



Tópicos Especiais em Ciência Animal X



ORGANIZADORES

JULIANA ALVES RESENDE

MARIA APARECIDA DA SILVA

LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN

LEONARDO DEMIER CARDOSO

PPGCV

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

GCAE-UFES



JULIANA ALVES RESENDE
MARIA APARECIDA DA SILVA
LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN
LEONARDO DEMIER CARDOSO

(ORGANIZADORES)

TÓPICOS ESPECIAIS EM CIÊNCIA ANIMAL X

1ª EDIÇÃO

ALEGRE-ES

CAUFES

2021

CCAUE-UFES

Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo

Alto Universitário, s/n, Guararema, Alegre-ES

Telefone: (28) 3552-8955 – Fax (28) 3552-8903

www.alegre.ufes.br/ccae

ISBN: 978-65-86981-19-3

Editor: CAUFES

Dezembro 2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial Sul da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

T674 Tópicos especiais em ciência animal X [recurso eletrônico] /
 organizadores, Juliana Alves Resende... [et al]. - Dados
 eletrônicos. Alegre, ES : CAUFES, 2021.
 357 p. : il.

Inclui bibliografia.

ISBN: 978-65-86981-19-3

Modo de acesso: [https://cienciasveterinarias.ufes.br/pt-br/
topicos-especiais-em-ciencia-animal-teca](https://cienciasveterinarias.ufes.br/pt-br/topicos-especiais-em-ciencia-animal-teca)

1. Farmácia. 2. Medicina veterinária. 3. Zootecnia. 4. Nutrição
Animal. 5. Diagnóstico. I. Resende, Juliana Alves, 1983-.

CDU: 619

Elaborado por Raniere Barros Barreto – CRB-6 ES-000861/O

Os textos apresentados nessa edição são de inteira responsabilidade dos autores. Os organizadores não se responsabilizam pela revisão ortográfica, gramatical e autenticidade do conteúdo dos capítulos apresentados.

REITOR – UFES

PAULO SÉRGIO DE PAULA VARGAS

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS – UFES

LOUISIANE DE CARVALHO NUNES

COORDENADOR - PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JOSÉ DE OLIVEIRA CARVALHO

ORGANIZADORES DESTA OBRA

JULIANA ALVES RESENDE

MARIA APARECIDA DA SILVA

LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN

LEONARDO DEMIER CARDOSO

ILUSTRADOR DA CAPA E CONTRACAPA

MARIETA CRISTINA COUTO KUSTER

APRESENTAÇÃO

No ano de 2012, era publicada a primeira edição do livro Tópicos Especiais em Ciência Animal (TECA), juntamente com a Primeira Jornada Científica da Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFES. Deste então, anualmente o Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UFES publica o livro TECA em formato e-book, os quais encontram-se disponíveis gratuitamente no sítio eletrônico do PPGCV, fornecendo conteúdo técnico-científico acessível aos estudantes e à comunidade além dos muros da Universidade.

Até o momento, nove livros foram publicados, permitindo que docentes e pós-graduandos publiquem capítulos de livros relacionados a sua área de atuação. Para publicação é obrigatório a participação de um docente do Programa, associado a um discente e/ou egresso. Além disso, em sua maioria os capítulos possuem co-autoria de colaboradores externos, assim como de discentes de graduação e bolsistas de IC, reforçando a interface integrativa entre profissionais em diferentes níveis de formação. Adicionalmente, o material publicado é utilizado pelos docentes nos respectivos cursos em que os mesmos atuam, servindo como material didático nas disciplinas de graduação.

Assim, apresentamos o livro “TÓPICOS ESPECIAIS EM CIÊNCIA ANIMAL X”, sendo permitido seu pleno uso de textos e figuras, desde que respeitados os direitos dos autores a terem os devidos créditos.

José de Oliveira Carvalho
Coordenador - PPGCV-UFES

LISTA DE AUTORES

Adilson Vidal Costa. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: avcosta@hotmail.com.

