de diversas aplicações artísticas na ilustração pode ser encontrado na obra *“Anatomia de uma Ilustração”* (LOPES; CASTIÑEIRA, 2014). O livro está disponível gratuitamente para *download* (<http://www.riuni.unisul.br/handle/12345/2672>) e pode

ser compreendido como um guia prático para técnicas diversas na ilustração científica. A aplicação da ilustração científica, sobretudo aquela feita à mão, tem passado por um período de renascimento nos últimos anos (CHABRIER; JANKE, 2017). Mesmo que existam modernas câmeras fotográficas, somente com a ilustração torna-se possível destacar detalhes específicos, ressaltar uma informação ou criar de forma livre. Em trabalhos na área da saúde, por exemplo, conforme ressaltam Chabrier e Janke (2017), a ilustração é importante por facilitar a leitura e interpretação, como, por exemplo, representações histológicas, nas quais a ilustração pode facilitar sobremaneira a compreensão e visão das estruturas em estudo. Os livros didáticos se beneficiam muito desse tipo de elemento diagramado, pois tornam a compreensão de processos extremamente abstratos (e.g. processos bioquímicos e genéticos) mais fácil e simples. Periódicos científicos especializados em taxonomia, por exemplo, requisitam a presença de pranchas científicas (uma composição de figuras ou ilustrações) para fins de descrição e caracterização da espécie, seguindo a tradição secular de representação do mundo por meio de desenhos. Detalhes das normas específicas para cada tipo de elemento diagramado serão discutidas posteriormente neste capítulo.

Figura 3 – Um exemplo de ilustração científica, representando fungos habitantes de esterco. Esta ilustração foi realizada em papel A4, utilizando-se diversas técnicas combinadas, como grafite, nanquim, aquarela e lápis de cor



Fonte: Martin Mak (2016, com permissão).

5 APLICANDO A ARTE CIENTÍFICA EM TEXTOS ACADÊMICOS

As sessões 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 e 4.7 baseiam-se em dados extraídos da consulta de 95 periódicos científicos da área da saúde indexados ao *Scientific Electronic Library Online* – SciELO (www.scielo.br). SciELO é uma biblioteca promovida pela parceria entre a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, o Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde – BIREME e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. A escolha desse banco de dados para consulta foi justificada pelo pungente potencial da SciELO em prospectar a produção científica de autores brasileiros para a comunidade científica internacional. A coleta de dados foi realizada *on-line* no dia 17 de junho de 2020, a partir das seções de “instruções aos autores”, informadas individualmente pelos periódicos, sem qualquer restrição de idioma ou escopo. O critério de exclusão

aplicado foi para periódicos cujas instruções aos autores eram condicionadas ao acesso de sítios eletrônicos externos à SciELO e isso ocorreu em dois periódicos.

5.1 Política editorial para elementos diagramados

A quantidade e as dimensões de elementos diagramados é, geralmente, livre em produtos finais de curso, como: trabalhos de conclusão de curso (TCC), monografia, dissertação e tese. Mas periódicos científicos tendem a delimitar os quantitativos máximos desses elementos, de acordo com o tipo de publicação, que podem ser: artigo original, de atualização ou revisão, quando muito, com até 15 elementos diagramados; artigos especiais; casos clínicos (relatos); séries de casos e comunicações breves (*short communications*), com até seis elementos diagramados; carta ao editor e editorial, com poucas exceções, não aceitam elementos diagramados. Há, entretanto, outros tipos de publicações não citadas aqui e os quantitativos dependem da política editorial.

Letras, números e símbolos na área de plotagem de elementos diagramados são sujeitas à redução ou ampliação durante a produção gráfica, cuja dimensão linear mínima deve ser >2 mm para preservar a clareza e consistência da informação. Esse tamanho corresponde grosseiramente ao tamanho de 9 a 10 pt nas fontes Arial ou Times New Roman. O ideal é que a AC do manuscrito preserve um padrão uniforme de letras e símbolos, sendo mais corriqueiras as seguintes fontes ou fontes semelhantes a essas: Arial, Calibri, Courier, Times New Roman e Georgia. Fotomicrografias e radiografias com áreas críticas identificadas por letras ou sinais devem ser delimitadas para a identificação pelo leitor. É importante que as plotagens de textos nos elementos diagramados contrastem com o fundo do elemento e, se for necessário maior destaque, pode-se recorrer à escrita em caixa alta. Apesar das escritas em imagens não terem os caracteres contabilizados no limite de palavras ou

caracteres do manuscrito, elas são restritas a quantidade mínima e necessária para dar sentido completo à informação apresentada.

Os elementos diagramados devem ser planejados considerando a qualidade final da publicação mesmo após ampliação ou redução. Uma pergunta relevante ao elaborar o manuscrito é se a relevância da informação diagramada é coerente o suficiente para ocupar a área que lhe foi atribuída. Para isso, as dimensões podem ser planejadas quanto ao número de colunas a serem ocupadas na página impressa, restringindo-se a uma única página. Os valores mais comumente aplicados são de no máximo 7,5 a 8,6 cm para uma coluna; 15 a 18 cm para duas colunas; e de 20 a 24 cm para a altura, incluindo o título, legenda e nota de rodapé. Alguns periódicos adotam medidas ainda menores, com o máximo de 10 e 16 cm para largura e altura, respectivamente.

As tabelas, em especial, podem ser condicionadas à rígida instrução de formatação. Quando o formato de paisagem (largura maior que altura) é vetado, a tabela em formato de retrato (altura maior que largura) deve ser constituída por até 10 colunas, 12 linhas e até 100 caracteres/linha, reduzindo-se 5 caracteres para cada coluna além da primeira. Há políticas editoriais que consideram tabelas com seis ou mais colunas correspondem a elementos diagramados múltiplos.

Mesmo dentro do limite permitido, a publicação de elementos diagramados pode acarretar taxas a serem custeadas pelos autores, em especial, quando o elemento for colorido. Um elemento colorido pode ser publicado em preto e branco, caso a avaliação editorial considere assim pertinente. No caso de tabelas, a taxação pode se basear na área ocupada por página(s) ou na contagem do número de linhas e colunas. Os valores a serem pagos pela publicação são comunicados na fase de produção gráfica, ou seja, após a avaliação de mérito do manuscrito. Mediante a política editorial, os autores podem ser convidados a ilustrar a capa do volume do periódico sem custo adicional.

5.2 Aspectos éticos para uso de elementos diagramados

Dados de pesquisas envolvendo seres humanos são legalmente e moralmente condicionados à “Proteção dos direitos e privacidade dos pacientes que participam de pesquisas”. A fim de resguardar a identidade, apenas os dados do paciente estritamente essenciais para o propósito científico podem ser relatados.

Apesar do uso de fotografias de pacientes ser desencorajado, recomenda-se que a face seja tarjada quando a exposição do paciente for imprescindível. Ainda assim, deve-se atentar para o fato de que a tarja não garante integralmente a manutenção do sigilo e, portanto, é uma proteção inadequada do anonimato. A tarja, por outro lado, pode ser totalmente inaplicável se impedir ou distorcer o significado do objeto científico de interesse como, por exemplo, em análise antropométrica facial. Por isso, alguns periódicos científicos adotam postura pragmática ao recomendar a exposição mínima do paciente e, quando o fizer, que seja de forma consentida e não tarjada. Outros periódicos tomam para si a tarefa de cobrir ou recortar parte da imagem, se isso for necessário para preservar a identidade do paciente.

As recomendações aplicadas ao uso da imagem de pacientes por fotografias também são direcionadas aos vídeos em manuscritos científicos digitais e documentários científicos. A fim de resguardar a imagem dos pacientes, cabe aos editores solicitar edição adicional do vídeo como condição para publicação do material.

Nesse sentido, o uso da imagem de pacientes em publicação científica é condicionado ao consentimento formal do sujeito, ou quem por ele for responsável, após ter acesso à íntegra do manuscrito a ser publicado. Quando pessoas próximas ao paciente forem potencialmente identificadas em decorrência da divulgação do relato científico, o consentimento deve ser obtido também dessas pessoas. A obtenção do Termo de Consentimento e/ou de Assentimento Livre e

Esclarecido que contemple o uso da imagem tem que ser declarada na publicação, assim como a declaração de irrestrito acesso ao manuscrito antes e após a publicação pelo paciente.

Uma vez que o anonimato completo do paciente pode se tornar uma tarefa inalcançável, pelo menos as formas de identificação podem ser minimizadas pela supressão dos dados pessoais e particularidades, como: nome; iniciais; data de nascimento; tatuagem e demais modificações corporais; marca de nascença; dados genealógicos; identificação da instituição de atendimento; localidade de residência; minoria étnica; assinatura ou rubrica em documentos; número de prontuário ou registro do paciente. O paciente deve ser referido no manuscrito por um código, como, por exemplo: “paciente #1”. Em relatos anedóticos, os dados do paciente podem ser substituídos por informações declaradamente fictícias. A alteração de dados, como os heredogramas, para proteger o anonimato do paciente, não pode distorcer o significado científico apresentado.

Outro aspecto ético e legal relevante para o uso de elementos diagramados é o respeito aos direitos autorais. O uso de elementos publicados previamente ou de autoria alheia deve ter a fonte citada e listada com os créditos apropriados nas referências. A obtenção da concessão para a reprodução do elemento diagramado pelos detentores dos direitos autorais é responsabilidade dos autores e o detalhamento dessa informação pode ser exigida no texto da legenda. No caso de fotografias, a concessão de uso é recomendada mesmo quando o fotógrafo é o próprio autor do manuscrito, bem como o respectivo consentimento das pessoas fotografadas. Quando o elemento é de autoria própria, tal declaração pode ser exigida junto ao elemento diagramado para dirimir dúvidas sobre os direitos autorais da publicação, como por exemplo: “fonte – próprio autor”.

No Brasil, os documentos são de domínio público após o 70º ano de falecimento do autor ou, no caso de obras audiovisuais e fotográficas, após 70 anos da primeira exibição. Por valer a partir do dia 1 de janeiro do ano subsequente, consideram-se 71 anos de

prazo em ambos os casos acima citados. O domínio público também é considerado quando a obra é compartilhada intencionalmente de forma livre, irrestrita e gratuita, como os elementos disponibilizado pela biblioteca virtual do *Center for Environmental Science* da Universidade de Maryland (<https://ian.umces.edu/symbols/>). Elementos de domínio público devem ter a fonte devidamente citada como fonte e os créditos descritos nas referências.

5.3 Elementos diagramados, legendas e títulos

Cada tipo de elemento diagramado deve ser designado em ordem numérica crescente de aparecimento no manuscrito, seja com algarismos arábicos ou romanos. Para tornar a apresentação de dados mais objetiva, citações indiretas como “os resultados estão apresentados na Figura 1” são preferencialmente evitadas, dando lugar a explicação dos dados diagramados seguido de uma curta referência ao elemento diagramado numerado e entre parênteses, por exemplo: (Figura 1). Os dados complementares que não compuserem os elementos diagramados devem ser descritos no corpo principal do texto. Após a designação ou “chamada” no texto, o elemento diagramado deve ser inserido tão próximo quanto possível, como forma de facilitar a fluidez da leitura. Uma recomendação bastante útil é que o primeiro elemento diagramado do manuscrito represente os principais dados. Dessa forma, esse elemento torna-se a parte central do manuscrito por sintetizar a essência do manuscrito. Se necessário, os autores podem diagramar um painel com os dados principais.

