



Revista da 

# Biologia

Volume 17

[ib.usp.br/revista](http://ib.usp.br/revista)

Julho 2017



## Revista da Biologia

Publica textos de todas as áreas da Biologia, abordando questões gerais (ensaios, revisões e comentários) e específicas (artigos experimentais originais, descrição de técnicas e resumos expandidos).

Há espaço também para perspectivas pessoais sobre questões biológicas com relevância social e política (opinião).

A Revista da Biologia é gratuita e exclusivamente on-line. Sua reprodução é permitida para fins não comerciais.

**ISSN1984-5154**

**[www.ib.usp.br/revista](http://www.ib.usp.br/revista)**

## Contato

[revistadabiologia@gmail.com](mailto:revistadabiologia@gmail.com)

### Revista da Biologia

Rua do Matão, trav. 14, 321  
Cidade Universitária, São Paulo  
São Paulo, SP Brasil  
CEP 05508-090

## Volume 17

Publicado em Agosto de 2017



**Ilustrações da capa:** Bruna Soares Landeira (Natal/RN, julho de 2016).

Bruna é Licenciada em Ciências Biológicas, Mestra e Doutora em Neurociências pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Atualmente faz pós-doutorado em Neurociências no Instituto do Cérebro da UFRN com pesquisada baseada em biologia celular.

A imagem da capa consiste em Cultura primária de neurônios corticais (em vermelho) e neurônios que receberam o vírus com a proteína fluorescente verde (GFP). Em azul encontramos a marcação dos núcleos celulares.

## Expediente do volume

### Editor Executivo

Gilberto Xavier

### Editores

Arthur S. C. França

Bryan Souza

Daniela Soltys

Pedro Brisola Constantino Correa

Renato Massaaki Honji

Rodrigo Pavão

### Editor gráfico

Renato Massaaki Honji

### Editor de Seção

Carlos Vilela

Arthur S.C. França

### Consultores científicos

Anônimos

# Volume 17

## Índice

- Análises citológicas do inseticida Deltametrina usando o Teste de Micronúcleo 1**  
Cytological analysis of Deltamethrin insecticide using the Micronucleus Test  
*Luciane Gomes de Carvalho; Flávio Flores Britto; Maria Aparecida Marin-Morales; Eliane Mariza Dortas Maffei*
- Análise da eficácia de dois protocolos de treinamento físico no desempenho motor de ratos 6**  
Analysis of the efficacy of two physical training protocols in the motor performance of rats  
*Bruna A. Cândido; Bruno M. Gomes; Vinícius R. Cota; Alessandro de Oliveira; Laila C. M. Damázio*
- Avanços tecnológicos na criopreservação de células-tronco e tecidos, aplicados à terapia celular 13**  
Technological advances in the cryopreservation of stem cells and tissues, applied to cellular therapy  
*Artur Alves Rodrigues da Silva; Cláudio Gabriel Rodrigues; Marcia Bezerra da Silva*
- Adaptação de método de levantamento fitossociológico para determinação da biodiversidade de organismos bentônicos de costões rochosos 19**  
Adaptation of a phytosociological survey method to determine the biodiversity of benthic organisms of rocky coastlines  
*Bruna Roberta Toillier; Daiane Cristina de Moura; Jéssica Severo Ferreira; Karla Puntel Rosa*

# Análises citológicas do inseticida Deltametrina usando o Teste de Micronúcleo

## Cytological analysis of Deltamethrin insecticide using the Micronucleus Test

Luciane Gomes de Carvalho<sup>1</sup>; Flávio Flores Britto<sup>1</sup>; Maria Aparecida Marin-Morales<sup>2</sup>; Eliane Mariza Dortas Maffei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Naturais/Laboratório de Citogenética, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, CEP 45083-900, Vitória da Conquista-Bahia, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia/Instituto de Biociências/Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", CEP 13506-900, Rio Claro-São Paulo, Brasil.

\*Contato: elianemaffei@yahoo.com.br

**Resumo.** O teste do micronúcleo (MN) é um ensaio *in vivo* utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos. Nesse trabalho, avaliamos os efeitos genotóxicos e mutagênicos induzidos por diferentes concentrações do inseticida Deltametrina em cebola (*Allium cepa*) pelo teste de MN. No tratamento controle negativo a divisão mitótica foi normal. No entanto, em todos os tratamentos testados com as diferentes concentrações do inseticida foram observadas AC (aberrações cromossômicas) e formação de MN. Para a análise estatística foi feito o teste não paramétrico de Correlação de Spearman. O valor de  $r = 0,968$  evidencia que a correlação foi perfeitamente positiva, ou seja, quanto maior a concentração, maior foi o número de MN, confirmando que o efeito é dependente da dose do inseticida.

**Palavras-chaves.** *Allium cepa*, micronúcleo, broken-egg

Recebido:  
14dez2015  
Aceito:  
16ago2016  
Publicado:  
25ago2017

**Abstract.** The micronucleus test (MN) is a widely used *in vivo* screening test to detect clastogens and aneugens. In the present work, the genotoxic and mutagenic effects induced by different concentrations of the insecticide Deltamethrin by applying the MN test in onion (*Allium cepa*) were assessed. Cells in the negative control treatment exhibited normal mitotic division. However, CAs (chromosome aberrations) and micronuclei formation were observed at all tested concentrations of the insecticide. The statistical analysis was performed using the Spearman nonparametric correlation test. The  $r = 0.968$  value showed that the correlation was strongly positive, i.e., the number of micronuclei increased as the concentration of insecticide increased, confirming that the effect was dose-dependent.

**Keywords.** *Allium cepa*, micronucleus, broken-egg

Editado por Carlos Vilela e revisado por Anônimo

### Introdução

Agentes clastogênicos (promotores de quebras cromossômicas) ou aneugênicos (indutores de aneuploidia ou promotores de segregação cromossômica anormal) podem ser detectados, em uma primeira abordagem, pelo Teste do Micronúcleo (Heddle, 1973). Este teste é internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendados para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial. Os micronúcleos são formações globulares de DNA, originados a partir de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros, não incorporados ao núcleo da célula filha ao final do processo de divisão celular (Fenech *et al.*, 1999). O Teste de Micronúcleos foi desenvolvido inicialmente em eritrócitos de medula óssea de camundongos (Takahashi *et al.*, 2004). A espécie *Allium cepa*

(cebola) tem sido utilizada como organismo teste em diversos trabalhos, com o objetivo de identificar químicos potencialmente genotóxicos e mutagênicos (Matsumoto *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2007; Caritá e Marin-Morales, 2008; Leme e Marin-Morales, 2008). As células dos meristemas radiculares dessa espécie apresentam características que as tornam um eficiente material para estudos citogenéticos, sendo indicadas para ensaio de mutações cromossômicas induzidas por poluentes ambientais (Ateeq *et al.*, 2002).

O inseticida Deltametrina é um biocida sintético, pertencente ao grupo químico piretroide, amplamente utilizado no Brasil, destacando-se o uso na agricultura, em produtos veterinários, no controle de insetos domésticos, e em saúde pública, principalmente no controle de vetores. Apresenta um amplo espectro de atividade, ação rápida, eficiência em baixa dose, baixo poder residual e, adicionalmen-

te, é praticamente atóxico para mamíferos, quando comparado a outros inseticidas. Embora a literatura relate baixa toxicidade para mamíferos, as pesquisas toxicológicas recentes, apontam que os piretroides estão entre os pesticidas mais tóxicos para organismos aquáticos, tais como peixes, crustáceos e insetos como abelhas (Santos *et al.*, 2007). No entanto, o uso indiscriminado de piretroides pode afetar drasticamente o equilíbrio já precário do meio ambiente, requerendo seu monitoramento pelas análises de seus resíduos e de seus efeitos (Barrionuevo e Lancas, 2001).

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos induzidos por diferentes concentrações do inseticida Deltametrina, grupo químico piretroide sintético, avaliando células meristemáticas de *A. cepa* pelo Teste de Micronúcleos (MN). Investigamos também o efeito dose-resposta do inseticida Deltametrina na indução de micronúcleos.

## Material e Métodos

Os ensaios foram realizados no laboratório de Citogenética da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Para a avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos foram utilizadas sementes de *A. cepa* variedade Baia Periforme que foram acondicionadas em placas de Petri e forradas com papel filtro de germinação. O experimento foi conduzido contendo cinco tratamentos com três repetições cada. O tratamento T1 foi o controle negativo montado com água destilada e 10 sementes em cada placa de petri, totalizando 30 sementes por tratamento. Os outros tratamentos foram realizados com diferentes concentrações de Deltametrina: T2 a 0,4%; T3 a 0,8% (dose recomendada); T4 a 1,6% e T5 a 3,2% e adicionou-se as 10 sementes em cada placa de petri. A germinação se deu em temperatura de

25°C, as raízes foram coletadas com 1 cm de comprimento, fixadas em Carnoy (3:1, etanol:ácido acético) e armazenadas a 2°C. As pontas das raízes foram coradas pelo método de Feulgen (Mello e Vidal, 1978). As lâminas foram preparadas para análise microscópica por esmagamento das pontas de raiz com carmim acético 2% e montadas permanentes com bálsamo do Canadá. A análise dos MN foi feita contando 1.000 células interfásicas por indivíduo, totalizando 3.000 células por tratamento e 15.000 células em todo o experimento. Como critério de inclusão para a análise consideramos as células com as membranas citoplasmáticas intactas. Os micronúcleos não excederam mais do que 1/3 do tamanho do núcleo. Para análise estatística utilizou-se o programa *Statistical Package for the Social Sciences for Windows*, versão 11.0. As variáveis quantitativas foram descritas por meio das médias. Para verificar a normalidade dos dados foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov, considerando  $p \leq 0,05$ . Para verificar a correlação entre as variáveis em estudo foi aplicado o teste não-paramétrico de Spearman. O nível de significância adotado foi de 1%, sendo considerados significativos valores de  $p \leq 0,01$ . As variáveis qualitativas foram apresentadas por meio de frequências absolutas e relativas.

## Resultados

O estudo citogenético pelo teste de MN com *A. cepa* em contato com diferentes dosagens de inseticida piretroide (deltametrina) apresentou os resultados detalhados na Tabela 1.

No T1 que foi o controle negativo não foram observadas células com MN. No entanto, em T2 já foi observado células com MN. Pode-se observar que a frequência média de micronúcleos por tratamento teve um aumento gradual na indução de micronúcleo, desde o T2 (0,6%) até o T5 (3,6%). No entanto,

**Tabela 1.** Total de micronúcleos (MN), média e frequência (em %) de MN em diferentes concentrações de Deltametrina. TM = Total de MN: T1= Controle negativo; T2= 0,4%; T3=0,8%-dose recomendada; T4=1,6% e T5=3,2%.

Tratamento	TM	Média	%
T1	0,0	-0,0	-
T2	18	6,0	0,6%
T3	28	9,3	0,9%
T4	32	10,6	1%
T5	109	36,3	3,6%

como se pode observar na Tabela 01, as médias de micronúcleos nos tratamentos T2, T3 e T4 apresentaram proximidade de valores, diferente do que foi observado no T5.

Antes de verificarmos a correlação, aplicamos o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade das amostras. Não seguimos esse pressuposto ( $p < 0,05$ ), devido ao pequeno tamanho da amostra. Aplicamos o teste não paramétrico Correlação de Spearman. O valor de  $r = 0,968$  nos mostra que a correlação foi perfeitamente positiva, ou seja, a medida que se aumentou a concentração maior foi o número de micronúcleos, confirmando que o efeito é dependente da dose do inseticida. O valor  $p = 0,007$  significa que a correlação foi estatisticamente significativa (Fig. 1).

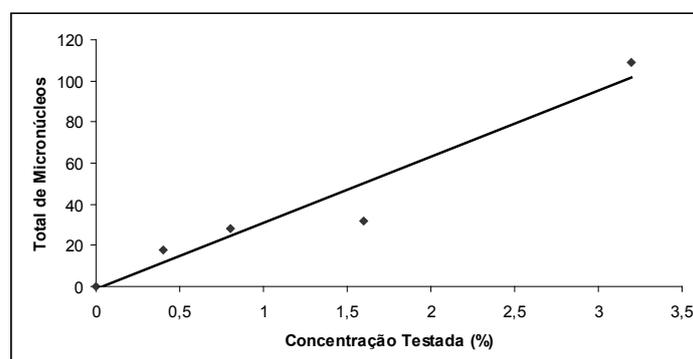
### Análise qualitativa do experimento pelo teste de MN

No tratamento controle negativo não foram observadas células com MN nem com outras AC. A análise das lâminas evidenciou a presença de AC em todos os tratamentos com o inseticida. Foram observadas quebras cromossômicas, alteração na estrutu-

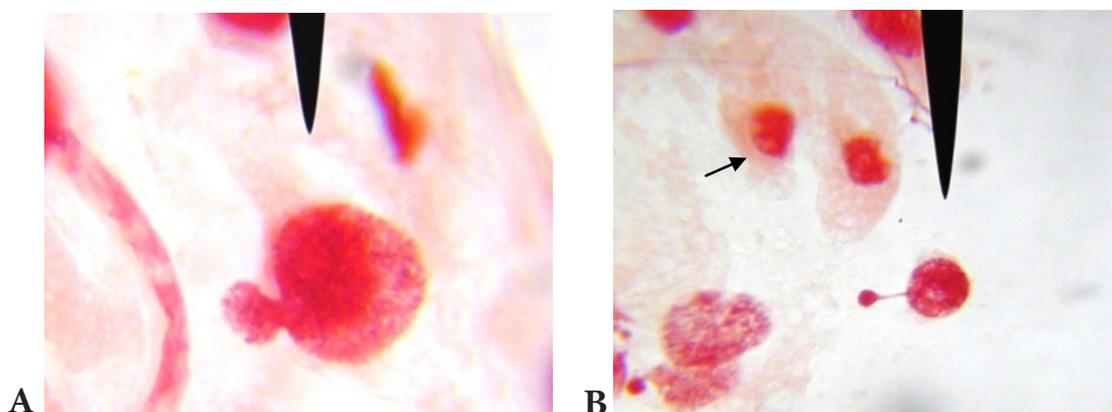
ra dos cromossomos como cromátides distendidas, pontes anafásicas (com variação no número de pontes), perda de cromossomos inteiros, c-metáfases (*colchicine metaphases*), células binucleadas, com maior ocorrência no tratamento T5 (Fig. 3). Nos testes realizados no presente trabalho, utilizamos algumas concentrações acima da dose recomendada e encontramos outros tipos celulares não descritos em bioensaios com *A. cepa*, como broto nuclear e MN ainda ligado por filamento cromático ao núcleo, semelhantes a *broken-eggs* (Fig. 2).