Amanda Azevedo Assis. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: amandhaassis@hotmail.com

Amanda Queiroz de Oliveira. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: amanda.q.oliveira@edu.ufes.br

Amanda Soares dos Santos. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: amandasoaresds@gmail.com

Ana Flávia Ferreira Selva. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: aflavia44@hotmail.com

Ananda Pereira Aguilar. Universidade Federal de Viçosa, e-mail: anandabqi@hotmail.com

Anderson Barros Archanjo. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: andersonarchanjo@gmail.com

Andressa Brito Damaceno. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: andressabdamaceno@gmail.com

Beatriz Fernandes. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: beatriz.apt.fernandes@gmail.com

Bianca de Oliveira Botelho. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: biancabotelho93@hotmail.com

Caio Vaz Baqui Lima. Médico Veterinário Autônomo, e-mail: caiobaqui@hotmail.com

Carlos Alberto Moreira Junior. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: carlosamj_moreira@outlook.com

Caroline de Souza Fontes. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: caroline.fontes@edu.ufes.com

Cristiane dos Santos Giuberti. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: cgiuberti@yahoo.com.br

Daiana Freitas Ferreira. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: daiafreitasferreira@hotmail.com.br

David Carvalho dos Santos. Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: davidcdossantos99@gmail.com

Débora Cantarin Neiva. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: deboranei97@gmail.com

Driéle Lutzke. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: drielelutzke@gmail.com

Elizeu Costa Silva. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: elizeuaivery@hotmail.com

Erivelto Oliveira de Souza. Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: velto3032@gmail.com

Ernesto Tavares Borges Neto. Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: ernestoborges1995@gmail.com

Fabrcio Marques de Oliveira. Instituto Federal de Minas Gerais, Campus Ouro Branco, e-mail: fabricio.marques@ifmg.edu.br

Fábulo Junior Nogueira Fernandes. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: fabulojunior@gmail.com

Felipe Martins Pastor. Universidade Federal de Uberlândia, e-mail: felipempastor@gmail.com

Flávia Regina Spago. Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: flavia.goncalves@ifes.edu.br

Flávia Vieira Botelho Delpupo. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: flaviadelpupo123@outlook.com

Gabriel do Nascimento Moulin. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: gabriel.n.moulin@hotmail.com

Gabriela de Oliveira Resende. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: gabrielaoresende@hotmail.com

Helvécio Cardoso Corrêa Póvoa. Universidade Federal Fluminense, e-mail: hpovoa@id.uff.br

Henrique David Lavander. Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: henrique.lavander@ifes.edu.br

Iara Evelim da Silva Ferreira. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: iaraevelim@hotmail.com

Isabella Vilhena Freire Martins. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: isabella.martins@ufes.br

Izabelle Pereira de Lacerda. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: izabellelacerda@hotmail.com

Janaina Cecília Oliveira Villanova. Universidade Federal do Espírito Santo, email: farmacotecnica@yahoo.com.br

Jankerle Neves Boeloni. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jankerle@gmail.com

Jorge Luiz Rizzo Gervais. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jorluiz1998@gmail.com

José de Oliveira Carvalho. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: joseocneto@hotmail.com

José Gilmar da Silva Souza. Instituto de Pesquisa Extensão Rural e Organismos Aquáticos, e-mail: jgilmar.souza@gmail.com

Juliana Alves Resende. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: juliana.resende@ufes.br

Karina Preising Aptekmann. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: kapreising@gmail.com

Kássia Vidal Menezes. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: kassiavidal@hotmail.com

Lais Sperandio Cassani. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lais_cassani@hotmail.com

Leonardo Demier Cardoso. Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: leonardodemier@hotmail.com

Leonardo Oliveira Trivilin. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: leotrivilin@gmail.com

Livia Martino Duarte. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: livia.m.duarte@edu.ufes.br

Lucas de Souza Soares. Universidade Federal da Grande Dourados, e-mail: lucassoares@ufgd.edu.br

Lucas Henrique Cortat. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
lucascortat@gmail.com

Lucelena Paulucio. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
lucelenafeleepaulucio@gmail.com

Lukas Souza Felisberto. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
lukas.souza07@hormail.com

Marcelo Renan de Deus Santos. Instituto Marcos Daniel, Projeto Caiman, e-mail:
mrenansantos@gmail.com