Conforme as instruções específicas aos autores, a inserção dos elementos diagramados pode ocorrer tanto no corpo do texto quanto em páginas separadas ao final do manuscrito ou em arquivos individuais avulsos. Nos últimos dois casos, o periódico pode orientar aos autores a indicarem a localização preferencial dos elementos diagramados no corpo do texto, por exemplo, escrevendo-se o nome do elemento entre colchetes angulares: < *Figure 1* >, < *Table1* >, etc. Os

elementos enviados como arquivos avulsos para publicação devem seguir as instruções fornecidas aos autores, variando desde arquivo-texto ou planilha até imagem de alta resolução.

O elemento diagramado é obrigatoriamente identificado por um título sucinto, geralmente, de até 15 palavras, além de uma legenda breve e autoexplicativa sobre a mensagem chave do elemento diagramado sem abreviações, siglas e longas descrições metodológicas. O local para se discutir o conteúdo, em riqueza de detalhes, é no corpo do texto principal do manuscrito, não no título ou legenda. Como exemplo, as instruções da revista *Texto & Contexto Enfermagem* (ISSN 0104-0707, versão impressa; 1980-265X, versão *on-line*) fornecem um padrão bastante completo que informa o objetivo, a delimitação temporal e espacial em tal redação: “título informativo, conciso e claro, contendo “o que”, “de quem”, cidade, sigla do Estado, país, ano da coleta de dados, seguido de ponto. Na sequência, informar o tamanho da amostra estudada entre parênteses precedido da letra n. Exemplo: Tabela 1 – Distribuição das mulheres vítimas de violência doméstica, segundo idade, cor, estado civil e escolaridade. Salvador, BA, Brasil, 2014. (n=209)”.

Em tabelas, além do título para todo o elemento, os resultados de referentes a cada coluna devem ser identificados por cabeçalho curto ou abreviado, tais como: %, n, média, mediana, p-valor, entre outros. Nos gráficos com coordenadas cartesianas, títulos dos eixos devem ser informados na abscissa e na ordenada. O teste estatístico e o p-valor devem ser relatados mesmo quando o resultado não for significativo, evitando-se o uso da simples informação abreviada por “NS”. Dados quantitativos com barras de medida de dispersão devem incluir o número de replicatas, com a informação se trata-se de desvio padrão (*standard deviation of mean – sd*) ou com erro padrão (*standard error of mean – sem*).

Para otimizar espaço, abreviação, abreviatura, sigla e símbolo (oficiais ou não) podem ser explicados em ordem alfabética na legenda ou em nota de rodapé, mesmo quando inicialmente descri-

tos no texto. A legenda também deve explicar os dísticos, ou seja, os marcadores que pontuam informações sobre o que foi apresentado no elemento gráfico. Os dísticos podem ser símbolos, setas, números ou letras integrados na composição de imagens, em especial, por sinalizarem dados ou estruturas a serem ressaltados no elemento diagramado. Em figuras e tabelas, a seguinte ordem de seis dísticos é recomendada na legenda ou nota de rodapé: *, †, ‡, §, //, ¶, #, **, ††, etc. Repare que, após o uso dos seis dísticos iniciais em um mesmo elemento diagramado, os dísticos seguintes correspondem aos múltiplos do marcador inicial, como: ** e *** na duplicata e triplicada de *, respectivamente. No corpo do elemento diagramado, os dísticos são utilizados sequencialmente em sistema de leitura ziguezague, ou seja, da esquerda para a direita, de cima para baixo.

A nota de rodapé é onde se cita a fonte de dados secundários utilizados no elemento diagramado. No caso de periódicos impressos em preto e branco, a legenda do elemento diagramado deve informar também sobre a disponibilidade da versão colorida na versão digital da publicação (*this figure is in color in the electronic version*).

Nos achados microscópicos e de microscopia eletrônica, o corante e nome do método de preparo da amostra e barra de magnificação são requeridos, seja na legenda ou seja na seção de materiais e métodos. A barra de magnificação pode ser indicada por uma linha ou barra e, se na legenda, pela redação: “barra = __ mm”. Prospectos do microscópio, fotodocumentadores e *softwares* são parte do texto principal.

Ao formatar o manuscrito, cabe os autores verificar se título, legenda e nota de rodapé devem ser posicionados nas páginas finais do manuscrito ou em arquivo à parte, bem como diretamente na parte superior ou no rodapé do elemento.

5.4 Publicações clínicas com ênfase em imagens

Diversos periódicos científicos na área da saúde e áreas correlatas destinam seções específicas para manuscritos com ênfase em imagens, por exemplo, de exames histopatológicos, exames complementares diversos, ilustrações e registros clínicos. Esse tipo de manuscrito tende a ser curto, cujas imagens são acompanhadas de uma descrição e a respectiva forma de interpretação. Se a ilustração constituir um relato de caso clínico, a forma de diagnóstico diferencial é uma informação adicional valiosa.

O escopo desses manuscritos salienta o uso iconográfico com valor educacional para relatar imagens patognomônicas, mecanismos fisiopatológicos, achados raros ou promissores em técnicas de diagnóstico, protocolos terapêuticos e novas tecnologias. A imagem, com ou sem movimento, é apresentada como uma forma registro e compartilhamento visual de uma situação real vivenciada por profissionais especializados na temática em que a imagem se insere. A correlação das imagens com os demais exames clínicos é uma estratégia profícua para a inovação de conduta frente a um novo produto potencialmente aplicável à saúde.

Assim como as publicações com ênfase em imagens estáticas, a publicação de vídeos constitui um tipo próprio de produção científica alternativamente facultado por alguns periódicos aos autores. Por se tratar de uma mídia que extrapola o padrão bidimensional estático tradicional herdado do papel impresso, a publicação de vídeos pode ocorrer pela citação de um *link* no corpo do texto principal (E-vídeo) ou pela disponibilização do arquivo suplementar na íntegra para *download*, por exemplo, nos formatos “.avi”, “.mov” ou “.mpg”. O arquivo deve seguir parâmetros de específicos de resolução, duração e quantidade instruídos pelo periódico.

O texto principal ao qual o vídeo se vincula tem como objetivo direcionar a atenção do leitor para os dados principais a serem observados. A legenda externa ao vídeo deve ser curta, com até 40

palavras, mais título da obra, autoria, instituição e demais detalhes que os autores julguem pertinentes. Se múltiplos vídeos forem inseridos, a sequência dos vídeos deve ser informada nessa legenda. Quanto às legendas e aos sons embutidos nos vídeos, a clareza e a nitidez são condicionantes para a qualidade da publicação, devendo-se alinhar coerentemente à sincronia, alternativa de idiomas e conteúdo. Adicionalmente, o valor educacional do vídeo como elemento diagramado em trabalhos científicos depende da observância de normas éticas e de se abster de veicular conteúdos publicitários diretos ou indiretos.

A publicação de vídeos permite apresentar a *praxis* do conhecimento de ponta, ou seja, o estado da arte em múltiplas especialidades ou saberes em saúde. Pode-se exemplificar a importância do uso desse recurso quando se pretende mostrar um recorte temporal da realidade, como: análise cinesiológica e de biomecânica; avaliação da marcha; procedimentos de primeiros socorros; procedimentos cirúrgicos, dentre outras situações em que o objeto de estudo é apresentado sem representação. Pode-se, também, utilizar os vídeos para representar uma dinâmica de informações que refletem a verdade, como na ultrassonografia e demais exames de imagem com movimento. A comunicação oral de autoridades científicas em eventos, preferencialmente acompanhada das imagens das projeções, e o registro de depoimentos históricos são dois outros possíveis exemplos de vídeos como objeto de produção científica.

Manuscritos com relatos de imagens são relevantes em outras temáticas da saúde, além da área clínica. Imagens contextualizadas em temáticas correlatas às Ciências Biológicas, Física e Química, por exemplo, podem ser de interesse interdisciplinar para as Ciências da Saúde.

Por serem de manuscritos sucintos, as publicações de imagens em geral limitam-se a um total de quatro a seis autores, de 250 a 1.500 palavras, 20 elementos diagramados (sendo dois vídeos) e 10 referências. Mesmo que resumo ou *abstract* não seja contemplado

por esse tipo de publicação, de três a cinco descritores e/ou *MESH terms* são esperados por manuscrito. Os sítios eletrônicos para consulta são: <http://decs.bvs.br/>, para descritores, e www.nlm.nih.gov/mesh, para *MESH terms*.

5.5 Composição de painel ou prancha de imagens

Painel ou prancha é uma composição de duas ou mais imagens identificadas de forma individual, geralmente, por letras. O padrão de identificação das subpartes é uma informação esperada no título e, se necessário, com os detalhamentos na legenda. Esse recurso de diagramação é uma possível escolha para otimizar o uso do espaço da publicação, por exemplo, quando composto por vários componentes de dimensão reduzida. Outra situação, que é mais justificável, é quando o painel é composto por elementos indispensáveis entre si para a interpretação dos dados. A formatação apropriada do painel inclui o corte da imagem para eliminar áreas livres das bordas e delimitar com mais acurácia os elementos combinados. Conforme a política editorial, o painel pode ser contabilizado como elemento único ou ter as subpartes contadas individualmente.

5.6 Documentos suplementares

Em produtos finais de curso, os documentos suplementares são comumente pensados ou anexados ao final do manuscrito, motivo pelo qual esses documentos são referidos como “apêndice” e “anexo”. No caso da submissão eletrônica para periódicos e editoras de livros, os documentos suplementares são arquivos avulsos ao texto principal, podendo compreender elementos diagramados ou textos complementares. Uma vez que o manuscrito seja publicado, os documentos suplementares são distribuídos como elementos diagramados embutidos no corpo do texto principal ou como informação complementar para consulta *on-line*, conforme o interesse do leitor. A recomendação de inserção de informação complementar pode partir

do Editor ao aceitar o manuscrito, bem como pode ser a proposta dos próprios autores desde o início da submissão.

Cada elemento diagramado deve ser gravado em arquivo individual. Para a atribuição de nomes aos arquivos eletrônicos, geralmente, pede-se que o elemento diagramado seja nominalmente referido com o nome do primeiro autor e a numeração, por exemplo, “Silva_Figure_1.jpeg” ou “Silva_Table_1.docx”, ou, com tipo de elemento diagramado e a respectiva numeração, por exemplo, “Figure_1.jpeg” ou “Table_1.docx”. Seja qual for a composição de palavras utilizadas para nomear os arquivos, uma lógica de nomenclatura deve ser uniformemente seguida. O conjunto de três ou quatro letras ao final do nome do ficheiro refere-se à extensão do arquivo e indica em qual programa o arquivo pode ser aberto. O *upload* dos arquivos em plataformas eletrônicas de submissão *on-line* pode ter, inclusive, que seguir a sequência numérica dos elementos diagramados no manuscrito.