### Discussão

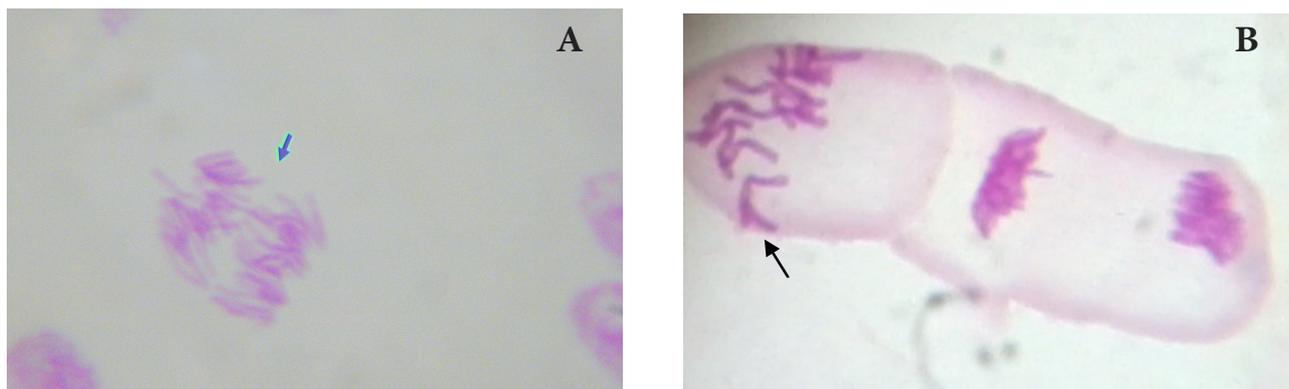
No experimento não se detectou células micronucleadas no controle negativo, embora a literatura científica aponte que a taxa espontânea de MN é na ordem de 3/1000 células analisadas (Mélo *et al.*, 2008). Nos resultados do experimento, partindo da premissa que a frequência normal é de até três MN por 1.000 células (0,3%) estabelecida por Rabello-Gay *et al.* (1991), observamos a ocorrência de atividade mutagênica com sementes de *A. cepa* tratadas em todas as concentrações testadas com o inseticida piretroide (deltametrina). O índice observado de mi-



**Figura 1.** Teste de Correlação de Spearman,  $r = 0,968$ . Quanto maior a concentração de Deltametrina maior foi o número de MN.



**Figura 2.** T5. A seta maior aponta, em A, um broto nuclear (100X) e, em B, um *Broken-egg* (40X). A seta menor aponta, em B, uma célula normal.



**Figura 3.** T5. A seta aponta, em A, pontes na anáfase (40X). A seta aponta, em B, uma c-metáfase (*colchicine metaphase*) (40X).

cronúcleo no T2 (concentração 0,4%) demonstrou que o deltametrina pode causar danos ao DNA. O resultado está de acordo com a literatura (Tice *et al.*, 2000). A deltametrina é muito utilizada em culturas vegetais, no combate a ectoparasitas e insetos, sendo que foi encontrado resíduo em vários vegetais, leite bovino, dejetos de suínos e aves. É um pesticida que pode causar danos ao meio ambiente e ao homem, principalmente se os resíduos se encontram acima dos limites toleráveis (Winston, 1991).

O efeito citológico do inseticida deltametrina foi relatado por Karnopp *et al.* (1999) em cevada (*Hordeum vulgare* L.), como agente provocador de aberrações cromossômicas. Além disto, os autores relataram que os agroquímicos parecem atuar negativamente sobre as células, pois o material tratado apresenta células vazias e cromossomos desnaturados, bem diferentes daqueles encontrados no material testemunha. Também têm sido descrita, por diversos autores que em várias espécies tratadas com agentes químicos, como no fungo *Rhizoclonium* sp. (vide Verma e Jha, 1988) e milho (*Zea mays*) (vide Athanasiou e Heddle, 1980) a ocorrência de alterações cromossômicas estruturais e numéricas.

Embora os tipos celulares descritos neste Bioensaio com *A. cepa*, como brotos nucleares e *broken-eggs* não tenham sido relatados anteriormente, a ocorrência é frequente nos animais principalmente em peixes (Maschio, 2009). Estes resultados reforçam a boa correlação deste sistema-teste com outros sistemas, inclusive com mamíferos, estando de acordo com Grant (1982). Sugerem ainda um aumento no potencial genotóxico e carcinogênico do inseticida testado quando utilizado de forma inadequada melhantes a *broken-eggs* (Fig. 2).

### Referências Bibliográficas

Ateeq B, Farah A, Niamat A., Ahmad A. 2002. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by

- Allium root tip test. Mutation Research 514: 105-113, Athanasiou K, Hedlle JAEMS. 1980. Induced mutation rates and their relation to genome size. Can. J. Gen. Cytol. 22: 455. Barrionuevo WR, Lancas FM. 2001. Extração em fase sólida e micro extração em fase sólida de piretróides em água. Quim. Nova. 2: 172-175. Caritá R, Marin-Morales MA. 2008. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. Chemosphere 72: 722-725. Fenech M, Holland N, Wushou PC, Zeiger E, Bonassi S. 1999. The Human Micronucleus Project – an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. Mutation Research 428: 271-283. Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA. 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. Pesticide Biochemistry and Physiology 88: 252-259. Grant W. 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Genotoxic Program. Mutation Research 281: 89-92. Hedlle JA. 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutation Research 18: 187-190. Karnopp L, Costa FLC, Loeck AE, Amaral CO. 1999. Efeitos citológicos do inseticida piretróide deltametrina em cevada (*Hordeum vulgare* L.). Rev. Bras. de Agrociência 5: 131-134. Leme DM, Marin-Morales MA. 2008. Chromosome aberration and Micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study. Mutation Research 650: 80-86. Maschio LR. 2009. Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do Rio Preto na área de influência da região de São José do Rio Preto/SP. Tese de Doutorado em Genética. IBILCE- UNESP, 208p. Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MIA, Dias AL, Fonseca IC, Marin-Morales MA. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. Genetics and Molecular Biology 29: 148-158. Mello MLS, Vidal BC. 1978. A reação de Feulgen. Ciência e Cultura 30: 665-676. Mélo MEB, Merlo KC, Fernandes RRC, Luna CF, Diniz GTN, Catanho MTJA, Regis L. 2008. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula

- óssea de camundongos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 67: 196-201.
- Rabello-Gay MN, Rodrigues MALR, Monteleone-Neto R. (Eds). 1991. *Mutagenese, carcinogenese e teratogenese: métodos e critérios de avaliação*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 246 p.
- Santos MAT, Areas MA, Reyes FGR. 2007. Pyrethroids: a review. *Alim. Nutr.* 18: 339-349.
- Takahashi CS, et al Teste do micronúcleo em eritrócito de medula óssea de camundongo. Disponível: <http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq=doc01>. Acesso em 10 de dezembro de 2009.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Myamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 206-221.
- Verma BN, Jha CN. 1988. Effect of diethyl sulphate on *Rhizoclonium Kuetz*. *Cytologia* 53:283-286.
- Winston GW. 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 100: 173-176.

# Análise da eficácia de dois protocolos de treinamento físico no desempenho motor de ratos

Analysis of the efficacy of two physical training protocols in the motor performance of rats

Bruna A. Cândido<sup>1</sup>, Bruno M. Gomes<sup>2</sup>, Vinícius R. Cota<sup>3</sup>, Alessandro de Oliveira<sup>1</sup>, Laila C. M. Damázio<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências da Educação Física e Saúde (DCEFS), Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), São João del-Rei, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina (DEMED), Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), São João del-Rei, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Engenharia Elétrica (DEPEL), Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), São João del-Rei, Brasil.

\*Contato: lailadamazio@ufs.edu.br

**Resumo.** O objetivo do estudo é analisar a eficácia de dois protocolos de treinamento físico de alta intensidade sobre o desempenho motor de ratos. Vinte e quatro ratos Wistar machos foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais: grupo TRF (n=8) são os animais que realizaram o protocolo de treinamento de resistência física; grupo TFM (n=8) são os animais que realizaram o protocolo de treinamento de força muscular e o grupo S (n=8) são os animais que não realizaram o treinamento físico. Para análise do desempenho motor foram aplicados dois testes (teste passo em falso e teste das barras paralelas) antes e após o treinamento. Os resultados demonstraram que o desempenho motor dos grupos TRF e TFM foi melhor que o grupo S.

**Palavras-chaves.** Treinamento de resistência física; Treinamento de força muscular; Testes funcionais

**Abstract.** The aim of the study is to analyze the efficacy of two physical training protocols of high intensity on the rats motor performance. Twenty four male Wistar rats were distributed in the following groups: PRT group (n = 8) are the animals who performed physical resistance training protocol; MST group (n = 8) are the animals that performed the muscular strength training protocol and the S group (n = 8) are the animals that did not undergo physical training. For motor performance analysis were applied two tests (false step test and parallel bars test) before and after training. The results showed that the motor performance of the PRT and MST group was better than the S group.

**Keywords.** Physical endurance training; Muscle strength training; Functional tests

Recebido:  
30set2016  
Aceito:  
14mar2017  
Publicado:  
25ago2017

Editado por Arthur  
França e revisado  
por Anônimo

## Introdução

O desempenho motor é definido pelo conjunto de movimentos lineares e eficientes que caracterizam a execução de um determinado movimento (Almeida, 1999). A execução desses movimentos se origina das informações processadas no sistema nervoso central (SNC) que são transmitidas pelos neurônios motores até a musculatura esquelética. O controle motor possibilita a execução do movimento com qualidade para o desempenho funcional permitindo a realização dos gestos motores com precisão e eficiência durante as atividades físicas. No controle de movimento são transmitidas informações sobre a

força de contração e a ativação simultânea e coordenada das fibras motoras, garantindo a produção de um movimento dinâmico (Leporace *et al.*, 2009).

Atualmente os modelos experimentais (Hornberger e Farrar, 2004; Pena *et al.*, 2012, Cassilhas *et al.*, 2013) com ratos permitem esclarecer, de forma objetiva, várias questões sobre os efeitos do treinamento físico no organismo, inclusive possibilitando identificar programas de treinamento físico que promova melhoria no desempenho motor. Dentre os vários protocolos de treinamentos físicos utilizados em modelos experimentais com ratos, atualmente, o treinamento de alta intensidade na escada vertical vem sendo sugerido, uma vez que, não utiliza recur-

soos aversivos como choques elétricos que causam estresse no animal podendo interferir diretamente nos resultados finais (Cassilhas *et al.*, 2013). Com isso, o modelo de treinamento que utiliza a escada vertical possibilita a realização de diferentes protocolos de treinamento, sendo que, um deles poderá estar estruturado para o ganho de força progressiva e o outro poderá direcionar o ganho de resistência física. Além disso, o treinamento físico na escada vertical tem como objetivo o aumento da hipertrofia muscular, melhora da capacidade do sistema cardiorrespiratório e do desempenho motor do animal (Hornberger e Farrar, 2004; Pena *et al.*, 2012).

Dentre os diferentes protocolos de treinamentos físicos aplicados em ratos que utilizam a escada vertical podemos citar o protocolo de treinamento físico que visa a melhora da resistência física sendo caracterizado por um maior número de repetições durante as escaladas e um menor tempo de descanso entre as séries. Já o protocolo de treinamento que visa o aumento da força muscular é caracterizado por altas intensidades (cargas), aproximando-se de 100% de uma repetição máxima (1RM), com um número menor de repetições e intervalos maiores entre as séries (Cassilhas *et al.*, 2013; Hornberger e Farrar, 2004; Pena *et al.*, 2012).

Para avaliação da funcionalidade e desempenho motor de ratos submetidos ao treinamento físico, são utilizados testes funcionais como o teste passo em falso e barra paralela. Os testes funcionais foram desenvolvidos com o intuito de avaliar a coordenação motora de animais em um período de 3 e 5 minutos onde se contabiliza os erros cometidos pelas patas traseiras (barra paralela) e patas dianteiras (passo em falso) (Ding *et al.*, 2002). Com a utilização desses testes é possível avaliar não só a coordenação motora, mas também equilíbrio e agilidade do animal onde o menor índice de erros cometidos pelas patas dianteiras e traseiras indicam melhores condições funcionais (Ding *et al.*, 2002, 2004; Lim *et al.*, 2008).

O presente estudo descreve modelos diferentes de treinamento de alta intensidade na escala

vertical; apresenta a aplicabilidade de testes funcionais na avaliação do desempenho motor de ratos, além de demonstrar os benefícios desses treinamentos no aprimoramento da capacidade motora desses animais.

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo analisar os efeitos de dois protocolos de treinamento no desempenho motor dos animais submetidos aos exercícios de alta intensidade.

## Material e Métodos

**Animais:** Esta pesquisa foi submetida no Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de São João del-Rei, obtendo a aprovação pelo protocolo nº012/2015. Para a realização do presente estudo foram utilizados vinte e quatro ratos heterogênicos da linhagem Wistar, machos, peso inicial 140g com 40 dias de vida. Os mesmos foram mantidos em gaiolas, com acesso livre a água e ração, foto período de 12 horas, temperatura ambiente entre 21 e 22°C e umidade relativa do ar entre 60 e 70%. As gaiolas apresentaram as dimensões de 110 x 90 cm, sendo que, em cada gaiola permaneceram 4 ratos.

Para a realização do estudo, os animais foram igualmente subdivididos em dois grupos (Sedentário e Treinado) sendo o grupo treinado subdividido de acordo com o tipo de treinamento a ser realizado: animais que realizaram o protocolo de treinamento de resistência física [protocolo adaptado de Hornberger e Farrar (TRF; n=8)] e os animais que realizaram o treinamento de força muscular [protocolo adaptado de Pena *et al.* e Cassilhas *et al.*, (TFM; n=8)], conforme consta na Tabela 1.