Márcio Phillip Andrade Correia. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
phillipandreadec@outlook.com

Marcos Santos Zanini. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
marcos.zanini@ufes.br

Maria Aparecida da Silva. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
mvmariaaparecida@gmail.com

Maria Júlia Singulane Lavorato. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
mjslavorato@gmail.com

Mariana de Oliveira Lima. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
marianadeoliveiralima@outlook.com.br

Mariana Drummond Costa Ignacchiti. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
mariana.ignacchiti@ufes.br

Matheus Joaquim dos Santos Candido. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
mcandido0352@gmail.com

Mikaela Vieira Beloni. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
mikaelabeloni@hotmail.com

Natália Assis Guedes. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
natalia.guedes@edu.ufes.br

Natanael Roque da Silva. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
natanaelrock17@gmail.com

Natânia do Carmo Sperandio. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
natantiasperandio@gmail.com

Nayhara Madeira Guimarães. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
nayhara.mg2@gmail.com

Nicolly Soares Ferreira. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
ni.colly_ferreira@hotmail.com

Paola de Oliveira Santos. Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail:
paolamanfredini111@gmail.com

Paula Salve Guizardi. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
paulasalve10@gmail.com

Pedro Pierro Mendonça. Instituto Federal do Espírito Santo: e-mail: ppierrom@gmail.com

Poliana Laviola Pedrosa. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
poliana_laviola@hotmail.com

Priscila de Oliveira Lorenzoni. Universidade Federal do Espírito Santo e-mail:
priscilalorenzoni@gmail.com

Priscilla Cortizo Costa Pierro. Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail:
pri.cortizo@gmail.com

Ramila Cristiane Rodrigues. Universidade Federal de Viçosa, e-mail: ramilarodrigues@yahoo.com.br

Róbson Ricardo Teixeira. Universidade Federal de Viçosa, e-mail: robsonr.teixeira@ufv.br

Rodrigo Giesta Figueiredo. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: rodrigo.figueiredo@ufes.br

Samuel Oliveira da Silva. Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: engaquisamuel@gmail.com

Silvia Pope de Araújo. Universidade Federal do Rio de Janeiro, e-mail: silviapopedearaujo@gmail.com

Thaís Gonçalves Tavares. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: thastavares@yahoo.com.br

Thais Stinghel Togneri. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: thaisstingheltogneri@gmail.com

Thalia Cipriano da Silva. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: thalia.cipriano.16@outlook.com

Thayná de Souza Pardo. Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: eng.thaynapardo@gmail.com

Théo Matos Arantes Moraes. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: theomamoraes@gmail.com

Tiago Antônio de Oliveira Mendes. Universidade Federal de Viçosa, e-mail: tiagoaomendes@ufv.br

Vagner Tebaldi de Queiroz. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: vagner.queiroz@ufes.br

Vanessa Cola Thomazini. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
vanessathomazini01@gmail.com

Vitória Ribeiro Mantovanelli. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
vitoriarmantovanelli@hotmail.com

Wanderson Lopes Andrade. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail:
wanderson.andrade@hotmail.com.br

Winner Duque Rodrigues. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, e-mail:
winner.duque@gmail.com

Yhuri Cardoso Nóbrega. Instituto Marcos Daniel, Projeto Caiman, e-mail:
yhuri@institutomarcosdaniel.org.br

Yumi Sheu. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: yuyusheu@gmail.com