Os documentos suplementares para informação complementar são partes que extrapolam o bojo da publicação, tais como apêndices; bancos de informações demasiadamente extensos; dados brutos; figuras; notas técnicas e *podcast*. Esses documentos são designados no texto com numeração em ordem crescente precedida pela letra “S”, como no exemplo: *Figure S1 available as online-only supplementary material*. Os leitores devem ser orientados no manuscrito sobre a forma de acesso *on-line* a essas informações. As normas para formatação dos suplementos variam consideravelmente e as possíveis formatações são em arquivos texto, planilha ou PDF, com páginas numeradas. Logo na primeira página, a identificação do documento, os títulos e os conteúdos devem informados, apresentando paralelismo com o que foi designado no texto principal. Possivelmente, o arquivo será publicado sem alteração editorial, portanto, quanto menor o tamanho desses arquivos, mais facilmente eles serão transferidos para consulta.

Em relação aos arquivos de imagem, a extensão JPEG é conveniente, por comprimir o arquivo, enquanto a extensão TIFF preserva a resolução da imagem ao custo do arquivo ficar mais pesado. Os arquivos GIF, BMP, PICT, WPG podem não ser recomendados em publicações científicas devido ao reduzido número de pixels, limitada paleta de cores e, portanto, baixa qualidade de imagem. Para os manuscritos redigidos em TEX, AMS-TEX ou LaTeX, o arquivo .BIB deve ser juntamente submetidos. Algumas das demais extensões de uso corrente para submissão de elementos diagramados incluem: “.cdr”, “.doc”, “.eps”, “.png”, “.psd”, “.xls”.

Os autores são aconselhados a arquivar os documentos do manuscrito em múltiplas cópias e mídias. Quando se tratar de documentos em versão física, os cuidados para preservar a integridade do material devem ser redobrados. Os dados submetidos *on-line* para publicação estão sujeitos a pedido de reenvio dos arquivos digitais ou envio dos arquivos originais para conclusão da fase de produção gráfica. Adicionalmente, a equipe editorial pode solicitar arquivos que permitam edição.

Raramente, quadros e tabelas são solicitados em arquivos com extensão JPEG, PNG ou TIFF, da mesma forma que alguns periódicos reprovam sumariamente imagens originadas em editores de texto ou de apresentação (arquivo “.ppt”, por exemplo). A estrutura das tabelas deve ter os dados distribuídos por casela, evitando-se a inserção de imagens e/ou caixa de texto, espaço para separar dados, sublinhado, marcadores de parágrafo, recuos pelo uso da tecla TAB(uladora), cores e a quebra de linha pelo uso das teclas ENTER ou RETURN (shift+enter, no PC).

Em situações muito peculiares para o contexto atual, o envio de material físico via correio pode ser necessário. No caso de mídias, os periódicos citam o envio de CD e CD-ROM. No caso de material impresso, instrui-se que o verso da impressão seja etiquetado o rótulo com a identificação do manuscrito, identificação dos autores e uma seta que indique o lado de cima. Radiografias físicas

e registros em papel termossensível, por exemplo, podem ser enviados como fotos de boa qualidade. Sem dúvidas, espera-se uma posterior reprodução digital do elemento diagramado submetido fisicamente para publicação.

5.7 Instruções aos autores

O cumprimento das instruções aos autores é item de avaliação nos trabalhos científicos. Em produtos finais de curso, o não atendimento às instruções pode acarretar prejuízo de nota ou de conceito. Nos periódicos científicos, o manuscrito é preliminarmente avaliado quanto ao cumprimento das normas por um Assistente Editorial, que pode se recusar dar prosseguimento na avaliação ou rejeitar sumariamente os manuscritos fora das normas. A rejeição do manuscrito na avaliação preliminar é informada aos autores por uma carta de recusa, sem devolução da taxa de submissão, quando for o caso. Uma vez aprovado nessa etapa, o manuscrito segue para o Editor-chefe e posterior parecer quanto ao mérito por revisão por pares.

Os autores são responsáveis pela qualidade da arte digital, cujos parâmetros mínimos incluem: área da página a ser ocupada pelo elemento diagramado, tamanho e tipo do arquivo eletrônico, recorte da borda das imagens e espaçamento entre partes que compõem uma composição. Conforme o grau de insegurança dos autores para confeccionar os arquivos com as ferramentas eletrônicas adequadas, recomenda-se que a equipe editorial seja consultada para tirar dúvidas e a intervenção de um profissional de artes gráficas pode ser necessária. Um conjunto de normas pode ser instruídas aos autores, como ABNT, IBGE e/ou Vancouver.

Para evitar que um manuscrito chegue ao estágio final de editoração com erros, cabe aos autores certificar que todo o material foi conferido exaustivamente antes de submeter para publicação. A equipe de diagramação e editoração do periódico, no entanto, tem

Capítulo 23

A ARTE CIENTÍFICA NA PRODUÇÃO ACADÊMICA

autonomia para adequar padronização linguística, adequar qualidade de imagens e corrigir redundâncias, mesmo que retirando elementos diagramados. Para assegurar as condições de correção editorial, as instruções aos autores requererem a submissão de arquivos editáveis em formato vetorial, como exemplificado por fluxograma, gráfico, organograma e tabela apensados eletronicamente como arquivos dos programas Excel, GraphPrism, SPSS 22, Corel Draw Suite X7 e Word. Já as imagens podem ter extensões .cdr, .pzf, .spv, .jpg, .jpeg, .xls, .xlsx, .doc, .docx, .vsdx e .vst. Alguns periódicos, inclusive declaram a recusa expressa de elementos diagramados originalmente gerados em computador e posteriormente digitalizados. Recomendações gerais para composição dos elementos diagramados podem ser consultadas e aplicadas como um ponto de partida (Quadros 1, 2 e 3).

Quadro 1 – Principais elementos diagramados genericamente como “Figura”

Itens	Exemplos	Lembretes para as situações mais frequentes
Figuras	Desenho, esquema, fotografia, fotomicrografia, heredograma, ilustração, imagem computacional e outros.	Em preto e branco, com alto contraste (1.200 dpi/ppi); combinação de meios tons (600 dpi/ppi); meio tom (300 dpi/ppi); considerar 300 dpi para publicação com ~2.500 x 3.300 pixels; dar preferência ao fundo branco; dimensionada para a altura e a largura da coluna ou da página; formato digital de alta resolução (até 2 a 5 Mb); resolução mínima de 300 dpi para formato gráfico (JPEG ou TIFF); resolução mínima de 600 dpi para bitmap; e, se necessário, informar escala.
Composição	Figura com várias partes.	Identificar imagens individuais da composição com letra no canto superior direito. Por exemplo: 1a, 1b, 2a, 2b, ou 1A, 1B, 2A, 2B.
Gráficos	Diagrama de: área, barra, circular, coluna, dispersão, histograma, radar, rede e outros.	Resolução mínima de 300 dpi para formato gráfico (JPEG, PNGF ou TIFF); arquivos do Excel ou SigmaPlot podem ser suplementares (<i>not for review</i>); informar título e unidade dos eixos; usar até seis subdivisões por eixo; e usar cor preta ou tons de cinza, listrado e tracejado em barras e linhas; usar símbolos abertos ou sólidos; como símbolos, usar círculos, quadrados, triângulos, ou losangos; evitar tonalidades de cinza para barras, linhas e símbolos; evitar linhas de grade horizontais ou verticais; evitar efeitos em 3D ou de profundidade; evitar o uso de diagrama circular, de setores, “torta” ou “pizza”; não usar linha de borda ou preenchimento de fundo.
Mapas	Físico e humano	Incluir escala; e incluir, pelo menos, um ponto cardeal.

Fonte: Próprios autores (2021).

Quadro 2 – Elementos diagramados com movimento

Itens	Lembretes para as situações mais frequentes
Vídeos e E-vídeos	Podem mostrar a realidade ou apenas representar a realidade; até 10 MB; extensões ".MPEG", ".AVI" ou ".WMV", em especial "MP3" ou "MP4"; e duração de até 4 minutos.

Fonte: Próprios autores (2021).

Quadro 3 – Elementos diagramados para dados discursivos e numéricos

Itens	Lembretes para as situações mais frequentes
Quadros Descrevem associação facilitada de dados discursivos	Apresentam informações discursivas, textuais e sem dados estatísticos; elaborar em editor de texto ou editor de planilhas; evitar elementos de imagem, caixas de texto ou tabulações; não converter em imagem; preferencialmente, restringir ao limite de uma mesma página e usar linhas internas e nas bordas verticais/horizontais.
Tabelas Descrevem dados que não são compreensíveis em um parágrafo de texto	Apresentam dados estatísticos e valores numéricos comparativos; condições experimentais são descritas em nota de rodapé; converter tabelas curtas em texto; delimitar o cabeçalho e o final com linhas horizontais; devem ser o mais simples possível; elaborar em editor de texto ou de planilhas; evitar elementos de imagem, caixas de texto ou tabulações; não converter em imagem; não usar linhas verticais; preferencialmente, restringir a limite de uma mesma página; e, se forem permitidas cores, utilizar tons claros.

Fonte: Próprios autores (2021).

A versão final ou prova de prelo é a publicação diagramada e prestes a ser publicada. O autor principal do manuscrito é responsável por receber essa versão e deliberar, juntos com os coautores, a aprovação a acuidade editorial e tipográfica do manuscrito. Apenas alterações menores são permitidas nessa etapa, o que contempla a alteração pontual de ortografia ou dado numérico nos elementos diagramados. Entretanto, alterações maiores não são aceitas pela equipe editorial.

Dicas de sítios eletrônicos para elaboração de arte científica

- ABNT
- *Committee on Publication Ethics* – COPE
- Guia detalhado sobre arte eletrônica
- *Guidelines* para consolidação do manuscrito
- *Image Quality Specifications*
- *Instructions to Make Quality Images for Publications*
- Loja de serviços virtual da Elsevier
- Normas de apresentação tabular – Fundação IBGE (3ª edição)
- *PLoS Biology Guidelines for Table and Figure Preparation*
- Políticas editoriais no âmbito internacional para o uso de dados pessoais de pacientes
- Sistema Internacional de Unidade

REFERÊNCIAS

AUSUBEL, D. P. **The acquisition and retention of knowledge: A cognitive view.** Dordresht: Kluwer Academic Publishers, 2000. 212p.

BUENO, W. C. **Jornalismo científico no Brasil: os compromissos de uma prática dependente.** 1984. Tese (Doutorado em Meios e Processos Audiovisuais) – Escola de Comunicação e Artes São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984.

CALAÇA, F. J. S.; ARAÚJO, J. C.; XAVIER-SANTOS, S. O status ecológico das comunidades de fungos coprófilos. **Pesquisa e Ensino em Ciências Exatas e da Natureza**, v. 1, p. 136-143, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.29215/pecen.v1i2.452>. Acesso em: 30 jan. 2021

CALAÇA, F. J. S. **Micobiota micorrízica e saprofítica em diferentes fitofisionomias de Cerrado no Distrito Federal, Brasil.** 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Faculdade UnB de Planaltina, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2018.

Capítulo 23

A ARTE CIENTÍFICA NA PRODUÇÃO ACADÊMICA

CHABRIER, R.; JANKE, C. The comeback of hand drawing in modern life sciences. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, p. 137-138, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.126>. Acesso em: 20 nov. 2020

CORREIA, F. A ilustração científica: “santuário” onde a arte e a ciência comungam. **Visualidades**, v. 9, n. 2, p. 223-241, 2012. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/VISUAL/article/view/19864>. Acesso em: 12 nov. 2020

DRIVER, R. Psicología Cognoscitiva y esquemas conceptuales de los alumnos. **Enseñanza de las Ciencias**, v. 4, n. 1, p. 03-15, 1986.