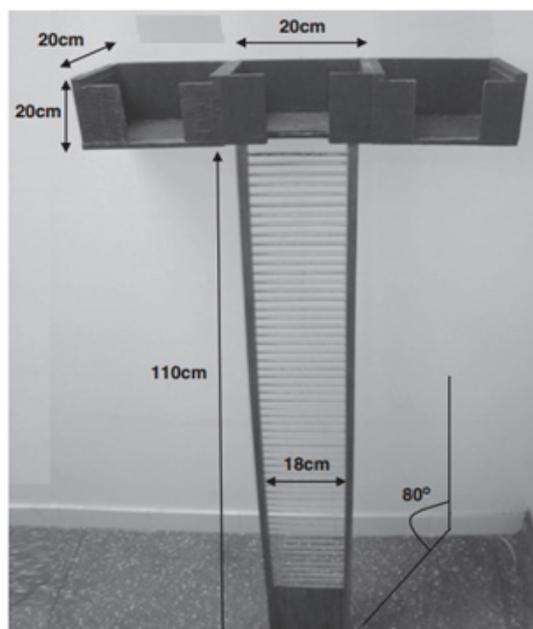
**Treinamento Físico:** Primeiramente, durante três dias consecutivos, os animais treinados (TRF e TFM) realizaram a familiarização ao local e tipo de exercício a ser realizado na escada vertical (Figura 1). Inicialmente, os animais foram posicionados na câmara de alojamento por 60 segundos; esse período foi suficiente para familiarização dos animais ao ambiente (Hornberger e Farrar, 2004; Pena *et al.*,

**Tabela 1.** Distribuição dos 24 ratos segundo os grupos experimentais.

<b>Grupo Experimental</b>	<b>Número de Animais</b>
<b>Animais Sedentários</b>	<b>S (n=8)</b>
<b>Animais treinados com o protocolo de resistência física</b>	<b>TRF (n=8)</b>
<b>Animais treinados com o protocolo de força muscular</b>	<b>TFM (n=8)</b>

2012; Cassilhas *et al.*, 2013). Após este período, estes animais realizavam as três tentativas que consistiam em alcançar a câmara de alojamento saindo de um ponto cada vez mais distante da câmara (Hornberger e Farrar, 2004). Os animais foram posicionados inicialmente na primeira tentativa a uma distância de 35 cm da câmara de alojamento, na segunda tentativa a uma distância de 55 cm e na terceira tentativa a uma distância de 110 cm da câmara de alojamento (Pena *et al.*, 2012). Ao colocar uma tampa na parte superior da câmara de alojamento os animais são motivados a subir a escada e permanecer em um ambiente mais escuro dentro da câmara de alojamento. Dessa forma, todos os animais subiram a escada nos dois treinamentos.

Após o período de adaptação, os ratos pertencentes ao grupo TRF foram submetidos ao exercício na escada vertical durante quatro semanas, cinco dias por semana, com uma duração média de 30 a 45 minutos por dia. Neste caso, o treinamento proposto por Hornberger e Farrar (2004) foi adaptado, sendo que nas três primeiras semanas os animais realizaram 8 séries, com 8 a 12 subidas em cada série, totalizando de 64 a 96 subidas na escada, com intervalos de um minuto entre as séries e carga de 15%, 25% e 50% do peso corporal em cada semana, respectivamente. Por questões éticas, foram incluídos todos os animais que subiram ao menos 8 vezes. Por essa razão, o número de subidas no protocolo varia entre



**Figura 1.** Aparato de treinamento, escada vertical. Escada vertical medindo 110 cm de comprimento, 18 cm de largura, 80° de inclinação. A caixa de alojamento na extremidade superior da escada possui 20 cm de altura, 20 cm de largura e 20 cm de setores (modificado de Pena *et al.*, 2012).

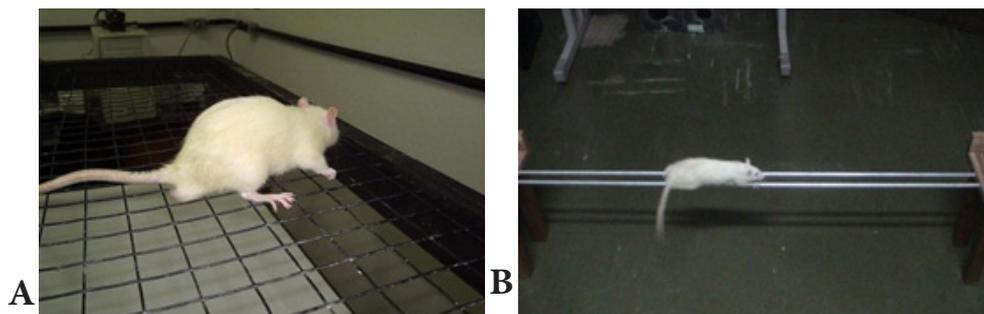
8 e 12 subidas. Na quarta semana, nos quatro primeiros dias foram realizadas 6 séries de 8 subidas, com sobrecarga de 75%, e 90%, totalizando 48 subidas por dia, e, finalmente, nos dois últimos dias foram realizadas 4 séries de 6 escaladas com sobrecarga de 100% do peso corporal, totalizando 24 subidas por dia. Cabe ressaltar que as mudanças das cargas utilizadas ocorriam sempre nas sextas-feiras da 1ª, 2ª e 3ª semanas. Na quarta semana também foram aplicados intervalos de um minuto entre as séries.

Já o grupo TFM, o treinamento ocorreu cinco dias por semana durante quatro semanas com duração média de 15 minutos por dia. Esse treinamento foi proposto por Pena *et al.*, (2012) e Cassilhas *et al.*, (2013). Cada unidade consistiu na realização de 8 séries de escalada contendo de 8 a 12 movimentos das patas do animal até a câmara de alojamento, com intervalos de um minuto entre as séries, totalizando 8 subidas por dia. Quanto às sobrecargas utilizadas no primeiro dia de treinamento, os animais foram submetidos as cargas progressivas de 50%, 75%, 90% e 100% do peso corporal ao longo das séries. Dessa forma, no primeiro dia de treinamento: a primeira, segunda e terceira subidas foram com 50% do peso corporal; na quarta, quinta e sexta subidas, com 75% do peso corporal; na sétima com 90% do peso e na oitava com 100% do peso corporal. A partir do segundo dia foi adicionado sobrecarga de 10g a sobrecarga máxima a cada dia do treinamento e assim sucessivamente.

A carga a ser utilizada nos dois protocolos de treinamento TRF e TFM foi fixada na porção proximal da cauda do animal a 3 cm da raiz caudal contendo um formato cilíndrico que totalizava 16 cm de comprimento. Esse peso era preso por uma linha de lã envolvida por uma fita de borracha adesiva ajustado de forma a proteger a pele do animal (Hornberger e Farrar, 2004; Pena *et al.*, 2012; Cassilhas *et al.*, 2013).

Após o término do treinamento físico, no dia seguinte, todos os animais foram submetidos aos dois testes funcionais (teste passo em falso e teste das barras paralelas) para avaliação do desempenho motor. Para aplicação dos testes funcionais, três avaliadores foram treinados antes da aplicação dos testes, que foi realizada de forma cega. Foi realizada a média de erros cometidos pelos animais nos dois testes funcionais. Os testes funcionais foram filmados para análises posteriores dos dados. Todos os testes funcionais e treinamento físico foram realizados no período da tarde.

Para realização do teste passo em falso, foi utilizada uma placa (estrutura) gradeada (figura 2) de 100 x 50 cm, com intervalo de grade de 3 x 3 cm



**Figura 2.** Aparato dos testes funcionais. Em A, o teste passo em falso, placa gradeada de 100x50cm, com intervalo de grade de 3x3 cm (9cm<sup>2</sup>) e diâmetro de 1/2 cm da grade de metal. Em B, o teste das barras paralelas, duas plataformas de madeiras unidas por barras paralelas de metal (115 cm), com distância entre grades de 1 cm e diâmetro da barra de metal de 2 cm.

(9 cm<sup>2</sup>) e diâmetro da grade de 1/2 cm. A duração do teste foi de seis minutos, sendo realizado em dois períodos de três minutos para avaliação de cada pata dianteira. O erro foi considerado quando a pata passasse por entre as grades (Ding *et al.*, 2002, 2004; Lim *et al.*, 2008).

Para realização do teste das barras paralelas foram utilizadas duas plataformas de madeira unidas por barras paralelas de metal (figura 2), as plataformas mediam 115 cm de comprimento, 1 cm de diâmetro e 3 cm de distância. O teste teve a duração de cinco minutos e foi considerado erro quando o animal colocava as duas patas traseiras na mesma barra ou quando a pata traseira passava entre as duas barras ou por fora delas (Ding *et al.*, 2002, 2004).

Foi utilizado um intervalo de 2 horas entre um teste e o outro (Ding *et al.*, 2002, 2004). A média dos erros cometidos pelos ratos, nos dois testes funcionais foram analisados e calculados antes e após os treinamentos físicos.

**Estatística:** Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Para análise da média de erros cometidos pelos animais antes e após o treinamento físico foi utilizado o teste *t-student* pareado, considerando um nível de significância de  $p < 0,05$ . Para a análise da média de erros cometidos pelos animais entre os grupos: TRF, TFM e S, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido do *post-hoc* de Mann-Whitney e Brown-Forsythe, para verificar se existem diferenças entre as médias de erros, considerando o nível de significância de  $p < 0,05$ .

## Resultados

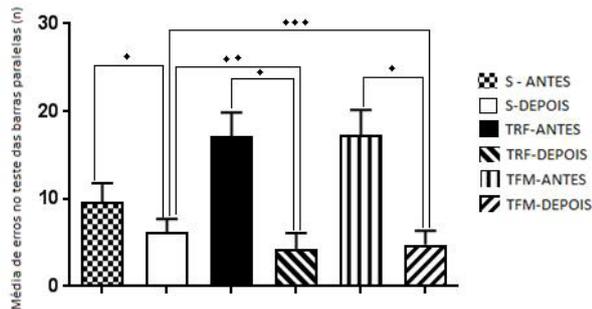
Os animais submetidos ao protocolo TRF apresentaram no teste das barras paralelas, antes e após o treinamento físico, uma média de erros come-

tidos pelas patas traseiras de  $17,13 \pm 1,55$  e  $4,25 \pm 0,65$ , respectivamente. No teste *t-student* pareado foi evidenciado diferença antes e após o treinamento físico no grupo TRF, com valor de  $p < 0,001$ . O grupo TFM apresentou uma média de erros nesse teste antes e após o treinamento físico de  $17,25 \pm 2,36$  e  $4,75 \pm 0,88$  respectivamente. Foi evidenciada diferença no número de erros antes e após o treinamento ( $p = 0,0030$ ). O grupo S apresentou uma média de erros antes e após o período de treinamento de  $14,5 \pm 1,09$  e  $8,75 \pm 0,8$ , respectivamente. Foi identificada diferença no número de erros cometidos antes e após o período de sedentarismo dos animais ( $p = 0,0009$ ).

No início do experimento não foi evidenciada diferença no número de erros entre os grupos S e TRF ( $p = 0,1296$ ); entre os grupos S e TFM ( $p = 0,2342$ ) e TRF e TFM ( $p = 0,9905$ ).

No final do experimento foi evidenciada diferença no número de erros cometidos entre os grupos S x TRF ( $p = 0,0017$ ) e S x TFM ( $p = 0,0118$ ). Entre o grupo TRF x TFM não foi evidenciada diferença na média de erros no final do experimento ( $p = 0,6954$ ). No entanto, o grupo TRF apresentou uma diminuição de 12,88 erros; o grupo TFM apresentou uma diminuição de 12,5 erros e o grupo S apresentou uma diminuição de 5,75 erros. O grupo sedentário (S) apresentou menor diminuição de erros nesse teste. Os resultados do teste das barras paralelas estão representados na figura 3.

A média de erros cometidos na pata dianteira direita pelo grupo TRF antes e após o treinamento foi de  $11,13 \pm 0,74$  e  $6,5 \pm 0,96$  respectivamente ( $p < 0,05$ ). No teste *t-student* pareado foi evidenciada diferença antes e após o treinamento físico no grupo TRF, com valor de  $p$  igual a 0,0031. O grupo TFM apresentou uma média de erros antes e após o treinamento de  $6,13 \pm 0,81$  e  $2,25 \pm 0,59$ . Foi evidenciada diferença no número de erros cometidos antes e após o treinamento nesse grupo, com valor de  $p$  igual a



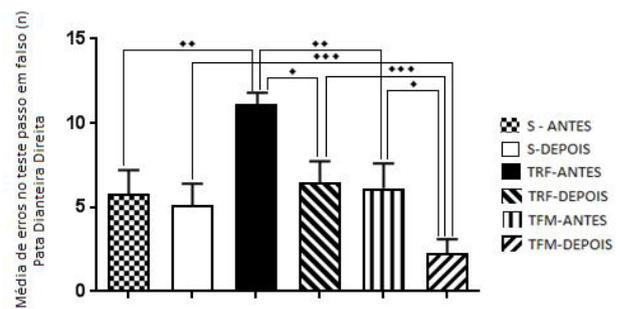
**Figura 3.** Número de erros cometidos no teste das barras paralelas, análise das patas traseiras antes e após o período de treinamento dos grupos experimentais. (♦) representa diferença significativa antes e após o período de sedentarismo ou treinamento (teste *t student* pareado); (♦♦) representa diferença significativa entre os grupos no início do experimento (ANOVA, seguido do *post-hoc* Brown-Forsythe); (♦♦♦) representa diferença significativa entre os grupos no final do experimento (ANOVA, seguido do *post-hoc* Brown-Forsythe).

0,0023. Já o grupo S apresentou uma média de erros antes e depois de  $7,38 \pm 0,5$  e  $5,63 \pm 0,99$ , respectivamente. Não foi evidenciada diferença no número de erros cometidos pelo grupo S antes e depois do período de sedentarismo ( $p=0,2221$ ).

No início do experimento foi evidenciada diferença na média de erros cometidos entre os grupos S e TRF ( $p=0,0036$ ) e TRF e TFM ( $p=0,0016$ ); entre os grupos S e TFM não foi identificada diferença ( $p=0,3207$ ).