SUMÁRIO

Capítulo 1-	Ingredientes alternativos na fabricação de ração para peixes	14
Capítulo 2-	Período de defeso dos camarões marinhos no Espírito Santo: importância e desafios	30
Capítulo 3-	Jacarés do Brasil: biologia, manejo e conservação de <i>Caiman latirostris</i>	46
Capítulo 4-	Obesidade sarcopênica em gatos: revisão de literatura	67
Capítulo 5-	Alterações comportamentais em felinos decorrentes da pandemia – uma suposição	87
Capítulo 6-	Principais enfermidades bacterianas e virais observadas em codornas: atualidades e perspectivas	103
Capítulo 7-	Uma abordagem sobre leptospirose bovina no Brasil	124
Capítulo 8-	Ferramentas de análise molecular para identificação de patógenos na aquicultura	140
Capítulo 9-	Aplicações de técnicas envolvendo PCR no diagnóstico de doenças infecciosas em equinos	161
Capítulo 10-	Atualizações no diagnóstico da leishmaniose canina	179
Capítulo 11-	Resistência antimicrobiana em <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de mastite bovina em rebanhos brasileiros: uma revisão dos desafios no contexto da saúde única	198
Capítulo 12-	Arcabouço regulatório da produção de medicamentos de uso veterinário no Brasil	217
Capítulo 13-	Potencial de nanoemulsões contendo óleos essenciais para o controle alternativo de dermatoses fúngicas em animais domésticos	233
Capítulo 14-	Produtos naturais com atividade anti-biofilme para tratamento de doenças infecciosas de importância veterinária	254
Capítulo 15-	Compostos bioativos presentes em produtos comerciais destinados ao bem estar dos animais	274
Capítulo 16-	Fenóis naturais como alternativa no controle parasitário	294
Capítulo 17-	A importância de compostos benzimidazólicos no controle de doenças parasitárias	310
Capítulo 18-	Reações adversas a medicamentos de uso veterinário pela presença de excipientes	324
Capítulo 19-	Cultivo celular: aspectos gerais e aplicação em Medicina Veterinária ...	341

Capítulo 1

Ingredientes alternativos na fabricação de ração para peixes



Iara Evelim da Silva Ferreira¹
Paola de Oliveira Santos²
Thayná de Souza Pardo³
Eritelto Oliveira de Souza⁴
David Carvalho dos Santos⁵
Samuel Oliveira da Silva⁶
José Gilmar da Silva Souza⁷
Leonardo Demier Cardoso⁸
Priscilla Cortizo Costa Pierro⁹
Silvia Pope de Araujo¹⁰
Pedro Pierro Mendonça¹¹

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: iara-evelim@hotmail.com

² Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: paolamanfredini111@gmail.com

³ Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: eng.thaynapardo@gmail.com

⁴ Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: velto3032@gmail.com

⁵ Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: davidcdossantos99@gmail.com

⁶ Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: engaquisamuel@gmail.com

⁷ Instituto de Pesquisa Extensão Rural e Organismos Aquáticos, e-mail: jgilmar.souza@gmail.com

⁸ Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: leonardodemier@hotmail.com

⁹ Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: pri.cortizo@gmail.com

¹⁰ Universidade Federal do Rio de Janeiro, e-mail: silviapopedearaujo@gmail.com

¹¹ Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: ppierrom@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura é uma das atividades agropecuárias que mais crescem no mundo, sobretudo no Brasil, fornecendo ao mercado uma fonte de proteína animal de boa qualidade, além de poder ser implantada em diversos mercados e escalas de produção. Devido ao evidente crescimento, a demanda por equipamentos, serviços e insumos também aumenta proporcionalmente, criando uma cadeia produtiva que envolve diversos setores econômicos. À medida em que a piscicultura se intensifica buscando melhores índices de produção, toda cadeia associada de serviços e insumos também acompanha esta intensificação se tornando mais especializada e tecnificada. Dentre os diversos elos desta cadeia destaca-se a indústria de ração para peixes, tamanha importância a nutrição exerce sobre os custos de produção e índices zootécnicos de crescimento e engorda das espécies cultivadas (SONODA; FRANÇA; CYRINO, 2016).

No Brasil, a indústria da ração para peixes está relacionada ao complexo processo que envolve características regionais de mão-de-obra, rede de distribuição e logística, além do cenário mundial do comércio de *commodities* como soja, milho e farinha de peixe. Esta rede atrela diretamente a indústria da ração para peixes a questões que envolvem a macroeconomia mundial e conflitos ambientais e agrários, além de questões relacionadas à demanda do consumo de pescado. Este cenário, aparentemente ameaçador, comum dentro da indústria de alimentação animal, faz com que os custos dentro do complexo industrial da produção de ração para peixes estejam sujeitos a variações econômicas relevantes (FELTES *et al.*, 2010).