ISAACSON, W. **Leonardo da Vinci**. Editora Intrínseca. Rio de Janeiro. 640 p.

JUCAN, M. S.; JUCAN, C. N. The power of Science Communication. **Social and Behavioral Sciences**, v. 149, p. 461-466, 2014. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.sbspro.2014.08.288>. Acesso em: 12 nov. 2020

LOPES, L.; CASTIÑEIRA, M. I. **Anatomia de uma ilustração: os bastidores da ilustração científica**. Editora Unisul, Palhoça, 79 p., 2014. Disponível em: <http://www.riuni.unisul.br/handle/12345/2672>. Acesso em: 18 out. 2020

MACÍAS-CHAPULA, C. A. Hacia un modelo de comunicación en salud pública en América Latina y el Caribe. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 18, p. 427-438, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.org/pdf/rpsp/2005.v18n6/427-438/es>. Acesso em: 18 out. 2020

MOURA, N. A.; SILVA, J. B.; SANTOS, E. C. Ensino de Biologia através da Ilustração Científica. **Revista Temas em Educação**, v. 25, p. 194-204, 2016.

SANTOS-SILVA, M. A. A ilustração científica como parceira na conservação do Cerrado. **Sustentabilidade em Debate – Brasília**, v. 6, n. 1, p. 200-217, 2015.



Capítulo 24

A ARTE CIENTÍFICA COMO FERRAMENTA NA DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

ANDREIA JULIANA RODRIGUES CALDEIRA
FRANCISCO JUNIOR SIMÕES CALAÇA
FLÁVIO MONTEIRO AYRES

1 INTRODUÇÃO

A popularização da ciência dissemina conhecimentos, de modo a melhorar a vida das pessoas, além de dar suporte a desenvolvimentos econômicos e sociais sustentáveis. A divulgação científica propaga o conhecimento científico de forma atraente a diferentes públicos e não deve ser entendida como um acessório, mas sim como uma ferramenta necessária para que a pesquisa cumpra o poten-



Fonte: Camila Camargo Borges (2021).

cial que tem de impactar a sociedade e a comunidade científica. Deve-se ressaltar que a comunicação para o público em geral também pode moldar a percepção pública sobre a ciência e, consequentemente, interferir no investimento em pesquisas.

A comunicação dos resultados da pesquisa em saúde, de forma acessível e inteligível para a população são imprescindíveis. É preciso alcançar o compromisso público com as atividades e benefícios da pesquisa científica, especialmente a pesquisa em saúde. A conquista desse compromisso tem implicações diretas na saúde pública, pois permite maior confiança da população nos cientistas e em suas pesquisas e facilita a implementação de políticas públicas, no nível dos serviços prestados pelos estabelecimentos de saúde na área de promoção, prevenção e controle de danos à saúde pública.

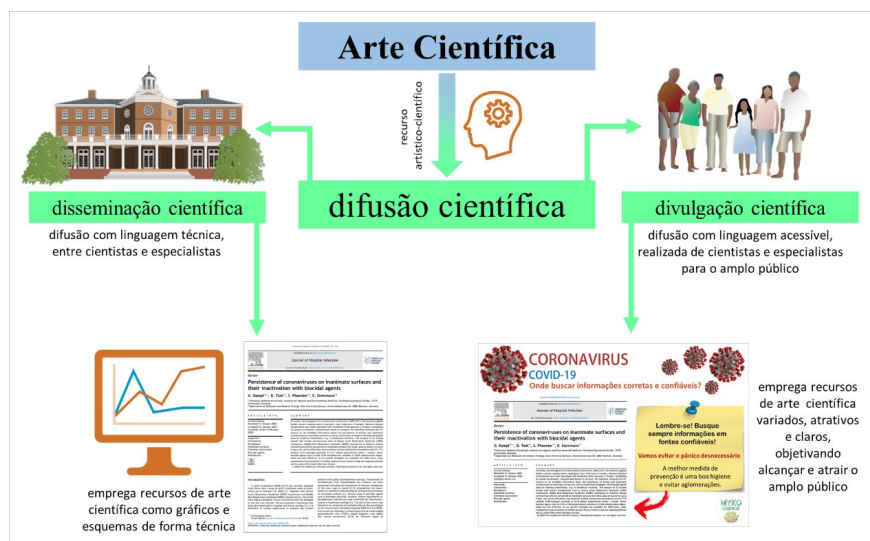
2 A ARTE CIENTÍFICA NA DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

Arte científica é um conjunto de técnicas utilizadas para ilustrar, representar, sintetizar ou apresentar informações de cunho científico (CORREIA, 2012) e que é amplamente usada em todas as categorias de **difusão científica** tanto no que se diz respeito à **disseminação científica** (comunicação entre especialistas, via periódicos especializados), quanto à **divulgação científica** (comunicação para a sociedade) (BUENO, 1984; MACÍAS-CHAPULA, 2012). A **divulgação científica**, ou popularização da ciência, transpõe a linguagem técnica e formal, para uma comunicação não-formal, que consiga ser compreendida por pessoas não-especialistas em determinado assunto (Esquema 1). Desse modo, a divulgação científica permite que a ciência circule, propiciando um elo entre os cientistas e a comunidade em geral, o que garante que o conhecimento obtido nas Universidades e centros de pesquisas sejam acessíveis ao cidadão, ajudando-o na tomada de decisões mais críticas em seu dia a dia, potencializando o debate científico e instigando novos talentos (ALBAGLI, 1996; BUENO, 1984, 1995).

Capítulo 24

A ARTE CIENTÍFICA COMO FERRAMENTA NA DIVULGAÇÃO

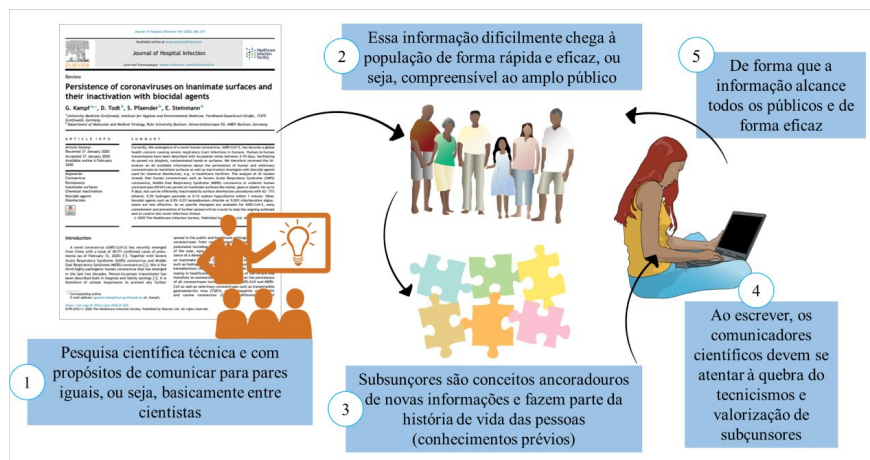
Esquema 1 – Relação entre disseminação e divulgação científica no contexto da difusão científica e arte científica



Fonte: Francisco Calaça (2021).

A **divulgação científica** (Esquema 2) comporta as mais diversas atividades, tais como as realizadas por museus, planetários, zoológicos, aquários, jardins botânicos, sítios e monumentos naturais, arqueológicos e etnográficos. Envolve, ainda, meios de comunicação como documentários de televisão, feira de ciências, revistas de divulgação científica, artigos em periódicos, *podcasts*, *websites*, blogs, redes sociais diversas, trocas de informações feitas entre cientistas em instituições de pesquisa, a elaboração de livros e de outros informativos por parte de cientistas e várias outras, inclusive as jornalísticas. Existem também canais de televisão dedicados exclusivamente a divulgação científica, evidenciando o grande interesse dos meios de comunicação por fazer da ciência um de seus temas centrais (CAVALCANTI; PERSECHINII, 2011; KEMPER; ZIMMERMANN; GASTAL, 2010; PORTO, 2009; ROMANÍ *et al.*, 2018).

Esquema 2 – Roteiro da divulgação científica por comunicadores científicos



Fonte: Francisco Calaça (2021).

É perceptível a dependência da sociedade em ciência e tecnologia, mas, por outro lado, evidencia-se o analfabetismo científico presente entre a população. Se essa lacuna não for diminuída ou preenchida, o pensamento crítico corre o risco de desaparecer, o que pode levar as pessoas a serem mais influenciáveis e facilmente enganadas por qualquer discurso e se afastarem cada vez mais do conhecimento científico (SAGAN, 2006). Isso pode resultar na descrença pela ciência, na falta de envolvimento da população e, conseqüentemente, na redução de fomentos para pesquisa.

A divulgação científica no Brasil cresce a cada ano (DE OLIVEIRA; DE SENZI ZANCUL, 2014) e apresenta cada vez mais alternativas para facilitar o ensino e a aprendizagem no meio acadêmico e na comunidade em geral (GASPAR; SOPELETE, 2013). Porém, a mudança cultural nas práticas de DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA é um processo longo que requer uma abordagem flexível e forte comprometimento de todas as partes interessadas (DE CASTRO *et al.*, 2012). Órgãos de fomento à pesquisa têm incentivado os cientistas a realizarem atividades de popularização da ciência. Como exemplo, cita-se o Prêmio José Reis de Divulgação Científica (CNPQ – Brasil).

O público leigo, em geral, sente dificuldade para acompanhar determinados temas ou assuntos, simplesmente porque eles não se situam em seu mundo particular (BUENO, 2010; GERMANO, 2005). É preciso que o conhecimento científico esteja inserido no cotidiano, no interior de um contexto sócio-histórico (KEMPER; ZIMMERMANN; GASTAL, 2010), colocando a ciência em reflexão e debate, no campo de participação social (GERMANO; KULESZA, 2007; LORDÊLO; PORTO, 2012). Nesse sentido, a popularização científica passa a ser um compromisso social, que podem permitir o desenvolvimento de uma consciência crítica em relação a si mesmo, aos outros e ao mundo (BODISON *et al.*, 2015; SCHALL, 2000) e a arte científica pode contribuir nesse processo.

Divulgar a ciência de forma acessível, clara e popular é fundamental para aproximar os cidadãos às questões científicas que afetam profundamente a vida de todos. A comunicação científica deve sempre direcionar o engajamento científico do grande público (JUCAN; JUCAN, 2014). Dessa forma, a divulgação científica deve ser desenvolvida com o propósito de utilizar habilidades e recursos que cada comunicador possui para aproximar e integrar os cidadãos da Ciência. Esses recursos incluem estratégias facilitadoras e direcionadoras, para que a assimilação da informação se torne mais fácil. Uma excelente estratégia de DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA para a informação científica seria pelo uso de **elementos diagramados** que representam um conjunto diverso e heterogêneo de linguagens não verbais, tais como: desenho; diagrama; esquema; E-vídeo; figura; fluxograma; fotografia; gráfico; gravura; ilustração; imagem; imagem com movimento; imagem de satélite; mapa; organograma; planta; quadro; questionário; radiografia; retrato; tabela; vídeo; história em quadrinhos, dentre outros (CABELLO *et al.*, 2010; DECCACHE *et al.*, 2010; GASPAR; SOPELETE, 2013; OLIVEIRA, 2010). Desse modo, os elementos diagramados: 1) tornam a informação atrativa, para que o leitor leigo se interesse em lê-la; 2) deixam a leitura sem tecnicismo, de fácil compreensão

e que incluía conhecimentos prévios [o que na teoria da aprendizagem significativa de Ausubel (2000) definimos como subsunçores, ou seja, conhecimentos já adquiridos que podem reforçar a compreensão de uma nova informação] para facilitar associações; 3) faz com que a informação apresentada seja resumida, sem perder a ideia principal do artigo original.