No final do experimento foi evidenciada diferença entre os grupos TRF x TFM ( $p=0,0065$ ) e S x TFM ( $p=0,0228$ ). Entre os grupos S x TRF ( $p=0,4886$ ) não foi identificada diferença entre as médias de erros cometidos. Os grupos treinados apresentaram uma diminuição no número de erros no teste passo em falso (análise da pata dianteira direita), sendo que o grupo TRF apresentou uma diminuição de 4,63 erros; o grupo TFM apresentou uma diminuição de 3,88 erros e o grupo S apresentou uma diminuição de 1,75 erros. O grupo TRF apresentou maior diminuição de erros nesse teste, como evidenciado na figura 4.

No teste passo em falso, os erros cometidos pela pata dianteira esquerda do grupo S antes e após o período de sedentarismo foram de  $6,875 \pm 0,3$  e  $4 \pm 0,68$ , respectivamente. Foi evidenciada diferença antes e após o período de sedentarismo ( $p=0,0012$ ). O grupo TRF apresentou uma média de erros antes e após o treinamento de  $10,75 \pm 0,98$  e  $5,63 \pm 0,61$ , sendo que foi identificada diminuição do número de erros antes e após esse treinamento ( $p=0,0102$ ). No grupo TFM ocorreu uma média de erros antes e após o treinamento de  $6,38 \pm 0,57$  e  $1,63 \pm 0,32$  e também foi evidenciada diminuição na média de erros antes

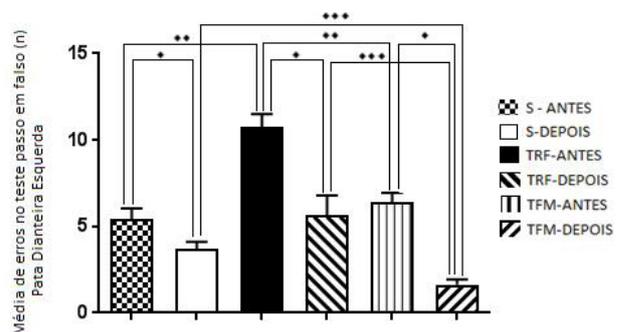


**Figura 4.** Número de erros cometidos no teste passo em falso. Análise da pata dianteira direita antes e após o período de treinamento dos grupos experimentais. (♦) representa diferença significativa antes e após o período de sedentarismo ou treinamento (teste *t student* pareado); (♦♦) representa diferença significativa entre os grupos no início do experimento (ANOVA, seguido do *post-hoc* Brown-Forsythe); (♦♦♦) representa diferença significativa entre os grupos no final do experimento (ANOVA, seguido do *post-hoc* Brown-Forsythe).

e depois do treinamento nesse grupo ( $p=0,0003$ ).

No início do experimento foi evidenciada diferença entre a média de erros cometidos nos grupos S x TRF ( $p=0,0026$ ) e TRF x TFM ( $p=0,0017$ ). Entre os grupos S x TFM ( $p=0,4463$ ) não foi evidenciada diferença no número de erros no início do experimento.

No final do experimento, foi encontrada diferença entre os grupos TRF x TFM ( $p=0,0289$ ) e S x TFM ( $p=0,0131$ ). Entre os grupos S x TRF não ocorreu diferença no final do experimento ( $p=0,7776$ ). O grupo S apresentou uma diminuição de 2,875 erros, no grupo TRF uma diminuição de 5,125 erros e no grupo TFM uma diminuição de 4,75 erros. O grupo TRF também apresentou maior diminuição



**Figura 5.** Número de erros cometidos no teste passo em falso. Análise da pata dianteira esquerda antes e após o período de treinamento dos grupos experimentais. (♦) representa diferença significativa antes e após o período de sedentarismo ou treinamento (teste *t student* pareado); (♦♦) representa diferença significativa entre os grupos no início do experimento (ANOVA, seguido do *post-hoc* Brown-Forsythe); (♦♦♦) representa diferença significativa entre os grupos no final do experimento (ANOVA, seguido do *post-hoc* Brown-Forsythe).

de erros neste teste. Esses dados podem ser observados na figura 5.

## Discussão

A presente pesquisa teve como objetivo analisar os efeitos de dois protocolos de treinamento em ratos e destacar qual deles possibilitou maiores benefícios motores, sendo um voltado para o ganho de força (TFM) e o outro para ganho de resistência física (TRF). De acordo com os dados apresentados no teste das barras paralelas, foi possível observar uma diminuição no número de erros cometidos pelos animais dos grupos S, TRF e TFM antes e após o programa de exercícios físicos. Os dois protocolos de treinamento utilizados nos experimentos demonstraram ser benéficos na coordenação motora da pata traseira dos animais treinados. Não foi observada diferença significativa no número de erros entre os grupos TRF e TFM após o treinamento físico.

No teste passo em falso, ao analisar a coordenação motora da pata dianteira direita dos grupos TRF e TFM, também foi possível observar uma diminuição de erros antes e após o protocolo de treinamento físico em comparação com o grupo S. Ao comparar a diminuição de erros após o treinamento físico, os grupos TRF e TFM demonstraram diminuição de erros significativa no final do experimento. O grupo sedentário não apresentou diminuição significativa de erros no final do experimento. O grupo TRF apresentou no início do experimento maior número de erros em comparação com os grupos S e TFM, o que pode ter interferido no número de erros após o treinamento desses animais, onde foi evidenciada maior diminuição de erros nesse grupo no final do experimento. Esses dados demonstram a eficácia dos dois protocolos de treinamento na melhora do desempenho motor dos animais treinados.

Os resultados do teste passo em falso da pata dianteira esquerda demonstraram diminuição significativa no número de erros antes e após o protocolo de exercícios físicos e o período de sedentarismo nos grupos S, TRF e TFM, sendo que no início do experimento, também foi identificada diferença entre a média de erros cometidos no grupo TRF em comparação com o grupo S e TFM. Essa diferença pode ter interferido na diferença entre a média final de erros desse grupo, onde foi identificado menor quantidade de erros cometidos pelos animais desse grupo (TRF).

Os dados do presente estudo demonstraram a eficácia dos dois protocolos de treinamento físico na melhora da coordenação motora da pata dianteira e traseira de animais treinados em comparação com animais sedentários. Esses dados corroboram com

estudo proposto por Cassilhas *et al.* (2013), onde foi evidenciada melhora do desempenho motor dos ratos (hipertrofia muscular) após treinamento de resistência física em escada vertical.

No treinamento de força ocorrem adaptações musculares que geram não só o aumento de força, mas também aumento da secção transversa das fibras musculares (hipertrofia), proporcionando maiores números de fibra motoras ativadas durante o movimento (Takarada *et al.*, 2000, 2002). Esse aumento da secção transversa só ocorre devido à ativação de células satélites responsáveis pela reconstrução da fibra muscular lesionada durante o estresse mecânico (McCardle e Katch, 2008). O treinamento de resistência promove mudanças no sistema cardiovascular (Kraemer *et al.*, 2002), possibilitando aumento do VO<sub>2</sub> máxima, diminuição da frequência cardíaca em repouso e maiores capacidades de sustentar determinados estresses por um período de tempo (Jurgen, 1999). De acordo com os resultados obtidos no presente estudo foi possível verificar que o treinamento de resistência física e força possibilitou uma melhora no desempenho motor dos animais avaliados pelos testes funcionais. No estudo de Damázio *et al.* (2015), que também utilizou os testes funcionais para avaliação do desempenho motor dos animais com isquemia cerebral, foi identificada melhora da coordenação motora dos animais quando exercitados antes e após o evento isquêmico.

A diferença de erros cometidos entre os grupos TRF e TFM não foi significativa e os dois grupos obtiveram reduções de erros nos testes funcionais em comparação ao grupo S. O treinamento de resistência e de força permitiu melhora do desempenho motor dos animais por beneficiar às adaptações cardiovasculares que atuam no fornecimento de oxigênio ao organismo, por melhorar as adaptações musculares gerando aumento de fibras motoras ativadas e como consequência melhora na coordenação motora (Agostini, 2000; Conley e Rozenek, 2001) e melhora do aporte sanguíneo (Hagerman *et al.*, 2000).

## Conclusão

Conclui-se que os dois protocolos de treinamento (resistência e força muscular) trouxeram benefícios na função motora dos animais submetidos aos exercícios, permitindo a diminuição significativa dos erros cometidos antes e após os treinamentos. Dessa forma, protocolos de treinamento físico que enfatizam o ganho de resistência física e força muscular possibilitam melhora do desempenho motor. Com isso é interessante pensar na hipótese de se trabalhar com o protocolo de treinamento de força e re-

sistência física em seres humanos quando o objetivo for a melhora da funcionalidade motora. Além disso, é de extrema importância se basear nos princípios do treinamento esportivo e levar em consideração as suas cargas e tempo de duração de cada método de treinamento, visto que no presente estudo os treinamentos foram realizados em quatro semanas, onde ocorre o início das adaptações do organismo ao estresse imposto.

## Agradecimentos

Agradecimentos aos pesquisadores do Laboratório Interdisciplinar de Neuroengenharia e Neurociência Experimental (LINNce) da Universidade Federal de São João del-Rei pelo apoio científico e à agência de financiamento da pesquisa – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Referências Bibliográficas

- Agostini GG. 2000. O estudo do limiar de lactato em exercício resistido. [Master's thesis]. São Carlos: 85.
- Almeida GL. 1999. Biomecânica e controle motor aplicado no estudo de disfunções motoras. *Motriz* 5(2): 178-182.
- Cassilhas SRC, Reis IT, Venâncio D, Fernandes I, Tufik S, Mello MT. 2013. Animal model for progressive resistance exercise: a detailed description of model and its implications for basic research in exercise. *Motriz* 19:178-184.
- Conley MS, Rozenek R. 2001. National strength and conditioning association position statement: Health aspects of resistance exercise and training. *Strength Cond. J.* 23: 9-23.
- Damázio LCM, Melo RTR, Lima MC, Pereira VG, Ribeiro RIMA, Alves NR, Monteiro BS, Natali AJ, Del Carlo RJ, Maldonado IRSC. 2015. Exercício físico promove neuroproteção estrutural e funcional em ratos com isquemia cerebral. *Revista Neurociências.* 23:581-588.
- Ding YC, Zhou YD, LAI Q, Li J, Park H, Diaz FG. 2002. Impaired motor activity and motor learning function in rat with middle cerebral artery occlusion. *Behavioural Brain Research* 132: 29-36.
- Ding Y, Li J, Lai Q, et al. 2004. Motor balance and coordination functional outcome in rat with cerebral artery occlusion training enhances transient middle. *Neuroscience* 123: 667-674.
- Hagerman FC, Walsh SJ, Hikida RS, Gilders RM, Murray TF, et al. 2000. Effects of High-Intensity Resistance Training on Untrained older Men. I. Strength, Cardiovascular and Metabolic Responses. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 55(7): B336-B346.
- Jurgen W. 1999. *Treinamento Ideal*. São Paulo: 120.
- Kraemer WJ, Adams K, Cafarelli E, Dudley GA, Dooly C, et al. 2002. Progression models in resistance training for healthy adults. *American College of Sports Medicine position stand (ACSM)*. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 34: 364-380.
- Hornberger TAJR, Farrar RP. 2004. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Canadian Journal of Applied Physiology Champaign* 29: 16-31.
- Leporace G, Metsavaht, L, Sposito MMM. 2009. Importância do treinamento da propriocepção e do controle motor na reabilitação após lesões músculo-esqueléticas. *Acta fisiatra* 16(3): 126-131.
- Lim SHJ, Lee S, Lee, et al., 2008. The quantitative assessment of functional imparment and its correlation to infarct volume in rats with transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Research.* 1230: 303-309.
- Mcardle WD, Katch IV. 2008. *Fisiologia do Exercício: Energia, nutrição e desempenho humano*. Rio de Janeiro: 471-511.
- Pena LFP, Fernandes J, Almeida AA, Fabiano GNG, Ricardo C, Daniel PV, Marco TM, et al. 2012. A strength exercise program in rats with epilepsy is protective against seizures. *Epilepsy & Behavior* 25: 323-328.
- Takarada Y, Sato Y, Ishii N. 2002. Effects of resistance exercise combined with vascular occlusion on muscle function in athletes. *European Journal of Applied Physiology.* Heidelberg 86: 308-314.
- Takarada Y, Takazawa H, Sato Y, Takebayashi ST, Tanaka Y, Ishii N. 2000. Effects of resistance exercise combined whit moderate vascular occlusion on muscular function in humans. *Journal of Applied Physiology.* Bethesda 88: 2097-2106.

# Avanços tecnológicos na criopreservação de células-tronco e tecidos, aplicados à terapia celular

Technological advances in the cryopreservation of stem cells and tissues, applied to cellular therapy

**Artur Alves Rodrigues da Silva, Cláudio Gabriel Rodrigues, Marcia Bezerra da Silva\***

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-tronco – Dr. Oleg Krasilnikov.

\*Contato: mbsilva05@gmail.com

**Resumo.** As pesquisas com células-tronco visam melhorias na qualidade de vida da população por meio da terapia celular. Apesar das pesquisas vigentes demonstrarem a efetividade da aplicação dessas células no processo de regeneração de diversos tecidos, o único tratamento efetivo de rotina são os transplantes de células-tronco sanguíneas. Contudo, as dificuldades referentes à disponibilidade de células-tronco para aplicação clínica a médio e longo prazo expõem um cenário carente de bancos de células-tronco e tecidos criopreservados. O processo de criogenia permite a preservação de células e tecidos por meio da aplicação de agentes crioprotetores em temperaturas adequadas, dois fatores necessários para o sucesso desta técnica. As pesquisas nessa área são importantes e promissoras, permitindo a utilização segura das células-tronco na terapia celular.

**Palavras-chaves.** Células-tronco; criopreservação

Recebido:  
28nov2016  
Aceito:  
16fev2017  
Publicado:  
25ago2017

Editado por Carlos  
Vilela e revisado  
por Anônimo

**Abstract.** The stem cell research aims improvement on population life quality through cellular therapy. Despite the current research demonstrating the effectiveness of these cells in different tissue regeneration process, the unique effective treatment is blood stem cells transplant. However, the hardships to maintain stem cell availability for clinical application for long and midterm expose a scenario that lacks banks of both cryopreserved stem cells and tissues. The cryogenic process allows the stem cells and tissues preservation through application of cryoprotectants in adequate temperatures; two necessary factors to be successful on this technique. Researches on this area are important and promising, allowing the safe stem cells use on cell therapy.

**Keywords.** Stem cell; Cryopreservation

## Introdução

O acelerado desenvolvimento científico e consequentemente o gigantesco avanço tecnológico das últimas décadas vêm revolucionando a qualidade de vida e longevidade do ser humano. Dentro desse contexto surgiu a terapia celular, visando restabelecer a integridade e o funcionamento dos tecidos e órgãos lesados, a partir da utilização de células-tronco. Considerada uma das maiores descobertas dos últimos tempos, as células-tronco vêm sendo utilizadas para o tratamento de muitas doenças degenerativas e autoimunes (Zorzanelli *et al.*, 2015). Contudo as limitações quanto à estabilidade em cultura depois de várias passagens, bem como a necessidade de criopreservação dessas células por longos períodos com garantia de suas funções, para aplicações clínicas, levaram à busca e ao desenvolvimento de novos

protocolos de criopreservação (Chatzistamatiou *et al.*, 2014). O principal objetivo é cessar de maneira controlada e reversível todas as funções biológicas das células em temperaturas ultrabaixas. A viabilidade obtida após submeter as células a esse processo depende basicamente de sua capacidade de resistir à desidratação e ao dano mecânico decorrente da formação de cristais de gelo no seu interior (Marquez-Curtis *et al.*, 2015). Diversos protocolos de criopreservação vêm sendo apresentados visando eliminar ou minimizar a formação dos cristais de gelo, visto que os danos provocados por estes cristais prejudicam a capacidade de proliferação das células, levando-as quase sempre à morte. A necessidade cada vez maior de estocar células-tronco e tecidos que contém essas células vem despertando o interesse em aprimorar as técnicas de congelamento para que no descongelamento um percentual elevado de células viáveis

veis seja preservado. De forma que as células-tronco a serem utilizadas para transplantes futuros, visando o tratamento de doenças hematológicas, neoplásicas e genéticas (Miyazaki e Suemori, 2014), sejam corretamente preservadas e possam permanecer por mais tempo no ambiente crioprotetor. Nesse trabalho de revisão abordamos os principais avanços na área da criopreservação.

### Células-tronco

O termo “Célula-tronco” (CT) foi introduzido na literatura em 1868 pelo biólogo alemão Ernst Haeckel (Ramalho-Santos e Willenbring, 2007). Este termo foi utilizado para descrever um organismo unicelular, o qual se presumia estar envolvido com a origem de todos os organismos multicelulares. As células-tronco podem ser classificadas em embrionárias e não-embriônicas (adultas). Todas essas células, em última análise, provêm de uma única célula inicial, resultante da fecundação do óvulo pelo espermatozoide, a chamada célula-ovo ou zigoto (Fischbach e Fischbach, 2004). As células-tronco embrionárias podem ser: *totipotentes*, células com capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de tecido, incluindo os anexos embrionários, podem ser encontradas no início do desenvolvimento embrionário, ou mais especificamente, até a fase de mórula (terceiro dia de desenvolvimento); e *pluripotentes*, que são as células-tronco embrionárias retiradas da massa celular interna do blastocisto (quinto dia de desenvolvimento), apresentam a capacidade de se diferenciar nos grupos celulares dos três folhetos germinativos com exceção dos anexos extra-embriônicos. As células-tronco adultas têm seu potencial mais limitado que as embrionárias e geralmente são tecido-específicas. Elas são divididas em duas categorias: as *multipotentes* que dão origem a diferentes tipos celulares dentro de suas respectivas camadas germinativas, a exemplo das células-tronco hematopoéticas (CTHs) e mesenquimais (CTMs); e as *unipotentes* que dão origem a apenas um tecido, a exemplo das células-tronco presentes no tecido nervoso e nos testículos (Hunt et al., 2011; Marquez-Curtis et al., 2015). Inicialmente o consenso era de que apenas as células-tronco embrionárias poderiam se diferenciar em células de origem ectodérmica, mesodérmica e endodérmica. Porém Takahashi e colaboradores (2007) induziram células adultas (fibroblastos) ao estado de pluripotência por meio da introdução de retrovírus transfectados com vários fatores de transcrição, sendo os principais Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4. Esses fatores induziram essas células a adquirirem características morfológicas e proliferativas, de

expressão gênica e de formação de teratomas, semelhantes às células-tronco embrionárias, a partir de então, denominadas células-tronco pluripotentes induzidas (CTPi). Esses resultados quebraram o dogma de que a diferenciação celular seria um processo unidirecional, iniciando uma nova fase na biologia das células-tronco (Yu et al., 2007; Park et al., 2008).

### Aplicações terapêuticas

Diversos estudos com células-tronco demonstraram que estas são capazes de promover o reparo de órgãos e tecidos, devido às suas propriedades de diferenciação celular e secreção de fatores. Acredita-se que futuramente as terapias celulares irão oferecer tratamentos para muitas doenças que hoje são consideradas incuráveis, e para as quais a única solução terapêutica disponível é o transplante de órgãos. Vale ressaltar que, no Brasil, as únicas terapias celulares realizadas rotineiramente e regulamentadas são os transplantes de células-tronco hematopoéticas, procedimento baseado na sua infusão intravenosa para a reconstituição da medula óssea do paciente por precursores sanguíneos (Voltarelli, 2002). Atualmente, o transplante de células-tronco do sangue é reconhecido como um tratamento efetivo para doenças hematológicas neoplásicas (leucemias, linfomas) ou não-neoplásicas (anemia aplástica, talassemia, anemia falciforme) ou doenças metabólicas (Simões et al., 2010). Entretanto, há diversos estudos que estão avaliando a possibilidade da aplicação de células-tronco de diversas fontes em pesquisas clínicas para o tratamento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como diabetes, doenças cardiovasculares, do sistema nervoso e odontológicas (Ma et al., 2012; Pereira e Queiroz, 2013). O cenário desejado para a medicina regenerativa inclui a imediata disponibilidade das células-tronco. No entanto, o pequeno percentual adquirido a partir de tecidos frescos, confirmou que a criopreservação é um processo essencial para a manutenção das células-tronco com fins terapêuticos (Marquez-Curtis et al., 2015).

### Bancos de Criopreservação

O sucesso dos transplantes com CTHs para o tratamento de doenças hematológicas benignas e malignas despertou o interesse para o armazenamento dessas células em bancos de criopreservação. As CTHs apresentam como fontes clássicas a medula óssea e o sangue do cordão umbilical. Os transplantes alogênicos das CTHs, a partir da medula óssea de doadores compatíveis é extremamente restrito devido à resposta autoimune gerada no hospedeiro, di-

minuindo o interesse na criopreservação das CTHs provenientes dessa fonte. Já as CTHs derivadas do sangue do cordão umbilical, tornaram-se uma fonte alternativa, pois diminuem os problemas de incompatibilidade (Voltarelli e Stracieri, 2000). O primeiro transplante utilizando CTHs do sangue do cordão umbilical foi realizado em 1989 (Gluckman *et al.*, 1989) e o primeiro banco de criopreservação foi estabelecido em 1993, desde então este procedimento vem ganhando destaque e aceitação no cenário mundial, ampliando o número de bancos no mundo. Outra possibilidade promissora é a criopreservação das CTMs, que podem ser isoladas a partir da medula óssea, tecido adiposo, sangue do cordão umbilical e outros tecidos. O interesse científico e clínico nesse tipo celular também cresceu nos últimos anos, devido ao seu potencial na medicina regenerativa (Marquez-Curtis *et al.*, 2015). Roy e colaboradores (2014), utilizaram vários protocolos com concentrações diferentes de crioprotetores para obtenção de CTMs com maior viabilidade e capacidade proliferativa após o descongelamento. Muitos estudos como esse estão sendo realizados para estabelecer protocolos padronizados, os quais possibilitem o armazenamento em larga escala das CTMs, a exemplo das CTHs (Chatzistamatiou *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2012). Os estudos confirmam que as células-tronco embrionárias (CTEs) apresentam excelente plasticidade e, portanto, são também ferramentas atrativas na aplicação terapêutica. Contudo foi evidenciada a sensibilidade dessas células quanto aos métodos tradicionais de criopreservação, prejudicando sua expansão e diferenciação *in vitro*. Alguns estudos iniciais sugerem a utilização da vitrificação como método benéfico na conservação desse tipo celular (Li *et al.*, 2010). Também há relatos de que algumas soluções melhoram a taxa de recuperação das CTEs após o período de criopreservação. No entanto, as questões inerentes à criação de bancos de criopreservação das CTEs ainda exigem muitos estudos, pois não há, até o momento, um método padrão que garanta a viabilidade necessária dessas células (Li e Ma, 2012).

### Criopreservação

Com o objetivo de armazenar CTMs por longos períodos para posterior utilização na terapia celular, novos protocolos de criopreservação estão sendo desenvolvidos, a exemplo dos bancos de células-tronco do sangue de cordão umbilical humano (Da-Croce *et al.*, 2013). O resfriamento de células e tecidos interfere nas diversas vias metabólicas, na diminuição da atividade da bomba de sódio e potás-

sio e na mudança de fase dos lipídios da membrana plasmática, interferindo na função de enzimas e na precipitação de substâncias. Nas técnicas de criopreservação, as células são primeiramente tratadas com agentes crioprotetores, a fim de protegê-las dos danos causados pela desidratação ou geração de cristais de gelo que se formam dentro das células durante o resfriamento. Estes dois tipos de lesões estão correlacionados com a velocidade com que a suspensão celular é congelada; o primeiro ocorre em baixas velocidades, já o segundo, em altas velocidades de congelamento. Os procedimentos que são aplicados na tentativa de minimizar esses danos são basicamente dois: a utilização de agentes crioprotetores e a aplicação adequada da temperatura de congelamento (Lauterboeck *et al.*, 2016). Os crioprotetores são substâncias químicas utilizadas para diminuir os danos causados no processo de criopreservação e podem agir interna ou externamente na célula ou no tecido. Os crioprotetores apresentam ação coligativa com as moléculas de água, evitando a formação de gelo intracelular ou ainda reduzindo os danos causados pelas altas concentrações dos solutos presentes na suspensão de células, evitando a desidratação das proteínas. Os crioprotetores são divididos em duas categorias: *permeáveis* ou *intracelulares*, que podem passar pelas membranas celulares, como o dimetil-sulfóxido (DMSO), glicerol, etilenoglicol (EG); e *não permeáveis* ou *extracelulares*, que não são capazes de penetrar nas células e nos tecidos por serem macromoléculas com alto peso molecular, entre eles se destacam os açúcares complexos como a trealose e sacarose (Cui *et al.*, 2007; Motta *et al.*, 2010). Todavia, a utilização dos crioprotetores deve ser moderada, pois apesar da proteção, eles podem ser tóxicos para as células e tecidos, principalmente se usados em altas concentrações, isso se deve em parte à retenção exagerada de água citoplasmática, elevando a formação de cristais de gelo. Outro fator crucial para o sucesso da criopreservação é a temperatura de armazenamento. Alguns estudos sugerem que culturas mantidas entre -70 e -90 °C podem ficar estáveis por meses ou anos. Porém, a manutenção em nitrogênio líquido a -196 °C previne efetivamente as células e tecidos contra os danos e as modificações que acontecem e se acumulam quando as amostras são congeladas a -90 °C (Santis e Prata, 2009).

### Crioprotetores permeáveis

São caracterizados por serem substâncias com baixa massa relativa, ausência de carga residual, alta solubilidade em meio aquoso, penetrando na célula. A ação desses agentes em reduzir os danos cau-

sados pelo processo de criogenia se deve, em grande parte, às estruturas dessas substâncias, as quais fazem ligações de hidrogênio com as moléculas da água; além de prevenir a exposição das células a elevadas concentrações de eletrólitos. As características químicas desses compostos diminuem a formação de cristais de gelo, contribuindo desta forma para estabilização das biomembranas. Neste grupo se encontram o DMSO, glicerol e EG como os principais agentes crioprotetores (Hunt *et al.*, 2011). O DMSO é um composto incolor e inodoro com capacidade de absorção de umidade, usado na indústria como solvente. É uma substância composta por um grupo sulfóxido hidrofílico e dois grupos metila hidrofóbicos. O DMSO é o crioprotetor mais utilizado devido a sua propriedade coligativa com moléculas de água livres, diminuindo a temperatura do ponto de congelamento (Castro *et al.*, 2011). Estudos como o de Liu e colaboradores (2008), utilizaram o DMSO para analisar a influência da criopreservação sobre a capacidade de diferenciação e proliferação das células-tronco mesenquimais. Após 24 horas de congelamento, as células foram descongeladas, plaqueadas e submetidas ao meio indutor. Os resultados desse estudo demonstraram que a criopreservação com DMSO não altera significativamente a capacidade de diferenciação e proliferação das CTMs, além de produzir uma matriz mineralizada, um avanço para a engenharia de tecidos (Liu *et al.*, 2008). Além da utilização *in vitro*, muitos estudos analisam o armazenamento de células-tronco hematopoéticas para transplantes, acentuando a necessidade de permanecer protegidas em bancos de sangue. No entanto, sob essa perspectiva, a utilização do DMSO pode afetar o paciente devido a sua toxicidade, causando náuseas, dor de cabeça, hipotensão e outros sintomas mais graves, além de causar alterações químicas nas células, como a produção de radicais livres que levam à lesão celular e a sua inviabilidade. Para minimizar esses efeitos tóxicos, antioxidantes, como o ácido ascórbico, são combinados com baixas concentrações de DMSO (Motta *et al.*, 2010). O glicerol por sua vez foi um dos primeiros crioprotetores a ser utilizado no congelamento de células. O uso do glicerol em soluções crioprotetoras reduz os efeitos da desidratação, diminuindo o acúmulo de sais no interior da célula. Porém, a redução desses efeitos dependerá da relação molar entre o soluto neutro (glicerol) e tóxicos (sais). Logo, se as concentrações de sais forem baixas, a ação crioprotetora do glicerol será efetiva (Precht *et al.*, 1973). Nesse contexto, Oishi e colaboradores (2008) demonstraram a eficiência desse crioprotetor na conservação das células-tronco derivadas do tecido adiposo. Contudo, Roy e

colaboradores (2014), evidenciaram que a utilização do glicerol junto à sacarose na criopreservação das CT não foi eficaz quando comparado com a capacidade proliferativa das células não criopreservadas. Uma das limitações pode estar relacionada à maneira lenta com que o glicerol penetra nas células, dificultando sua ação efetiva na atenuação dos efeitos da desidratação (Meryman, 2007; Roy *et al.*, 2014). O outro reagente utilizado para crioproteção é o EG, que, assim como o DMSO, é incolor e inodoro, além de ser pouco volátil em temperatura ambiente, quando adicionado à água eleva o ponto de ebulição da mistura, ao mesmo tempo em que reduz o ponto de congelamento (Castro *et al.*, 2011). Em alguns estudos o EG foi utilizado junto ao DMSO com o intuito de atenuar o choque osmótico causado pelo DMSO, contribuindo para a melhor recuperação da célula e prevenindo apoptose (Imaizume *et al.*, 2014). Imaizume e colaboradores (2014) padronizaram uma solução de criopreservação composta por hidroxietil-amido (HES) e DMSO em salina, com 5% de EG, a qual apresentou um desempenho superior (80%) na recuperação das células-tronco pluripotentes humanas, quando comparada com o desempenho (20%) das formulações existentes no mercado. No entanto, ainda não se conhece o mecanismo de ação do EG na atenuação dos efeitos deletérios do DMSO sobre as células-tronco.