3 A DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA NA ÁREA DA SAÚDE

A comunicação dos resultados da pesquisa em saúde, de forma acessível e inteligível para a população são imprescindíveis, uma vez que propicia a inserção dos princípios científicos no cotidiano (CAVALCANTI, 2011; SCHALL, 2000). Estratégias de divulgação científica na área da saúde têm implicações diretas no aumento da confiança da população nos cientistas e em suas pesquisas. Desse modo, facilita a implementação de políticas públicas, contribuindo para a promoção, prevenção e controle de danos à saúde pública no nível individual e coletivo (BODISON *et al.*, 2015; DECCACHE-MAIA *et al.*, 2010; DE OLIVEIRA; DE SENZI ZANCUL, 2014; ROMANÍ *et al.*, 2018).

Vários autores já relataram experiências em divulgação científica na área da saúde, como Deccache *et al.* (2010), que criaram estratégias para aproximar os laboratórios da população em geral, principalmente crianças em idade escolar, em um programa itinerante que difunde informações sobre saúde e prevenção de doenças. As atividades do projeto são principalmente dirigidas às populações de baixa renda, nas quais as doenças infecciosas e parasitárias tendem a ser muito mais comuns, devido às condições sanitárias e de habitação inadequadas. Gaspar e Sopelete (2013) realizaram um trabalho que usam *podcast* e blog como forma de educação e divulgação científica a respeito dos temas alergia e leite materno, enfatizando principalmente pessoas com baixa acuidade visual.

4 EXEMPLOS DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA NA ÁREA DA SAÚDE

Gráficos

Para o público leigo, a principal presença de gráficos está na representação de estatísticas na vida cotidiana, comum em apresentações de dados de interesse geral em jornais e telejornais, livros didáticos e outros. Um exemplo atual de representação de dados em gráficos são as médias diárias e móveis de infecções/casos e mortes pela pandemia de COVID-19, causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave, SARS-CoV-2. A divulgação de informações científicas relacionadas a essa doença é extremamente importante para garantir a vigilância em saúde que seja eficaz e garanta a segurança da população (LANA *et al.*, 2020). Dessa forma, a apresentação dos dados da pandemia em gráficos para o grande público é uma forma eficaz de realizar essa difusão científica, uma vez que gráficos simplificam e permitem a apresentação de uma quantidade grande de dados.

Quadrinhos

Grassi e Ferrari (2009) usaram quadrinhos para introduzir o conceito sobre radioatividade na educação formal (disponível em: <https://bit.ly/3i45xmJ>). Tôrres *et al.* (2011) criaram histórias em quadrinhos sobre saúde bucal em uma Unidade de Saúde da Família (disponível em: <https://bit.ly/35x0J4n>). Fioresi e da Cunha (2020) conduziram alunos a criarem suas próprias histórias em quadrinhos, após realizarem leitura crítica de textos de DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA (Disponível em: <https://bit.ly/3shKFNT>). Cabello *et al.* (2010) desenvolveram uma cartilha usada na DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA para hanseníase, e de complementação às aulas de educação formal em ciências (disponível em: <https://bit.ly/3dxqWVk>).

Discurso jornalístico

Silva (2017) avaliou a temática dengue nos discursos dos jornais. Para isso, criou um diagrama do ciclo jornalístico sobre a dengue (disponível em: <https://bit.ly/3i7xIBw>). Oliveira (2010) analisou como conceitos científicos da área da saúde são abordados pela mídia (disponível em: <https://bit.ly/35GxMTH>). Luz *et al.* (2017) analisaram o papel simbólico das Biociências no imaginário de vida e saúde, apresentando resultados de uma pesquisa de observação de capas de revistas de DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA (disponível em: <https://bit.ly/35yAHxL>). Machado (2016) apresentou um estudo sobre a divulgação científica digital, focando as redes sociais (disponível em: <https://bit.ly/2KbHHcs>).

Ilustração

Rodrigues *et al.* (2009) apresentaram a coleção de obras raras da Biblioteca Professor Francisco Eduardo Rabello da Sociedade Brasileira de Dermatologia, criada para servir como referência nacional na área de dermatologia e preservar a memória institucional, com acervo composto por cerca de 2.250 volumes (disponível em: <https://bit.ly/39mDRFZ>). Morato (1998) avaliou as primeiras manifestações da ilustração científica na anatomia (disponível em: <https://bit.ly/3i5gMvt>).

Esquemas ilustrativos e *folders* usados em redes sociais, blogs e páginas diversas de internet

Esquema ilustrativos e *folders* são amplamente usados em redes sociais diversas, como, por exemplo, o *folder* “previna-se do câncer de boca”, com informações de como fazer autoexame (disponível em: <https://bit.ly/2Ls7Ggq>). *Folders* com dados relacionados ao novo coronavírus, passaram a ser recorrentes, em função da gravidade da pandemia, um exemplo é o portal da Fiocruz que rotineiramente desenvolvem material para circulação entre a popu-

lação (disponível em: <https://bit.ly/35GHuFG>). Outra ferramenta importante é o uso de mídias sociais para divulgação a divulgação científica como exemplos um perfil sobre fungos (disponível em: <https://bit.ly/3icBLfP>) e outro sobre tópicos científicos em geral (disponível em: <https://bit.ly/37GtGvT>).

5 ESTUDOS PARA FAIXA ETÁRIA

Vários trabalhos de divulgação científica também são produzidos com linguagem especialmente para crianças. Nesse contexto, a arte científica torna-se imprescindível uma vez que o universo infantil está intimamente ligado a imagens. Da Silva (2015) avaliou o uso cartilha de educação sexual no contexto infantil (disponível em: <https://bit.ly/2K3OiFA>). A Revista Hoje da Criança traz vários temas adaptados ao universo infantil (disponível em: <http://chc.org.br/>). Guia, cartaz e folheto produzidos pela Mauricio de Sousa Produções, em parceria com a UNICEF, com informações sobre o coronavírus e a Covid-19 (disponível em: <https://uni.cf/38Iof0c>).

6 COMBATENDO *FAKE NEWS* COM ARTE CIENTÍFICA E DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

Com o advento da Internet e das novas tecnologias, houve uma reestruturação do fluxo da comunicação científica, assim como das relações sociais no mundo (CASTRO, 2006; MENDES; DO ESPÍRITO SANTO, 2018). A desinformação científica é realmente um tema preocupante (SCHALL, 2000) e, com o avanço da propagação de informações pelas redes sociais, fica cada vez mais complicado navegar na internet sem se deparar com notícias falsas tomando conta do imaginário popular. *Fake News* dificultam o alcance de notícias verídicas, verdadeiramente científicas, que ficam em segundo plano, ofuscadas pela desinformação (CARVALHO; MATEUS, 2018). Para mudar esse cenário, é preciso o engajamento de especialistas focados em uma mobilização em prol da divulgação de infor-

mações estratégicas em uma linguagem palatável para todos (BARATA, 2015; DALLARI, 2018; OLIVEIRA, 2018).

Há, ainda, que atentar-se aos erros de conceitos implícitos em alguns materiais de divulgação como, por exemplo, o trabalho realizado por De Assis, Pimenta e Schall (2013), que analisaram impressos sobre dengue, em que foram detectados alguns erros de escalas ou conceitos (disponível em: <https://bit.ly/3bwxoLk>). Oliveira e Conduru (2004) analisaram uma série de desenhos científicos, feitos e impressos para compor um trabalho científico do Instituto Oswaldo Cruz, que foram julgados “errados” por cientistas (em função de coloração ou detalhes de estruturas) e, por isso, abandonados há mais de 70 anos (disponível em: <https://bit.ly/3ozCp9q>).

7 PUBLICAÇÕES DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA EM PERIÓDICOS

A divulgação científica está cada vez mais incorporada no meio acadêmico, dada a sua importância na construção de uma sociedade com pensamento mais crítico e participativo. Dentro desse contexto, podem-se citar vários trabalhos acadêmicos na área da saúde: Silva (2017), que discutiu Estratégias para a Divulgação Científica Sobre a Visão; Coelho (2010), que avaliou a exposição DSTs (MANO; GOUVEIA; PALMA, 2009), em dois formatos: impresso e digital, abordando o tema das doenças sexualmente transmissíveis e o uso da camisinha; Valente (2010), que avaliou a divulgação científica nas aulas de educação física escolar, com a possível contribuição para elaboração de novos materiais na área de fisiologia do exercício; Vilela (2010), que avaliou as representações sociais sobre a dengue na mídia impressa; Luiz (2003), que avaliou os significados e conteúdos da divulgação sobre risco epidemiológico nos jornais diários; Bousfield (2007), que avaliou a divulgação do conhecimento científico sobre aids e representações sociais. Há também inúmeros periódicos que dedicam parte de suas publicações a trabalhos realizados, usando metodologias de divulgação científica (Quadro 1).

Quadro 1 – Exemplos de periódicos dedicados a publicar sobre divulgação científica

Periódico (com hiperlink)	ISSN Impresso/ <i>On-line</i>	Missão
<u>International Journal of Science Education, Part B</u>	2154-8455/ 2154-8463	Comunicação e engajamento público que abordará a comunicação e o engajamento de indivíduos e grupos em relação a informações baseadas em evidências sobre a natureza, resultados e consequências sociais da ciência e tecnologia.
<u>Journal of Science Communication</u>	1824-2049 / -----	O JCOM publica pesquisas que exploram uma ampla gama de questões pertinentes à comunidade de comunicação científica, incluindo: questões de comunicação entre a ciência e os cidadãos e dentro da própria comunidade científica; desafios que surgem quando modelos de análise teórica ou meios práticos para popularizar a ciência são usados; a relação mutante entre ciência e instituições sociais; e as dimensões informativa, pedagógica, interpretativa e política da comunicação científica.
<u>Public Understanding of Science</u>	0963-6625 / 1361-6609	Publicação de artigos sobre a inter-relação entre a ciência e o público no contexto de diferentes sociedades. Considera-se as contribuições de uma variedade de disciplinas e perspectivas, como comunicação, estudos sociais da ciência, psicologia, filosofia e história da ciência e ciência política; também está aberto a contribuições baseadas na experiência prática. "Ciência" é entendida de uma forma ampla, incluindo ciências sociais e humanas, inovações tecnológicas e médicas e especialização científica em mudança climática, meio ambiente e saúde.