### Crioprotetores não permeáveis

Esse grupo de crioprotetores atua aumentando a osmolaridade do meio extracelular, promovendo a passagem de água do interior das células para o meio extracelular, o que impede a formação de cristais de gelo em seu interior durante o congelamento. Os agentes crioprotetores não penetrantes são moléculas com massa relativa alta, como os açúcares trealose e sacarose (Hunt *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2008). A utilização dos crioprotetores naturais está relacionada com a sua baixa toxicidade quando comparados ao DMSO, pois como já foi discutido, o uso do DMSO está relacionado com diversos efeitos nocivos quando as células-tronco são transplantadas para o hospedeiro. O mecanismo proposto para a ação desses dissacarídeos é baseado na capacidade dessas substâncias fornecerem uma maior proteção para a membrana celular devido a interação com os grupos de fosfolipídios da membrana plasmática (Rodrigues *et al.*, 2008; Balci e Can, 2013). A partir desses achados diversos estudos passaram a utilizar soluções de criopreservação contendo 30 mM/L de trealose, 2,5% de DMSO ou 60 mM/L de sacarose e 5% de DMSO. Os resultados foram semelhantes

aos das soluções nas quais foram utilizados apenas 10% de DMSO (Rodrigues *et al.*, 2008). Balci e Can (2013) relataram que soluções com concentração padrão de DMSO (10%) podem apresentar redução dos efeitos tóxicos se estiverem na presença de 100 mM de sacarose. Os resultados desse estudo comprovaram que o perfil proliferativo e imunofenotípico das células-tronco foram preservados. Estudos realizados por Solocinski e colaboradores (2017) demonstraram que a trealose quando adicionada as soluções de criopreservação, diminuem o tamanho dos cristais de gelo, atenuando os danos físicos causados pelo gelo intracelular.

### Taxa de Congelamento

Os procedimentos com resultados bem sucedidos para o congelamento de células e tecidos são de extrema importância para a terapia celular, e controlá-los é crucial e necessário, pois a quantidade de calor que é liberada no momento do resfriamento diminui severamente a população de células-tronco após o descongelamento. Atualmente existem protocolos que empregam equipamentos para controlar a taxa de congelamento. Dessa forma, o tempo de congelamento é igualmente distribuído entre as células, diminuindo os danos causados pelo procedimento (Marquez-Curtis *et al.*, 2015). Nesse procedimento de criopreservação controlado, as células-tronco do cordão umbilical, medula óssea, células do sangue periférico ou tecidos, Geleia de Wharton, tecido adiposo entre outros, sofrem diminuição de 1-2 °C/min (taxa ideal 1 a 3 °C/min) até atingirem -40 °C. Após atingir esta temperatura, a taxa de congelamento aumenta de forma mais rápida (3-5 °C/min), até chegar a -120 °C (Berz *et al.*, 2007). Outra forma de controlar o congelamento das células é através do uso de congeladores mecânicos. Com esses equipamentos, as células são inicialmente resfriadas a -4° C, depois transferidas para o *ultra low freezer* a -80 °C e logo após, transferidas para -120 °C (Berz *et al.*, 2007). Os estudos confirmaram que esse processo é seguro e que não há diferença de viabilidade entre os dois métodos, desde que as células sejam mantidas a -120° C até o momento do uso.

### Considerações finais

O número cada vez maior e diversificado de estudos com células-tronco vem ampliando as possibilidades de aplicações em várias terapias regenerativas. Conforme citado ao longo do texto, alguns desses procedimentos já foram utilizados em seres humanos. Novas metodologias estão sendo constan-

temente desenvolvidas e testadas, visando a regeneração de tecidos, e recuperação de pacientes de uma maneira mais rápida e sem sequelas. Muitos esforços estão sendo somados para que as células-tronco sejam preservadas qualitativa e quantitativamente após o processo de criopreservação, no intuito de garantir a disponibilidade tanto imediata quanto tardia dessas células nas aplicações clínicas. O alto custo e a escassez de bancos de criopreservação de células e tecidos limitam os tratamentos, ficando restrito às pessoas economicamente privilegiadas. Acreditamos que o aperfeiçoamento das técnicas de criopreservação permitirá a disponibilização desses tratamentos com baixos custos, beneficiando a sociedade como um todo, através dos serviços públicos de saúde.

### Referências Bibliográficas

- Balci D, Can A. 2013. The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking. *Current stem cell research & therapy*, 8(1): 60-72.
- Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. 2007. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *American Journal of Hematology*. 82(6): 463-472.
- Castro SV, Carvalho AA, Silva CM, Da Silva CMG, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues APR. 2011. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 39(2): 1-18.
- Chatzistamatiou TK, Papassavas AC, Michalopoulos E, Gamaloutsos C, Mallis P, Gontika I, Panagouli E, Koussoulakos SL, Stavropoulos-Giokas C. 2014. Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Whartons jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: An MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*, 54(12): 3108-3120.
- Cui XD, Gao DY, Fink BF, Vasconez HC, Pu LLQ. 2007. Cryopreservation of human adipose tissues. *Cryobiology*, 55(3): 269-278.
- Da-Croce L, Gambarini-Paiva GHR, Angelo PC, Bambilra EA, Cabral ACV, Godard ALB. 2013. Comparison of vitrification and slow cooling for umbilical tissues. *Cell and Tissue Banking*, 14(1): 65-76.
- Fischbach GD, Fischbach RL. 2004. Stem cells: Science, policy, and ethics. *Journal of Clinical Investigation*, 114(10): 1364-1370.
- Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, Cooper S, English D, Kurtzberg J, Bard J, Boyse EA. 1989. Hematopoietic reconstitution in a patient with fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an hla-identical sibling. *N engl j med*, 321: 1174- 1178.
- Hunt CJ. 2011. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: A review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 38(2): 107-123.
- Imaizumi K, Nishishita N, Muramatsu M, Yamamoto T, Takenaka C, Kawamata S, Kobayashi K, Nishikawa S, Akuta T. 2014. A Simple and Highly Effective Method for Slow-Freezing

- Human Pluripotent Stem Cells Using Dimethyl Sulfoxide, Hydroxyethyl Starch and Ethylene Glycol. *PLoS ONE*, 9(2): e88696.
- Lauterboeck L, Wolkers WF, Glasmacher B. 2016. Cryobiological parameters of multipotent stromal cells obtained from different sources. *Cryobiology*, xxx: 1-10.
- Li Y, Tan J-C, Li L-S. 2010. Comparison of three methods for cryopreservation of human embryonic stem cells. *Fertility and sterility*, 93(3): 999-1005.
- Li Y, Ma T. 2012. Bioprocessing of cryopreservation for large-scale banking of human pluripotent stem cells. *BioResearch open access*, 1(5): 205-14.
- Liu G, Zhou H, Li Y, Li G, Cui L, Liu W, Cao Y. 2008. Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Cryobiology*, 57(1): 18-24.
- Ma L, Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Hoshino Y, Song G, Kukita T, Nonaka K, Shi S, Yamaza T. 2012. Cryopreserved Dental Pulp Tissues of Exfoliated Deciduous Teeth Is a Feasible Stem Cell Resource for Regenerative Medicine. *PLoS ONE*, 7(12).
- Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JAW. 2015. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. Academic Press Inc, 71(2): 181-197.
- Meryman HT. 2007. Cryopreservation of living cells: Principles and practice. *Transfusion*, 47(5): 935-945.
- Miyazaki T, Suemori H. 2014. Cryopreservation of human pluripotent stem cells: a general protocol. *Methods in molecular biology*, 1235: 97-104.
- Motta JPR, Gomes BE, Bouzas LF, Paraguassú-Braga FH, Porto LC. 2010. Evaluations of bioantioxidants in cryopreservation of umbilical cord blood using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. *Cryobiology*, 60(3): 301-307.
- Oishi K, Noguchi H, Yukawa H, Miyazaki T, Kato R, Kitagawa Y, Ueda M, Shuji H. 2008. Cryopreservation of mouse adipose tissue-derived stem/progenitor cells. *Cell Transplantation*, 17(1-2): 35-41.
- Park I-H, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451(7175): 141-6.
- Pereira LC, Queiroz PR. 2013. Terapia celular em tratamento de doenças do sistema nervoso. *Universitas: Ciências da Saúde*, 11(1): 29-41.
- Ramalho-Santos M, Willenbring H. 2007. On the Origin of the Term "Stem Cell." *Cell Stem Cell*, 1(1), 35-38.
- Rodrigues JP, Paraguassú-Braga FH, Carvalho L, Abdelhay E, Bouzas LF, Porto LC. 2008. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cryobiology*, 56(2): 144-151.
- Roy S, Arora S, Kumari P, Ta M. 2014. A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Whartons jelly mesenchymal stem cells. *Cryobiology*, 68(3): 467-472.
- Santis GCD, Prata KDL. 2009. Criopreservação de células progenitoras hematopoéticas. *Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP*, 42(1): 36-47.
- Simões BP, Pieroni F, Barros GMN, Machado CL, Cañado RD, Salvino MA, Angulo I, Voltarelli JC. 2010. Consenso Brasileiro em Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas: Comitê de Hemoglobinopatias. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 32(1): 46-53.
- Solocinski J, Osgood Q, Wang M, Connolly A, Menze MA, Chakraborty N. 2017. Effect of trehalose as an additive to dimethyl sulfoxide solutions on ice formation, cellular viability, and metabolism. *Cryobiology*, xxx: 1-10.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5): 861-872.
- Precht H, Christophersen J, Hensel H, Larcher W. 1973. *Temperature and life* (1a ed.). Verlag Berlin Heidelberg New York: Springer.
- Voltarelli JC, Stracieri ABPL. 2000. Aspectos imunológicos dos transplantes de células-tronco hematopoéticas. *Medicina*, 33: 443-462.
- Voltarelli J. 2002. Transplante de células tronco hematopoéticas para doenças auto-imunes no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 24(1): 9-13.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858): 1917-1920.
- Zorzanelli RT, Speroni AV, Menezes RA, Leibing A. 2015. Pesquisa com células-tronco no Brasil: a produção de um novo campo científico. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 20(2): 653-673.

# Adaptação de método de levantamento fitossociológico para determinação da biodiversidade de organismos bentônicos de costões rochosos

Adaptation of a phytosociological survey method to determine the biodiversity of benthic organisms of rocky coastlines

**Bruna Roberta Toillier\***; **Daiane Cristina de Moura**; **Jéssica Severo Ferreira**; **Karla Puntel Rosa**

Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil.

\*Contato: brunat@mx2.unisc.br

**Resumo.** Áreas litorâneas abrigam uma grande biodiversidade de organismos bentônicos e levantamentos sobre essas espécies são importantes. Assim objetivamos avaliar a eficácia da adaptação do método Braun-Blanquet (BB), associado ao Método de Parcelas (MP), para determinar a biodiversidade incrustante encontrada em substratos rochosos. Realizou-se em conjunto o MP e o BB com adaptações. Através do MP realizaram-se cálculos de Frequência Absoluta (FA) e Frequência Relativa (FR). O MP identificou 44.055 indivíduos, dentre 6 táxons, e pelo método de BB, quantificaram-se ainda outros seis táxons. A cobertura (%) mais elevada foi de *Perna perna*, *Chlorophyta* e *Megabalanus* sp. Através de levantamentos como este, torna-se possível reconhecer as espécies na área de interesse, possibilitando adoção de estratégias de manejo que visem a sua conservação.

**Palavras-chaves.** Técnicas de amostragem; adaptação de método; métodos de levantamento

**Abstract.** Coastal areas harbor a great biodiversity of benthic organisms and surveys on these species are important. Thus, we evaluated the effectiveness of the Braun-Blanquet (BB) method, associated with the Parcels' Method (PM), to determine the fouling biodiversity found in rocky substrates. The PM and the BB were performed with adaptations. Through the PM, calculations of Absolute Frequency (AF) and Relative Frequency (RF) were performed. The PM identified 44,055 individuals out of 6 taxons, and using the BB method, six other taxons were quantified. The highest coverage (%) was *Perna perna*, *Chlorophyta* and *Megabalanus* sp. Through surveys such as this one, it is possible to recognize the species in the area of interest, allowing the adoption of management strategies aimed at its conservation.

**Keywords.** Sampling techniques; Adaptation of method; Survey methods

## Introdução

O litoral catarinense equivale a 7% de toda a área costeira do Brasil, e abriga inúmeras espécies de flora e fauna, muitas das quais endêmicas e/ou ameaçadas de extinção (Brasil, 2012). Dentre os invertebrados encontrados nessas áreas existem inúmeras espécies sésseis, que se apresentam incrustadas sobre costões rochosos e substratos artificiais, consolidando os ecossistemas marinhos por apresentarem uma alta biodiversidade e produtividade, devido ao aporte de nutrientes disponíveis nesses locais. Esses organismos sofrem estresse quanto à perda de água, minerais, luminosidade, entre outros, além das interações ecológicas, que causam o efeito de zonação, ocupando faixas horizontais definidas (Moreno e

Rocha, 2012).

Conforme Rosenberg e Resh (1993), os organismos que encontram-se aderidos aos costões rochosos são conhecidos como organismos bentônicos, pois habitam o fundo de ecossistemas aquáticos durante pelo menos parte de seu ciclo de vida, associado aos mais diversos tipos de substratos, tanto orgânicos (folhiço, macrófitas aquáticas), quanto inorgânicos (cascalho, areia, rochas). Ainda, segundo Oliveira e Manso (2016) estudos iniciais sobre a comunidade bentônica são datados de 1937 e foram realizados com objetivo de analisar os fatores bióticos e abióticos que influenciam o estabelecimento de uma comunidade em substratos consolidados. De acordo com Coutinho e Zalmon (2009), os afloramentos rochosos são considerados muito relevantes,

Recebido:  
10out2016  
Aceito:  
13jul2017  
Publicado:  
25ago2017

Editado por  
Francisco  
Vasconcelos e  
revisado por  
Anônimo

por apresentarem uma grande riqueza de espécies de importância ecológica e econômica. Para Agostini e Ozório (2011), a fauna dos costões rochosos fornece recursos para a pesca, turismo, biodiversidade e produtividade local e o seu conhecimento subsidia projetos de manejo e conservação dos ecossistemas costeiros.

Ainda, conforme Coutinho e Zalmon (2009) citam, os afloramentos rochosos são considerados muito relevantes por apresentarem uma grande riqueza de espécies de importância ecológica e econômica. Para Agostini e Ozório (2011), a fauna dos costões rochosos fornece recursos para a pesca, turismo, biodiversidade e produtividade local e o seu conhecimento subsidia projetos de manejo e conservação dos ecossistemas costeiros. Barbosa *et al.* (2016) também evidenciam a importância que essas espécies possuem por apresentarem sensibilidade a alterações no seu habitat, sendo amplamente utilizados como indicadores da qualidade de ambientes costeiros.

Conforme Agostini e Ozório (2011) e Vermeji (2006), a distribuição dessas espécies em substratos consolidados é influenciada por fatores abióticos e bióticos que induzem a formação de zonas. Para Días-Pulido *et al.* (2004), geralmente os fatores que determinam a distribuição desses organismos são processos históricos, condições ambientais e relações entre as espécies predominantes, além das interações interespecíficas e intraespecíficas como predação, competição e mutualismo.

Como Ferreira, Ruiz e Aguiar (2017) citam, os macroinvertebrados bentônicos são comumente utilizados como bioindicadores, uma vez que sua distribuição é influenciada por inúmeros parâmetros ambientais, possuindo desde comunidades com alta tolerância a ambientes poluídos até organismo com baixa resistência a poluição.

Conforme Queiroz, Trivinho e Nascimento (2000), a utilização de bioindicadores da qualidade da água apresenta-se mais vantajosa quando comparada a métodos convencionais, uma vez que apresentam maior rapidez e eficácia na obtenção de resultados, além de apresentarem baixo custo e possibilitar a avaliação *in situ*. Uma das possibilidades de utilização desses organismos bioindicadores, conforme apontado por Pusceddu (2016), é na avaliação da contaminação de ecossistemas marinhos por compostos químicos emergentes como fármacos e produtos de cuidados especiais, que provocam sérios danos ao meio ambiente quando descartados de forma indevida.

Além de apresentarem importância na avaliação ambiental, os organismos bentônicos possuem

um papel central na dinâmica dos ecossistemas aquáticos, participando ativamente dos processos de mineralização e reciclagem de matéria orgânica (Lind *et al.*, 1993).

Dentre as espécies marinhas bentônicas, o filo Mollusca destaca-se pela sua grande biodiversidade, apresentando importância sob vários aspectos da vida humana como, por exemplo, na alimentação (Lopes e Fonseca, 2008). Destaca-se também a importância econômica, tendo em vista que a produção de moluscos em 2014 no estado de Santa Catarina envolveu 610 maricultores e atingiu 21.554 toneladas, sendo que 17.853 toneladas de mexilhão (*Perna perna*); 3.670t de ostras (*Crassostrea gigas*) e 30,2t de vieiras (*Nodipecten nodosus*). Além disso, a estimativa econômica da comercialização de moluscos na concha movimentou R\$ 70.084.887,20 (Santos e Costa, 2014).

Levantamentos sobre essas espécies são importantes para definir a comunidade biológica presente nesses locais, possibilitando um maior conhecimento e a conservação das mesmas. Porém, estudos sobre a biodiversidade e ecologia de organismos bentônicos e incrustantes sobre substratos rochosos são escassos e limitados por análises descritivas, devido à inexistência de metodologias de amostragens específicas para tais estudos (Moreno e Rocha, 2012).

Entre os métodos mais utilizados está o Método de Parcelas, no qual o levantamento se dá por observação direta e contagem dos incrustantes presentes no espaço delimitado. Porém, organismos bentônicos comumente formam colônias e dificultam o processo de contagem. Sendo assim, para tais indivíduos utilizou-se uma adaptação do Método de Braun-Blanquet (1979), correlacionando as espécies quanto ao nível de cobertura do substrato analisado.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar o levantamento da comunidade bentônica no costão rochoso da praia de Porto Belo, Santa Catarina, Brasil, procurando estabelecer a importância da utilização do Método de Braun-Blanquet (1979) adaptado associado ao Método de Parcelas. O levantamento ocorreu no mês de março de 2015, e a identificação das espécies foi realizada *in loco*.

## Material e Métodos

Para a avaliação da biodiversidade encontrada sobre as rochas da praia de Porto Belo, SC, Brasil, foram realizadas adaptações de dois métodos de levantamento, sendo eles o Método de Parcelas e o Método de Braun-Blanquet (1979).

Originalmente, estes métodos são aplicados em levantamentos de espécies vegetais com a

intenção de se quantificar e avaliar a biodiversidade encontrada. No Método de Parcelas, são definidos quadrantes (cuja metragem é definida conforme necessidade da pesquisa) sendo identificado e contabilizado todos os organismos de interesse do pesquisador conforme objetivo de seu estudo, dentro da referida parcela. Já no Método de Braun-Blanquet (1979), é definida a densidade e o número de indivíduos da população por unidade de área, fazendo-se uso de uma escala de abundância (1 a 5, sendo 1 o nível mais escasso e 5 o mais abundante). Neste método a determinação pode ser feita em várias unidades amostrais (por meio de quadrantes) dentro da comunidade (Guimarães *et al.*, 1992).

Na adaptação realizada, para a referida pesquisa, avaliou-se a abundância de organismos incrustantes encontrados sobre rochas da praia de Porto Belo, SC, no qual realizou-se o levantamento em todas as partes acessíveis de 12 rochas representativas e localizadas aleatoriamente, aferindo-se parcelas de 10x20cm a partir de uma linha reta medida do topo da rocha até a base. Com uma trena mediu-se a altura da rocha desde o local onde se encontravam os primeiros organismos até aproximadamente 10 a 30 cm abaixo da água. Observou-se a incidência de cada espécie nas referidas parcelas, a fim de se estimar o número de indivíduos encontrados de diferentes espécies se desenvolvendo sobre a rocha.

No total foram analisadas 164 parcelas, das quais se quantificou os indivíduos. Adaptou-se o método de Braun-Blanquet (1979) para os demais organismos bentônicos, sendo o método originalmente utilizado para quantificar cobertura vegetal terrestre. Usou-se a mesma aplicação, porém sobre rochas, quantificando, em percentual, os organismos presentes conforme escala (Tabela 1). Através da utilização da escala proposta por Braun-Blanquet (1979) foi

possível relacionar a cobertura e a abundância das espécies, bem como de rocha livre, ou seja, com ausência de organismos macroscópicos. Para esse método dividiu-se a área acessível da rocha em porções, também, de 10x20cm.

É preciso salientar que o uso combinado destes dois métodos viabiliza a quantificação de organismos bentônicos incrustantes sobre os costões rochosos, ou seja, uma avaliação mais completa da biodiversidade encontrada nestes ambientes, visto que a distribuição vertical das espécies nas rochas é afetada por diversos fatores físicos, como luminosidade e temperatura, oscilação e intensidade das marés, ação das ondas, salinidade, além da topografia e do tipo de substrato (Moreno e Rocha, 2012).

A identificação das espécies foi realizada até o nível taxonômico possível *in loco*. Todas as rochas encontravam-se parcialmente submersas, com altura média de 1,4 m.

Através dos dados obtidos aplicando-se o Método de Parcelas realizaram-se os cálculos de Frequência Absoluta (FA) e Frequência Relativa (FR). Sendo os cálculos da seguinte forma:

- Frequência Absoluta (FA): descritor do número de observações realizadas e expressa em forma de porcentagem.

$$FA = \frac{n}{N} \times 100$$

onde:

n=número de unidades amostrais em que a espécie ocorre

N=número total de unidades amostradas

- Frequência Relativa (FR): aponta a intensidade de ocorrência de uma determinada espécie na

**Tabela 1.** Escala de Braun-Blanquet (1979) utilizada para aferir a abundância.

<b>Escala</b>	<b>Porcentual de cobertura</b>
<b>R</b>	<b>Indivíduos solitários</b>
<b>+</b>	<b>&lt; 5%, poucos indivíduos</b>
<b>1</b>	<b>&lt; 5%, vários indivíduos</b>
<b>2</b>	<b>5-25%</b>
<b>3</b>	<b>25-50%</b>
<b>4</b>	<b>50-75%</b>
<b>5</b>	<b>75-100%</b>

Fonte: Braun-Blanquet (1979).

área, expressa em porcentagem.

$$FR = \frac{f}{n} \times 100$$

onde:

f=frequência absoluta da espécie

n=número total de espécies

## Resultados

O levantamento de organismos incrustantes através do Método de Parcelas culminou na identificação de 6 táxons distintos, ao total foram identificados 44.055 indivíduos, com a predominância, de *Perna perna* e *Megabalanus* sp. (Tabela 2).

**Tabela 2.** Abundância de todos os organismos identificados através do Método de Parcelas.

Taxons	Total
<i>Perna perna</i>	<b>21.750</b>
<i>Megabalanus</i> sp.	<b>19.421</b>
<i>Collisella</i> sp.	<b>2.337</b>
<i>Crossostrea</i> sp.	<b>208</b>
<i>Littorina ziczac</i>	<b>201</b>
<i>Dosinia concentrica</i>	<b>138</b>
<b>Total</b>	<b>44.055</b>

Pela adaptação do método de Braun-Blanquet (1979), foi possível quantificar percentualmente todas as espécies bentônicas, além dos 6 táxons já encontrados pelo método de parcelas, foram encontrados outros 6 táxons (Tabela 3).

A cobertura medida através da porcentagem de todas as rochas, possibilitou averiguar os organismos que apresentaram a cobertura mais elevada de todas as rochas amostradas, sendo eles *Perna perna*, Chlorophyta, *Megabalanus* sp., além de mostrar que aproximadamente 38% de todas as rochas não apresentavam nenhum organismo macroscópico. Já a cobertura medida em centímetros possibilitou a quantificação da área que cada organismo ocupou ao total.

A frequência absoluta mostra que nem sempre os organismos com maior cobertura são os mais frequentes, assim *Megabalanus* sp., *Perna perna* e Chlorophyta, nessa ordem, prevaleceram quanto às parcelas amostradas. A frequência relativa aponta os mesmos organismos como os mais comuns, porém em razão de todos os organismos encontrados.

## Discussão

A distribuição vertical bem definida das espécies, em que organismos bentônicos predominaram nas porções submersas de cada rocha, e em que organismos incrustantes prevaleceram nas regiões banhadas esporadicamente, se deve a fatores físicos e interações ecológicas dos habitantes do costão. O ciclo de emersão e submersão a que são submetidos promove adaptações nos organismos expostos à essas condições, criando um padrão de zonação. Na faixa superior a distribuição é determinada principalmente por fatores abióticos, como temperatura, radiação solar e a força mecânica das ondas, já nas faixas basais a distribuição dos organismos é influenciada principalmente pelas interações biológicas, competição, predação e herbivoria (Moreno e Rocha, 2012).

Devido a esse padrão de zonação dificilmente um único método avaliaria de maneira eficiente toda a biodiversidade encontrada nos costões rochosos. Porém, com o uso conjunto do método de parcelas e da adaptação do método de Braun-Blanquet a caracterização de todos os indivíduos, tanto bentônicos quanto incrustantes, foi alcançada, caracterizando, ainda, de maneira mais específica e realista a distribuição das espécies no substrato rochoso.

Assim, constatamos um elevado índice de algas e organismos incrustantes sobre as rochas, ocasionado pelo batimento constante das ondas, que favorece organismos que se fixam firmemente sobre as rochas, por meio de estruturas como apressórios, bissos em mexilhões e substâncias cimentantes em cracas (Moreno e Rocha, 2012).

Foram encontradas poucas colônias de esponjas e briozoários, organismos sésseis, filtradores e potenciais bioindicadores de poluição, revelando a degradação do ambiente analisado (Hajdu *et al.*, 2011). Conforme Heyse (2012), os briozoários apesar de serem pouco conhecidos tanto em Santa Catarina quanto no Brasil, podem fornecer informações sobre as condições de um ecossistema. Breves *et al.* (2005) e Winston (2007) relatam que esses organismos respondem às diferentes alterações ambientais como, por exemplo, eutrofização e contaminação por metais pesados, ou ainda à temperatura e presença de nutrientes (O'Dea e Okamura, 1999).

Além da degradação do ambiente, outros dois fatores podem justificar a baixa frequência de colônias de esponjas e briozoários: o erro na escolha do método de levantamento ou ainda o erro na escolha do período do ano em que o mesmo foi realizado.

Acredita-se que de todos os fatores listados, a degradação ambiental seja determinante para a bai-

**Tabela 3.** Área de cobertura, frequência absoluta e relativa, e índice dos organismos identificados através do Método de Braun-Blanquet (1979).