Periódico (com hiperlink)	ISSN Impresso/ <i>On-line</i>	Missão
<u>Revista Alexandria</u>	1982-5153 / -----	ALEXANDRIA é uma publicação do Programa de Pós-Graduação em Educação Científica e Tecnológica da UFSC. Seu objetivo principal é a divulgação de trabalhos de pesquisa na área de ensino de ciências e matemática. A revista aceita artigos originais, direcionados para o desenvolvimento da cidadania e para a teoria e prática que caracterizam o ensino das ciências. Isso inclui todos os níveis e fases da educação, tanto formal como não-formal, bem como a formação inicial e continuada de professores.
<u>Revista Ciência em tela</u>	1984-154X / -----	Ciência em Tela é uma revista eletrônica semestral vinculada à Rede de Investigação Divulgação e Educação em Ciências (RIDEC) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRI), cuja proposta vai ao encontro da reconhecida necessidade de estreitar relações e de divulgar ações desenvolvidas em espaços educativos formais e não formais, tais como universidade, escola, museus, centros de ciência, mídia, ONGs etc. A revista recebe submissões na forma de artigos de pesquisa, ensaios, relatos de experiência e de produção de material didático, valorizando a participação de professores da escola básica e do ensino superior, educadores que atuam em espaços não formais, cientistas, pesquisadores em ensino e divulgadores de ciência, tanto como autores quanto como pareceristas.

Periódico (com hiperlink)	ISSN Impresso/ <i>On-line</i>	Missão
<u>Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde</u>	----- / 1981-6278	A Recis tem como missão contribuir para a circulação do conhecimento acerca das interfaces entre os campos da comunicação, da informação e da saúde coletiva, a fim de estimular o debate científico nessas áreas e procurando, também, subsidiar, analisar e avaliar com qualidade e rigor políticas públicas de informação e comunicação relacionadas à saúde que privilegiem o fortalecimento do Sistema Único de Saúde como projeto democrático e locus de produção de saberes.
<u>Science Communication</u>	1075-5470 / 1552-8545	Periódico internacional e interdisciplinar de ciências sociais que examina tópicos como a natureza da perícia científica representada pela comunicação e os processos ou efeitos que caracterizam a comunicação da ciência em qualquer contexto. Ciência é amplamente definida para incluir ciência ambiental, ciência da saúde e tecnologia. A Comunicação Científica dá as boas-vindas a submissões de pesquisas empíricas de autores em todas as disciplinas relevantes (incluindo ciências sociais, humanas e as próprias ciências). Ambos os artigos de pesquisa qualitativa e quantitativa com base na teoria são aceitáveis. É dada preferência a artigos que preencham a lacuna entre teoria e prática e que serão de interesse em todas as disciplinas. Além da pesquisa revisada por pares, a Science Communication publica comentários que analisam questões e tendências no campo – sejam acadêmicos, profissionais ou relacionados a políticas – e um resumo periódico de novos livros no campo.

Fonte: Próprios autores (2021)

As métricas de formatação dos arquivos, número de autores, palavras, páginas, elementos diagramados, referências e demais constituintes de um artigo científico voltado para divulgação científica são consideravelmente mais técnicas e complexas de serem atendidas que nos demais tipos de publicação. Portanto, o cuidado deve ser dobrado ao estudar as instruções aos autores.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Intervenções de divulgação científica na área da saúde facilitam a implementação de políticas públicas, permitindo a promoção, a prevenção e o controle de danos à saúde pública. Imbuídos de uma temática tão rica e que não se esgota apenas nos conteúdos que trouxemos aqui, quiçá, tenhamos despertado o interesse do leitor para a temática da Arte Científica, que foi distribuída em duas abordagens complementares. A primeira, relativa à produção acadêmica, está, nesta parte, denominada. Na sequência, a segunda abordagem diz respeito à Arte Científica Como Ferramenta na Divulgação Científica.

Nesse conjunto de abordagens, teorias e conceitos sobre ilustração científica, foram apresentados dentro de um contexto de registro científico histórico ao longo da linha do tempo até a atualidade. Os aspectos técnicos da ilustração em documentos científicos seguiram o eixo temático metodológico do presente livro. Por esse motivo, tópicos sobre materiais, métodos, formas, erros, medidas corretivas e recomendações foram objetos constantemente contemplados.

REFERÊNCIAS

ALBAGLI, S. Divulgação científica: informação científica para cidadania. **Ciência da informação**, v. 25, n. 3, 1996. Disponível em: <https://bit.ly/3nyQG4X>. Acesso em: 11 jan. 2021.

BARATA, G. Em revisão: o impacto da produção científica brasileira para o Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 67, n. 4, p. 06-08, 2015. Disponível em: <https://bit.ly/3i3VNZE>. Acesso em: 11 jan. 2021.

Capítulo 24

A ARTE CIENTÍFICA COMO FERRAMENTA NA DIVULGAÇÃO

BODISON, S. C.; SANKARÉ, I.; ANAYA, H.; BOOKER-VAUGHNS, J.; MILLER, A.; WILLIAMS, P. Engaging the community in the dissemination, implementation, and improvement of health-related research. **Clinical and Translational Science**, v. 8, n. 6, p. 814-819, 2015. Disponível em: <https://bit.ly/3buTOWv>. Acesso em: 11 jan. 2021.

BUENO, W. C. **Jornalismo científico no Brasil: os compromissos de uma prática dependente**. 1984. Tese (Doutorado em Meios e Processos Audiovisuais) – Escola de Comunicações e Artes, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984.

BUENO, W. C. Jornalismo científico: conceitos e funções. **Ciência e Cultura**, v. 37, n. 9, p. 1420-1427, 1985.

BUENO, W. C. Comunicação científica e divulgação científica: aproximações e rupturas conceituais. **Informação & Informação**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2010.

CABELLO, K. S. A.; DE LA ROCQUE, L.; SOUSA, I. C. F. Uma história em quadrinhos para o ensino e divulgação da hanseníase. **Revista Ciências e Ideias** v. 9, n. 1, p. 225-41, 2010. Disponível em: <https://bit.ly/38xBQYg>. Acesso em: 11 jan. 2021.

CASTRO, R. C. Figueiredo. Impacto da Internet no fluxo da comunicação científica em saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 57-63, 2006. Disponível em: <https://bit.ly/38A7JPZ>. Acesso em: 16 jan. 2021.

CAVALCANTI, C. C. B.; PERSECHINI, P. M. Museus de Ciência e a popularização do conhecimento no Brasil. **Field Actions Science Reports**, n. 3, 2011. Disponível em: <https://bit.ly/3oALrTJ>. Acesso em: 12 jan. 2021.

DALLARI, S. G. O negócio da falsa ciência e o amplo acesso ao conhecimento científico. **Revista de Direito Sanitário**, v. 19, n. 2, p. 7-13, 2018. Disponível em: <https://bit.ly/2LGkqQ6>. Acesso em: 20 jan. 2021.

DA SILVA, F. M. **Como falar sexo-sexualidade-gênero para criança: A ciência nos manuais**. Intercom – Sociedade Brasileira de Estudos Interdisciplinares da Comunicação. XXXVIII Congresso Brasileiro de Ciências da Comunicação – Rio de Janeiro, RJ – 4 a 7/9/2015. Disponível em: <https://bit.ly/2K3OiFA>. Acesso em: 11 jan. 2021.

DE ASSIS, S. S.; PIMENTA, D. N.; SCHALL, V. T. Materiais impressos sobre dengue: análise crítica e opiniões de profissionais de Saúde e Educação sobre seu Uso. **Revista Brasileira de Pesquisa em Educação em Ciências**, v. 13, n. 3, p. 25-51, 2013. Disponível em: <https://bit.ly/3bwxoLk>. Acesso em: 11 jan. 2021.

DE CARVALHO, M. F. C.; MATEUS, C. A. Fake news e desinformação no meio digital: análise da produção científica sobre o tema na área de ciência da informação. **Múltiplos Olhares em Ciência da Informação**, v. 8, n. 2, p. 1-133, 2018. Disponível em: <https://bit.ly/3ozwelK>. Acesso em: 10 dez. 2020.

DE CASTRO, P.; MARSILI, D.; POLTRONIERI, E.; CALDERÓN, C. A. Dissemination of public health information: key tools utilised by the NECOBELAC network in Europe and Latin America. **Health Information & Libraries Journal**, v. 29, n. 2, p. 119-130, 2012. Disponível em: <https://bit.ly/2LBpvct>. Acesso em: 10 dez. 2020.

DECCACHE-MAIA, E.; PIRES-SANTOS, G. M.; FONTES, A. M. S.; FERNANDES, T.; CASTRO MELO, A. P.; TRÜEB, I.; VIEIRA, A. do C.; GONÇALVES, G. R. C. S.; PAIXÃO, I.; ALBERGARIA, I.; VANNIER-SANTOS, M. A. Science popularization for preventing endemic diseases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. Suplemento 2, p. 18-23, 2010. Disponível em: <https://bit.ly/3bwu5ng>. Acesso em: 14 dez. 2020.

DE OLIVEIRA, L. L.; DE SENZI ZANCUL, M. Textos de divulgação científica nas aulas de biologia na Educação de Jovens e Adultos (EJA) para abordar a temática alimentação. **Revista Práxis**, v. 6, n. 11, p. 53-63, 2014. Disponível em: <https://bit.ly/3sgrbJj>. Acesso em: 14 dez. 2020.

FIORESI, C. A.; DA CUNHA, M. B. A leitura de textos de divulgação científica e a produção de histórias em quadrinhos. **Revista Areté| Revista Amazônica de Ensino de Ciências**, v. 12, n. 26, p. 01-15, 2020. Disponível em: <https://bit.ly/3shKFNT>. Acesso em: 12 dez. 2020.

GASPAR, J. A.; SOPELETE, M. C. Divulgação científica em saúde e inclusão: campo de atuação docente e discente. In: **Anais do Encontro de Pesquisa em Educação e Congresso Internacional de Trabalho Docente e Processos Educativos**. 2013. p. 76-87. Disponível em: <https://bit.ly/38A80SZ>. Acesso em: 12 dez. 2020.

GERMANO, M. G. Popularização da ciência como ação cultural libertadora. **Colóquio Internacional Paulo Freire**, v. 5, p. 1-18, 2005.

GERMANO, M. G.; KULESZA, W. A. Popularização da ciência: uma revisão conceitual. **Caderno Brasileiro de Ensino de Física**, v. 24, n. 1, p. 7-25, 2007. Disponível em: <https://bit.ly/3sfysJo>. Acesso em: 06 dez. 2020.

GRASSI, G.; FERRARI, P. C. A Linguagem dos quadrinhos no Estudo da Radioatividade no Ensino Médio: O Acidente com o Césio-137 em Goiânia, 20 anos depois. **XVIII Simpósio Nacional de Ensino de Física-SNEF**, 2009. Disponível em: <https://bit.ly/3i45xmJ>. Acesso em: 06 dez. 2020.

KEMPER, A.; ZIMMERMANN, E. Textos populares de divulgação científica como ferramenta didático-pedagógica: o caso da evolução biológica. **Revista Brasileira de Pesquisa em Educação em Ciências**, v. 10, n. 3, p. 25-50, 2010. Disponível em: <https://bit.ly/3q3wdaa>. Acesso em: 12 dez. 2020.

LORDÊLO, F. S.; DE MAGALHÃES PORTO, C. Divulgação científica e cultura científica: conceito e aplicabilidade. **Revista Ciência em Extensão**, v. 8, n. 1, p. 18-34, 2012. Disponível em: <https://bit.ly/38xH5Hq>. Acesso em: 12 fev. 2021.

LUZ, M. T.; FERLA, A. A.; MACHADO, A. D. S.; ALBA, R. D. Rhetoric on scientific dissemination of life and health imagery: a proposal for methodological analysis. **Interface-Comunicação, Saúde, Educação**, v. 21, p. 333-347, 2016. Disponível em: <https://bit.ly/35yAHxL>. Acesso em: 12 fev. 2021.