Taxons	Cobertura (%)	Cobertura (cm <sup>2</sup> )	FA (%)	FR (%)	Escala de BB
Rocha livre	37.70	12365.60	5.48	45.67	3
<i>Perna perna</i>	21.32	6992.96	60.97	508.08	2
Chlorophyta	19.93	6537.04	36.58	304.83	2
<i>Megabalanus sp.</i>	15.26	5005.30	71.34	594.50	2
<i>Collisella sp.</i>	2.76	905.28	35.97	299.75	+
<i>Ulva sp.</i>	1.21	396.88	3.65	30.42	+
<i>Crossostrea sp.</i>	0.60	196.80	12.80	106.66	+
Rhodophyta	0.60	196.80	1.82	15.17	+
<i>Littorina ziczac</i>	0.22	72.16	7.31	60.91	+
<i>Dosinia concentrica</i>	0.19	62.32	9.75	81.25	+
Poríferos	0.10	32.80	7.92	66.00	+
Briozoários	0.08	26.24	6.09	50.75	+
<i>Sargassum sp.</i>	0.03	9.84	3.65	30.42	+
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>32.800</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	

**Legenda.** FA – Frequência Absoluta; FR – Frequência Relativa; BB – Braun-Blanquet.

xa frequência de colônias de esponjas e briozoários na praia de Porto Belo, uma vez que no município o sistema de tratamento de esgoto correspondeu a apenas 37,5% no ano de 2013 conforme os dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (Snis, 2013). Dalla Vecchia (2009) em seu estudo sobre a avaliação da contaminação antropogênica na enseada de Porto Belo, percebeu um aporte significativo de derivados do petróleo e princípio de contaminação por esgoto doméstico nesse local através da utilização de biomarcador.

Em relação as espécies com maior frequência, os dois métodos de levantamento revelaram que *Perna perna*, uma espécie de mexilhão, e *Megabalanus sp.*, popularmente conhecidos como craca, apresentaram maiores índices de cobertura, bem como estavam em maior quantidade de indivíduos, evidenciando outra vez, a possibilidade da utilização em conjunto dos dois métodos.

Conforme Cangussu *et al.* (2007), o estado de Santa Catarina é responsável pela maior parte da produção de mexilhões do Brasil e os cultivos são frequentemente colonizados por cracas. *Megabalanus* distribui-se no litoral sul e sudeste, no médio litoral, franja e infralitoral, até 20 metros de profundidade, crescendo normalmente sobre o mexilhão *Perna per-*

*na*, o que explica a alta frequência dessas duas espécies (Abreu *et al.*, 2009). Esse resultado, mais uma vez revela os impactos ao ambiente ocasionado por ações humanas.

Além disso, o mexilhão *Perna perna* inspira preocupação às espécies nativas do local, pois além de competir diretamente com as demais espécies, pode ser introduzido via água de lastro e/ou incrustações em cascos de navios (Souza *et al.*, 2016).

Ademais, Young (1995) denomina a espécie *Megabalanus coccopoma* como uma espécie introduzida e que vem competindo diretamente com a espécie nativa *M. tintinnabulum*, sendo a sua invasão registrada para a costa de Santa Catarina desde 1961 (Young, 2000).

No presente estudo, as espécies incrustantes como *Megabalanus sp.* e *Perna perna* foram encontradas em rochas banhadas esporadicamente, como consequência da zonação. Resultados semelhantes foram encontrados por Cangussu *et al.* (2007), que também observaram maior abundância e frequência das espécies *Megabalanus spp.*, porém para a praia de Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina.

O levantamento também apontou a ocorrência significativa de representantes do táxon Chlorophyta, o que pode estar relacionado à ineficiência

no tratamento de esgoto doméstico como já mencionado anteriormente. Conforme Esteves (1998), entre as consequências do lançamento direto de esgoto doméstico e industrial nos recursos hídricos está a eutrofização, fenômeno que provoca o acúmulo de matéria orgânica em decomposição, acarretando no excesso da quantidade de macro e microalgas. Além disso, um laudo recente emitido por pesquisadores da Universidade do Vale do Itajaí (Univali) aponta que o despejo de esgoto doméstico diretamente na Lagoa e Rio Perequê provocou a proliferação de microalgas na Praia do Perequê em Porto Belo. Conforme esse mesmo laudo, a alta concentração de nutrientes orgânicos ficou evidenciada em altos valores dos nutrientes como  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  (UNIVALI, 2016), outro fator, que nos leva a apontar os problemas ambientais ocasionados por atividades humanas.

É preciso ressaltar que o uso conjunto do Método de Braun-Blanquet adaptado e do Método de Parcelas foi possível caracterizar todos os organismos associados aos costões rochosos. A adoção de diferentes métodos para a caracterização da biodiversidade é bastante utilizada para o levantamento de outros organismos. Por exemplo, Auko e Silvestre (2013), empregaram três métodos diferentes para o inventário da diversidade de vespas na Serra da Bodoquena, sendo estes o método de Coleta Ativa, Möericke e Armadilha de Malaise. Para o levantamento de mamíferos, Santos *et al.* (2008), também utilizaram métodos complementares, sendo estas amostragens de campo por registros diretos (visualização) e indiretos (fezes, odor, pegadas e restos mortais), captura manual e com auxílio de puçá ou redes-de-neblina, além da complementação dos dados com registros de uma coleção científica. Já Toledo, Zina e Haddad (2003) em seus estudos sobre a distribuição espacial e temporal de anuros utilizaram em conjunto o método de observação a pé e o método de observação dirigida, ou seja, com auxílio de automóvel, e concluíram que ambos, também, se complementaram.

## Conclusão

Apesar das comunidades bentônicas apresentarem sua composição e estrutura associadas às suas relações interespecíficas com o meio ambiente, estudos recentes com essas comunidades são escassos, provavelmente relacionados à inexistência de métodos eficazes de amostragem.

Neste sentido, determinamos a biodiversidade de organismos bentônicos sobre costões rochosos da praia de Porto Belo, Santa Catarina/SC, através da

utilização do Método de Parcelas e de uma adaptação do Método de Braun-Blanquet. A utilização conjunta destas duas metodologias se mostrou eficiente, sendo que pelo método de parcelas identificamos 6 táxons, já pela adaptação do método de Braun-Blanquet (1979) além desses táxons, foi possível quantificar percentualmente outros 6 táxons.

Portanto, a utilização combinada do Método de Parcelas e da adaptação do Método de Braun-Blanquet proposta no presente artigo torna viável a realização de levantamentos de todos os tipos de organismos bentônicos, reconhecendo as espécies ocorrentes na comunidade local, permitindo a adoção de estratégias de manejo que visem a sua conservação.

## Referências Bibliográficas

- ABREU, N.; PITOMBO, F.; GUSMAO, J. Análise Preliminar de polimorfismos mitocondriais para estudo populacional de *Megabalanus vesiculosus* (Crustacea-Cirripedia), uma espécie endêmica brasileira. In: Congresso Brasileiro de Genética, 55, 2009, Águas de Lindoia. Resumos. Águas de Lindoia, 2009.
- AGOSTINI, V. O.; OZÓRIO, C. P. Zonação dos macroinvertebrados bentônicos em costão rochoso, Praia Do Meio, Torres, RS, Brasil. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DO MAR, 14 Balneário Camboriú, 2011.
- AUKO, T.H.; SILVESTRE, R. Composição faunística de vespas (Hymenoptera: Vespoidea) na Floresta Estacional do Parque Nacional da Serra da Bodoquena, Brasil. *Biota Neotrop.* vol.13 no.1 Campinas Jan./Mar. 2013.
- BARBOSA, F. M.; COUTO, B. M.; PINHO, S. J.; SOUZA, G. B. Utilização do anfioxo *Branchiostoma caribaeum* como indicador de contaminação por efluentes domésticos na praia da Ribeira, (Salvador - BA). In: CONGRESSO BAIANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 4, 2016, Cruzes das Almas.
- BRAUN-BLANQUET, J. (1979) - Fitossociologia. Bases para el estudio de las comunidades vegetales. Ed. Blume. Madrid.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO). Conservação da Biodiversidade na Zona Costeira e Marinha de Santa Catarina. Santa Catarina. 2012
- BREVES-RAMOS, A.; LAVRADO, H. P.; JUNQUEIRA, A.; SILVA, S. Succession in rocky intertidal benthic communities in areas with different pollution levels at Guanabara Bay (RJ-Brazil). *Braz. Arch. Biol. Technol.* [S.l.], n. 48, p. 951- 965, 2005.
- CANGUSSU, L.; KREMER, L.; ROCHA, R.; PITOMBO, F.; HEYSE, H.; BORNANCIN, E. Cracas (Cirripedia, Balanomorph) introduzidas em um cultivo de mexilhões: composição de espécies e potencial invasor. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8, 2007, Caxambu. Anais...Caxambu: 2007, 2p.
- COUTINHO, R., & ZALMON, I. R. (2009). Os Bentos de costões rochosos. In R. C. Pereira & A. Soares-Gomes (Ed.). *Biologia Marinha* (pp. 281-298). Rio de Janeiro: Interciência.
- DALLA VECHIA, Isadora. Uso de biomarcadores geoquímicos na avaliação da contaminação antropogênica na enseada

- de Porto Belo, SC. 2009. 47 f. Relatório (Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- DÍAS-PULIDO, G.; SÁNCHEZ, J. A.; ZEA, S.; DÍAS, J. M.; GARZÓN, J. Esquemas de distribución, espacial el la comunidad bentónica de arrecifes coralinos continentales y oceánicos del Caribe colombiano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, Bogotá, v. 28, n. 108, p. 337-347, 2004.
- ESTEVES, Francisco de Assis. Fundamentos de limnologia. Rio de Janeiro: Interciência. 1988.
- FERREIRA, P. V.; RUIZ, M. V.; AGUIAR, C. M.; Influência do uso e ocupação do solo na qualidade ambiental do Córrego Lagoinha, em Uberlândia (MG). *Fórum Ambiental da Alta Paulista, Tupã*, v. 13, n. 1, p. 25-36, 2017.
- GUIMARÃES, P.E.P.; MACHADO, J.R.A.; GUIMARÃES, L.J.M. Plotagem em quadrantes para estudos de adaptabilidade e estabilidade em pares de grupos de ambientes. *Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. Sete Lagoas-MO*, 1992.
- HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; FERNANDEZ, JÚLIO C.C. *Esponjas Marinhas da Bahia – Guia de Campo e Laboratório*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2011.
- HEYSE, Halina. Briozoários como bioindicadores de qualidade ambiental na Baía da Babitonga, Santa Catarina. 2010. 113 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- LIND, O. T.; TERRELL, T. T.; KIMMEL, B. L. Problems in reservoir trophic-state classification and implications for reservoir management. *Comparative Reservoir Limnology and Water Quality Management*, [S.l.], v. 77, p. 57-67, 1993.
- LOPES, S. G.; FONSECA, M. L. O Mexilhão Perna perna (Linnaeus, 1758) – Taxonomia, Morfologia e Anatomia Funcional. In: RESGALLA Jr, C.; WEBER, L. I.; CONCEIÇÃO, M.B. (Org.). *O Mexilhão Perna perna (L) – Biologia, Ecologia e Aplicações*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. p. 1-23.
- MORENO, T.R.; ROCHA, R.M. Ecologia de costões rochosos. *Estud. Biol., Ambiente Divers.* 2012 jul./dez., 34(83), 191-201.
- O'DEA, A., OKAMURA, B. Influence of seasonal variation in temperature, salinity and food availability on module size and colony growth of estuarine bryozoan *Conopeum seurati*. *Mar. Biol.*, [S.l.], n. 135, p. 581-588, 1999.
- OLIVEIRA, J.; MANSO, C. Caracterização da macrofauna bentônica dos substratos consolidados da Praia do Mosqueiro, Aracaju, Sergipe, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 14, n. 2, p. 80-96, 2016.
- PUSCEDDU, Fabio Hermes. Avaliação do risco ambiental de sedimentos contaminados com Triclosan, Ibuprofeno, e 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol empregando invertebrados marinhos bentônicos. 2016. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de Tecnologia nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2016.
- QUEIROZ, J. F.; TRIVINHO, S.; NASCIMENTO, V. M. Organismos bentônicos bioindicadores da qualidade das águas da bacia do médio São Francisco. *Comunicado Técnico – Embrapa Meio Ambiente*, n. 3, 2000.
- ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. Introduction to freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. In: \_\_\_\_\_. *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. New York: Chapman and Hall, 1993. p. 1-9.
- SANTOS, A. A.; COSTA, S. W. Síntese informativa da maricultura 2014. Florianópolis: EPAGRI/CEDAP, 2014. Disponível em: <<http://biblioteca.epagri.sc.gov.br/>>. Acesso em: 20 jan. 2017.
- SANTOS, T.G.; SPIES, M.R.; KOPP, K.; et al. Mamíferos do campus da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biota Neotrop.* vol.8 no.1 Campinas Jan./Mar. 2008.
- SOUZA, R. C. C. L. et al. Perna perna (Linnaeus, 1758): um possível caso de bioinvasão no litoral brasileiro. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/174/\\_arquivos/174\\_05122008111317.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/174/_arquivos/174_05122008111317.pdf)>. Acesso em: 18/08/2016.
- TOLEDO, Luís Felipe; ZINA, Juliana; HADDAD, Célio F. B. Distribuição Espacial e Temporal de uma Comunidade de Anfíbios Anuros do Município de Rio Claro, São Paulo, Brasil. *Holos Environment*, v. 3, n. 2, 2003 – P. 136-149.
- UNIVALI. Pesquisadores concluem laudo sobre mancha no Rio Perequê. 2016. Disponível em: <<http://www.univali.br/imprensa/noticias/Paginas/pesquisadores-da-univali-concluem-laudo-sobre-mancha-no-rio-pereque.aspx>>. Acesso em: 14 ago. 2016.
- WINSTON, Judith. Diversity and distribution of bryozoans in the Pelican Cays, Belize, Central America. *Atoll Res. Bull* [S.l.], n. 546, 1-24, 2007.
- VERMEJI, Mark. Early life-history dynamics of Caribbean coral species on artificial substratum: the importance of competition, growth and variation in life-history strategy. *Coral Reefs*, [S.l.], v. 25, p. 59-71, 2006.
- YOUNG, Paulo. Cirripedia thoracica (Crustacea) collected during the Campagne de La Calypso (1961-1962) from the Atlantic shelf of South America. [S. l.], *Zoosystema*, v. 22, n. 1, 2000.
- YOUNG, Paulo. New interpretations of South American patterns of barnacle distribution. In: SCHRAN, F.; HOEG, T. *New frontiers in barnacles evolution*. [S. l.], *Crustacean Issues*, 1995. p. 229-253.
- SNIS – Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. *Série Histórica*, 2013. Disponível em: <<http://app.cidades.gov.br/serieHistorica/#>>. Acesso em: 12 set. 2016.