MACÍAS-CHAPULA, C. A. Hacia un modelo de comunicación en salud pública en América Latina y el Caribe. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 18, p. 427-438, 2005. Disponível em: <https://bit.ly/3qbFBsl>. Acesso em: 12 fev. 2021.

MACHADO, F. S. A divulgação científica e o enunciado digital. **Bakhtiniana: Revista de Estudos do Discurso**, v. 11, n. 2, p. 93-110, 2016. Disponível em: <https://bit.ly/2KbHHcs>. Acesso em: 12 fev. 2021.

MENDES, M. S. de O.; DO ESPÍRITO SANTO, R. A. Instagram: a relevância dos recursos multimídia. **Movendo Ideias**, v. 21, n. 1, p. 27-31, 2018. Disponível em: <https://bit.ly/39lSOoRQ>. Acesso em: 10 out. 2020.

MORATO, M. A.; STRUCHINER, M.; BORDONI, E.; RICCIARDI, R. M. V. Representação visual de estruturas biológicas em materiais de ensino. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 5, n. 2, p. 415-433, 1998. Disponível em: <https://bit.ly/3i5gMvt>. Acesso em: 10 out. 2020.

OLIVEIRA, A. J. S.; OLIVEIRA, C. B. M. Island of Science Laboratory: Scientific Divulgarion with Vector for Popularization of Science. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 7, n. 5, p. 10-16, 2020. Disponível em: <https://bit.ly/3qcMIAQ>. Acesso em: 10 out. 2020.

OLIVEIRA, L.; CRIBB, S.; RAMOS, G.; ROCHA, P.; MENDONÇA, L. A divulgação científica de temas de saúde: análise de um impresso. **Rio de Janeiro, Ciência em Tela**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2010. Disponível em: <https://bit.ly/35GxMTH>. Acesso em: 10 out. 2020.

OLIVEIRA, R. L. D.; CONDURU, R. Nas frestas entre a ciência e a arte: uma série de ilustrações de barbeiros do Instituto Oswaldo Cruz. **História, Ciências, Saúde**, v. 11, n. 2, p. 335-384, 2004. Disponível em: <https://bit.ly/3ozCp9q>. Acesso em: 10 out. 2020.

PORTO, C. de M.; MORAES, D. de A. Divulgação científica independente na Internet como fomentadora de uma cultura científica no Brasil: estudo inicial em alguns Blogs que tratam de ciência. *In: Encontro de Estudos Multidisciplinares em Cultura, Faculdade de Comunicação/UFBA, Salvador, Bahia*, p. 93-112, 2009. Disponível em: <https://bit.ly/2K58lUa>. Acesso em: 25 out. 2020.

RODRIGUES, J. G.; COSTA, I. M. C.; LEITE, R.; SOARES, R. Acervo raro da Sociedade Brasileira de Dermatologia: considerações sobre sua preservação histórica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 1, p. 93-95, 2009. Disponível em: <https://bit.ly/39mDRFZ>. Acesso em: 25 out. 2020.

ROMANÍ, F; PARIASCA, J.C; MADRI, J.A.; HERRERA, D.E. Disseminação científica no campo da saúde pública. A experiência do Instituto Nacional de Saúde. **Revista Peruana de Medicina Experimental e Saúde Pública**. v. 35, n. 3, p. 515-522. 2018. Disponível em: <https://bit.ly/2LmYgmd>. Acesso em: 25 out. 2020.

SAGAN, C. **O mundo assombrado pelos demônios: a ciência vista como uma vela no escuro**. Editora Companhia das Letras, 2006. Disponível em: <https://bit.ly/3qbbXUa>. Acesso em: 25 out. 2020.

SCHALL, V. Educação científica e popularização da ciência na área biomédica: seu papel para o futuro da ciência e da sociedade. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 71-77, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000700014>. Acesso em: 13 nov. 2020.

SILVA, N. D. **Divulgação científica e saúde: o ciclo jornalístico dos discursos sobre dengue nos jornais Folha de S. Paulo, O Globo, Meio Norte e O Dia**. 2017. Dissertação (Mestrado em Divulgação Científica e Cultural) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Estudos da Linguagem, Campinas, 2017. Disponível em: <https://bit.ly/3i7xIBw>. Acesso em: 13 nov. 2020.

TÔRRES, L. H. do N.; PAULA, J. S. de P.; SOUSA, M. L. R.; MIALHE, F. L. Histórias em quadrinhos na sala de espera: um método de educação em saúde bucal. **Odontologia Clínico-Científica (Online)**, v. 10, n. 1, p. 69-72, 2011. Disponível em: <https://bit.ly/35x0J4n>. Acesso em: 15 out. 2020.



SOBRE OS AUTORES

ADAMIANE SILVA MORAES SCHWAICKARDT – Biomédica, especialista em Acupuntura (Faculdade Leão Sampaio – ABA) e Estética Facial e Corporal (UNOPAR). Mestranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: adamianemoraes@hotmail.com.

ALINE DE FÁTIMA BONETTI – Farmacêutica, especialista em Atenção Hospitalar e Farmácia Clínica, com ênfase em Cardiologia, pelo Complexo do Hospital de Clínicas (UFPR) (Programa de Residência Multiprofissional). Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) e doutoranda em Ciências Farmacêuticas pela UFPR. Professora substituta de Atenção Farmacêutica do curso de graduação em Farmácia da UFPR. Professora e coordenadora da tutoria do Curso de Capacitação Cuidado Farmacêutico no SUS do Conselho Federal de Farmácia (CFF). E-mail: alinefbonetti@gmail.com.

ALINE FERNANDES BARCELOS – Graduada em Química modalidade licenciatura, técnica em Química pelo Centro de Educação Profissional de Anápolis e mestranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: fernandesbaline@gmail.com.

ALLINY DAS GRAÇAS AMARAL – Zootecnista (PUCGO), mestre e doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Pós-doutora em Zootecnia (UFG). Docente do curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Central – Anápolis-GO. Docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Produção Animal e Forragicultura (PAF) da Universidade Estadual de Goiás. E-mail: alliny.amaral@ueg.br.

AMANDA DOS REIS CORREIA – Biomédica, especialista em Anatomia e Patologia Associada (AVM Educacional), Gestão e Biossegurança em Estética e Cosmética (UEG), Biomedicina Estética (Faculdade Unyleya) e mestranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás. E-mail: amanda.dosreiscorreia@gmail.com.

AMANDA SCHMALTZ – Graduada em Química Industrial, mestranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: a.schmaltz_7@hotmail.com.

ANA CAROLINE DE SOUZA BARNABÉ – Médica Veterinária, mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás (UFG) e doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Atualmente, realiza estágio

pós-doutoral no Laboratório de Virologia Aplicada do Instituto de Biologia da UNICAMP. E-mail: sbanacaroline@gmail.com.

ANA PAULA DE MORAES – Graduação em andamento em Ciências Biológicas modalidade licenciatura (PUC-Campinas). Colaboradora do Laboratório de Virologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). E-mail: anapaulasnb@gmail.com.

ANDREIA JULIANA RODRIGUES CALDEIRA – Graduada em Ciências Biológicas, mestre em Biologia pela Universidade Federal de Goiás (UFG), doutora em Agronomia pela Universidade Federal de Goiás (UFG) e pós-doutora em Divulgação Científica pela Faculdade de Ciências da Universidade do Porto – Portugal. Docente dos cursos de graduação em Ciências Biológicas e Farmácia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Central – Anápolis-GO. E-mail: andreiajuliana@ueg.br.

ANTÔNIO CARLOS SEVERO MENEZES – Químico industrial, mestre em Química Orgânica pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), doutor e pós-doutor em Química pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Docente dos cursos de graduação em Química Industrial e Química Licenciatura da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Central – Anápolis-GO. Docente dos Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) e Ciências Moleculares (PPGCM) da Universidade Estadual de Goiás. E-mail: antonio.menezes@ueg.br.

ARISTÔNIO MAGALHÃES TELES – Graduado em Ciências Biológicas, modalidade licenciatura, mestre em Botânica pela Universidade de Brasília (UnB) e doutor em Biologia Vegetal pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Realizou Pós-doutorado no Herbário do Jardim Botânico Real de Kew, no

Reino Unido, e no Herbário do Museu Nacional de História Natural em Paris, na França, como parte do Programa Re flora do CNPq. Atualmente, é Professor Associado e Chefe do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Goiás.

E-mail: teles@ufg.br.

CARLOS EDUARDO LACERDA RAMALHO – Farmacêutico, especialista em Gestão Pública e Qualidade (UNITINS), Gestão da Assistência Farmacêutica (UFSC), Farmácia e Química Forense (PUCGO). Mestrando do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

E-mail: cadullacerda@gmail.com.

CIBELLE KAYENNE MARTINS ROBERTO FORMIGA – Fisioterapeuta, especialista em Fisioterapia Neurológica pela Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), especialista em Cinesioterapia (UEPB), mestre em Educação Especial pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), doutora em Ciências Médicas pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP), pós-doutora pela FMRP-USP e pela Vrije University Amsterdam (Holanda). Docente do curso de graduação em Fisioterapia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Unidade Universitária de Goiânia – ESEFFEGO, Goiânia-GO. Docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás.

E-mail: cibelle.formiga@ueg.br.

CLAUDIA CRISTINA GARCIA MARTIN-DIDONET (*in memoriam*) – Graduada em Ciências Biológicas, mestre em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), doutora e pós-doutora em Ciências (Bioquímica) pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Atuou como docente dos cursos de

graduação em Farmácia e Química Industrial da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Central – Anápolis-GO. Docente credenciada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás nos anos de 2014 a 2020.

CRISTIANE ALVES DA FONSECA DO ESPÍRITO SANTO – Farmacêutica e Bioquímica, especialista em Saúde da Família pela Faculdade de Enfermagem (UFG) e mestre em Biologia pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Atualmente, trabalha na Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia e é docente dos cursos de graduação em Farmácia e Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Central – Anápolis-GO.
E-mail: tinina3@gmail.com.

DANIELLE COELHO DA CRUZ – Graduada em Química modalidade licenciatura, especialista em Metodologia de Ensino da Química na Universidade Gama Filho, mestranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG).
E-mail: coelhodacruz2012@hotmail.com.

DEBBORAH GONÇALVES BEZERRA – Farmacêutica, mestre em Recursos Naturais do Cerrado pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Recursos Naturais do Cerrado (RENAC) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). Doutoranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Recursos Naturais do Cerrado (RENAC) da Universidade Estadual de Goiás.
E-mail: debborah.b@gmail.com.

ELIETE SOUZA SANTANA – Médica Veterinária, mestre e doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás (UFG), com doutorado sanduíche pela Universidade de Murcia (Espanha) e pós-doutora pela UFG. Docente do curso de graduação

em Farmácia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Central – Anápolis-GO. Coordenadora do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás nos anos 2018 a 2020.

E-mail: elietessouza@yahoo.com.br.

ELIZABETH DE FÁTIMA LOPES DA ROCHA – Esteticista e cosmetóloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

E-mail: lizaflr65@gmail.com.

FLÁVIO MONTEIRO AYRES – Graduado em Ciências Biológicas modalidade Médica, mestre em Biologia pela Universidade Federal de Goiás (UFG) e doutor em Ciências Médicas e Dentais pela Universidade de Niigata (Japão). Docente dos cursos de graduação em Fisioterapia e Educação Física da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Unidade Universitária de Goiânia – ESEFFEGO, Goiânia-GO. Docente e atual Coordenador do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás.

E-mail: flavio.ayres@ueg.br.

FRANCISCO JÚNIOR SIMÕES CALAÇA – Graduado em Ciências Biológicas modalidade licenciatura, mestre em Ciências Ambientais pela Universidade de Brasília (UnB), doutorando do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Recursos Naturais do Cerrado (RENAC) da Universidade Estadual de Goiás.

E-mail: calacafjs@gmail.com.

GRACIELLE OLIVEIRA SABBAG CUNHA – Graduada em Química modalidade licenciatura, mestre em Ciências Moleculares pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências

Moleculares (PPGCM) da Universidade Estadual de Goiás (UEG) e doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Química em associação UFGD/UFCAT/UEG.

E-mail: graciellesabbag@gmail.com.

IARA BARBOSA CABRAL – Enfermeira. Graduação em andamento em Educação Física na modalidade bacharelado pela Universidade Estadual de Goiás (UEG) – Unidade Universitária de Goiânia – ESEFFEGO.

E-mail: iarabcabral@gmail.com.

JOSANA DE CASTRO PEIXOTO – Graduada em Ciências Biológicas modalidades bacharelado e licenciatura, mestre e doutora em Biologia pela Universidade Federal de Goiás. Pós-doutora pela Universidade Federal de Goiás em parceria com o Programa en Biología y Ecología Aplicada na Universidad de La Serena, Chile. Docente do curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Central – Anápolis-GO. Docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Territórios e Expressões Culturais do Cerrado (TECCER) da Universidade Estadual de Goiás. Ainda atua no Centro Universitário de Anápolis (UniEVANGÉLICA) como docente e diretora do curso de graduação em Ciências Biológicas e no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente (PPGSTMA) da UniEVANGÉLICA.

E-mail: josana.peixoto@gmail.com.

JOSIEL ARAUJO LEMES – Graduado em Ciências Biológicas, mestrando em Ciências Ambientais pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente (PPGSTMA) do Centro Universitário de Anápolis (UniEVANGÉLICA). Acadêmico do Instituto Federal de Goiás (IFG) no curso de Agente de Desenvolvimento Socioambiental.

E-mail: josiel.lemes@outlook.com.

JULIANE GUIMARÃES DE CARVALHO – Odontóloga, especialização em dentística (HRAC-USP), mestre e doutora em Biologia Oral pela Faculdade de Odontologia de Bauru (USP). Docente do curso de Odontologia no Centro Universitário de Anápolis-UniEVANGÉLICA. Docente colaboradora do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Odontologia da UniEVANGÉLICA. E-mail: juguima30@gmail.com.

JOELMA ABADIA MARCIANO DE PAULA – Farmacêutica, mestre e doutora em Biologia pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Realizou estágio pós-doutoral em Inovação Farmacêutica pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Docente do curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Central – Anápolis-GO. Docente dos Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) e Recursos Naturais do Cerrado (RENAC) da Universidade Estadual de Goiás. E-mail: joelma.paula@ueg.br.

KAMILA SOUTO LEICHTWES – Graduada em Ciências Biológicas modalidade licenciatura, mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). Doutoranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Morfológicas (PPGCM) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). E-mail: kamilaleichtweis@hotmail.com.

KARINA FREIRE d'EÇA NOGUEIRA SANTOS – Graduada em Ciências Biológicas, mestre em Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás (UFG) e doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) com período sanduíche pela Universidade de Missouri – EUA. Pós-doutora em Bioquímica pela Universidade

Federal do Paraná (UFPR) e atualmente é bolsista do Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD – CAPES) do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: kabiomol@gmail.com.

LEONARDO LUIZ BORGES – Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás e doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de Brasília. Docente do curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Central – Anápolis-GO e professor Adjunto I da Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUCGO). Docente dos Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em Recursos Naturais do Cerrado (RENAC-UEG) e em Ciências Ambientais e Saúde (MCAS) da PUC Goiás.

E-mail: leonardo.borges@ueg.br.

LORENA LISITA INÁCIO TEODORO – Farmacêutica Bioquímica, especialista em Saúde Estética (Universidade de Uberaba), MBA em Marketing (FGV), especialista em Fitoterapia pela Faculdade de Farmácia (UFG), especialista em Cosmetologia pela Faculdade Oswaldo Cruz, especialista em Controle de Qualidade de Medicamentos, Cosméticos e Correlatos pela Faculdade de Farmácia (UFG). Mestranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). Atualmente é docente na Faculdade Metropolitana de Anápolis (FAMA).

E-mail: lorenalisita@hotmail.com.

LUCAS HENRIQUE FERREIRA SAMPAIO – Biomédico, mestre e doutor em Medicina Tropical pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e pós-doutor em Engenharia Genética Aplicada a Imunologia (vaci-

nologia) pela University of Washington (USA). Docente do curso de graduação em Estética e Cosmética da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Unidade Universitária de Goiânia – Laranjeiras, Goiânia-GO. Docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás.

E-mail: lucas.sampaio@ueg.br.

LUCIANA REBELO GUILHERME – Graduada em Ciências e Química modalidade licenciatura, mestre em Química pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), doutora em Química pelo Instituto de Química (UNESP – Araraquara) e pós-doutora pelo Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales, CICBIOMAGUNE (Espanha). Docente dos cursos de graduação em Farmácia, Química Licenciatura e Química Industrial da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Central – Anápolis-GO. Docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás.

E-mail: luciana.guilherme@ueg.br.

MARIA TERESA FREITAS BARA – Farmacêutica Bioquímica, especialista em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), mestre em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa e doutora em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) pela Universidade de Brasília. É professora titular aposentada da Universidade Federal de Goiás (UFG). Fundou o Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN/FF/UFG), do qual foi coordenadora por 24 anos. Foi coordenadora da Farmácia Escola-UFG e do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (LCQM/FF-UFG). Atuou como Coordenadora do Curso de Farmácia/UFG, Vice-Diretora e Diretora da Fac. de Farmácia/UFG.

E-mail: mtbara@gmail.com.

MARIELLY CARVALHO – Graduada em Ciências Biológicas modalidade licenciatura, mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). Doutoranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).
E-mail: mary_28carvalho@hotmail.com.

MARTINA ESTEVAM BROM VIEIRA – Fisioterapeuta, especialista em Fisioterapia, em Pediatria e Neonatologia pela Universidade São Marcos, mestrado e doutorado em Ciências (Saúde Mental) pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Docente do curso de graduação em Fisioterapia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Unidade Universitária de Goiânia – ESEFFEGO, Goiânia-GO.
E-mail: martinabrom@gmail.com.

MICHELLE RIBEIRO SILVA – Farmacêutica, mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG).
E-mail: mi_ribeirosilva@hotmail.com.

OLIRA SARAIVA RODRIGUES – Graduada em Letras, mestre em Educação pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUCGO) e doutora em Arte e Cultura Visual pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Pós-doutorado em Estudos Culturais pelo Programa Avançado de Cultura Contemporânea da Faculdade de Letras da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e no Departamento de Ciências da Comunicação e da Informação da Faculdade de Letras da Universidade do Porto – Portugal. Docente da Universidade Estadual de Goiás (UEG).
E-mail: olira.rodrigues@ueg.br.

PABLINE DA SILVA GASPAROTI – Farmacêutica e técnica em Química Industrial pela Faculdade de Tecnologia Senai Roberto Mange. Mestranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

E-mail: pablinegasparoti@gmail.com.

PATRÍCIA PAULA DA SILVA XAVIER – Farmacêutica, mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

E-mail: patriciapsx@gmail.com.

PLÍNIO LÁZARO FALEIRO NAVES – Graduado em Ciências Biológicas modalidade Médica, mestre em Medicina Tropical pela Universidade Federal de Goiás (UFG), doutor em Microbiologia pela Universidade Complutense de Madrid (Espanha) e pós-doutor pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Docente do curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Central – Anápolis-GO. Docente dos Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) e Ciências Moleculares (PPGCM) da Universidade Estadual de Goiás.

E-mail: plinionaves@ueg.br.

REUBER MENDES ROCHA – Odontólogo, mestrando do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

E-mail: reuber.mr@gmail.com.

ROBERTA CARNEIRO TOLEDO – Fisioterapeuta, Especialista em Fisioterapia Hospitalar com Ênfase em Terapia Intensiva (Instituto Educacional CDCS) e em Gestão e Biossegurança em

Estética e Cosmética (UEG). Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

E-mail: robertatoledo0894@gmail.com.

ROBERTA SIGNINI – Graduada em Química, mestre e doutora em Química (Físico-Química) pela Universidade de São Paulo. Docente dos cursos de graduação em Farmácia, Química Licenciatura e Química Industrial da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Central – Anápolis-GO. Docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Moleculares (PPGCM) da Universidade Estadual de Goiás.

E-mail: robertasignini@ueg.br.

TÂNIA CRISTINA DIAS DA SILVA HAMU – Fisioterapeuta, especialista em Análise e Terapêutica do Movimento Humano aplicada à Fisioterapia (UEG) e Docência Universitária (PUCGO). Mestre e doutora em Ciências da Saúde pela Universidade de Brasília (UnB), pós-doutora em Engenharia Elétrica e da Computação pela Universidade Federal de Goiás. Docente do curso de graduação em Fisioterapia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Unidade Universitária de Goiânia – ESEFFEGO, Goiânia-GO.

E-mail: tania.ft@gmail.com.

VALDIRENE NEVES MONTEIRO – Farmacêutica Bioquímica, mestre e doutora em Biologia pela Universidade Federal de Goiás (UFG) e pós-doutora pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Docente do curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Central – Anápolis-GO. Docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás.

E-mail: valdirene.neves@ueg.br.

VANESSA CRISTIANE SANTANA AMARAL – Farmacêutica Bioquímica, mestre em Biologia pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa Interinstitucional em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e Universidade Estadual Paulista (UNESP) Júlio de Mesquita Filho e pós-doutora em Neuropsicofarmacologia pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) Júlio de Mesquita Filho. Docente do curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Central – Anápolis-GO. Docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás. E-mail: vanessa.cristiane@ueg.br.

SOBRE O LIVRO

Formato: 16 x 23 cm

Tipologia: Minion Pro

Número de Páginas: 568

Suporte do livro: E-book

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS

BR-153 – Quadra Área, Km 99 – 75.132-903 – Anápolis-GO

www.ueg.br / Fone: (62) 3328-1181

2022

Impresso no Brasil / Printed in Brazil



A importância do livro que está nas mãos do leitor não diz respeito apenas ao seu conteúdo explícito, mas sobretudo ao desafio que traz aos pesquisadores, desviando-os da estrada de trânsito fácil pavimentada pela formação de zonas de saber independentes que criam núcleos autárquicos. Assim, as ações do pesquisador, antes restritas a forma autônoma e isolada de seu laboratório, se veem interpenetradas por outros conhecimentos que podem amplificar seu alcance científico e social uma vez que seus resultados são de interesse da sociedade, em última instância.

Lenise Arneiro Teixeira



ISBN: 978-65-88502-14-3