As altas nos preços das *commodities*, geralmente cotadas em dólar americano, refletem em altas nos preços das rações para peixes. Além disto, o cenário de dependência do mercado externo para oferta de insumos expõe o complexo industrial ao risco de desabastecimento, o que reflete no preço final da ração por pura lei de oferta e demanda. É importante compreender que o uso de ingredientes alternativos às *commodities* é fundamental para a segurança econômica da indústria de ração para organismos aquáticos e a viabilidade econômica de uma piscicultura intensiva, pois grande parte dos custos de produção da carne de peixe cultivados em sistemas semi-intensivos ou intensivos é composta pelos gastos com ração comercial (BARONE, 2017).

A dependência de insumos susceptíveis a constantes variações de preço e fornecimento abriram horizonte para estudos e utilização de novos ingredientes, como subprodutos da previamente conhecida indústria de grãos e mais recentemente, as farinhas de insetos como substitutos proteicos nas rações. O desafio, porém, não é simples, visto que para ganhar espaço

em meio ao tradicional é preciso atingir parâmetros de alto valor nutricional, baixo custo, padrão de qualidade e constância de oferta (COSTA, 2019).

O objetivo deste capítulo é dar um panorama teórico e científico sobre a importância da utilização de ingredientes alternativos às *commodities* para a fabricação de ração para peixes e trazer à tona o estado da arte da pesquisa com alguns ingredientes alternativos e eficientes de origem animal e vegetal.

2 A INDÚSTRIA DE RAÇÃO PARA PEIXES NO BRASIL

O Brasil é o terceiro maior produtor de ração animal mundial, em 2020 o país produziu 77 toneladas métricas de ração registrando aumento de 10% em relação ao ano anterior enquanto a média mundial teve aumento de apenas 1%. Em 2013, cerca de 700 mil toneladas de ração para aquicultura foram produzidas no Brasil e 85% desta produção foi destinada ao cultivo de peixes, principalmente a tilápia, para atender à crescente demanda do mercado nacional. Quantitativamente, os números ultrapassaram os alcançados pela própria produção de peixes (GOMES *et al.*, 2016; PEREZ; GOMES, 2014).

O impacto econômico da piscicultura não se dá somente pela produção de peixes, mas também por oportunizar empregos em diversos setores agroindustriais. Dentre as formas de geração de trabalho indireto, a indústria da fabricação de ração para peixes é um exemplo de destaque. O complexo sistema envolvendo logística e fluxo de matéria prima rende inúmeros empregos, que de certa forma estão diretamente relacionados à importância do uso de rações formuladas na aquicultura (SONODA; FRANÇA; CYRINO, 2016).

Em uma produção aquícola, a qualidade da ração é fator determinante para que se atinjam resultados de alta produtividade e é considerado o principal insumo componente de custo variável. O custo de uma ração comercial é afetado por fatores diversos como: formulação, ingredientes, industrialização, controle de qualidade, custos administrativos, custos operacionais e transporte, sendo que destes, os ingredientes podem representar até 50% do custo de produção e dentre os ingredientes utilizados na fabricação de ração para aquicultura podemos destacar a soja, o milho e a farinha de peixe (SONODA; FRANÇA; CYRINO, 2016).

Sabe-se que a cultura de grãos, principalmente a soja, tem grande importância na economia mundial, sendo utilizada para extração de óleo, destinado à alimentação humana, e ainda se apresenta como um dos principais ingredientes para formulação de ração animal, devido ao alto teor de proteínas que possui (FREITAS, 2011). A versatilidade da soja conquista interesse mundial, e neste cenário de mercado o Brasil ocupa o posto de maior exportador e

segundo maior produtor de soja no planeta, os crescentes investimentos neste tipo de cultura no país possuem relação direta com o desenvolvimento rápido de tecnologias de produção focadas em atender principalmente o mercado externo, formando um ciclo virtuoso onde a demanda atrai o avanço tecnológico e vice-versa (APROSOJA, 2018).

Outro grão de grande relevância para a indústria de ração animal é o milho. Devido a facilidade de cultivo e colheita do grão, se tornou um ingrediente mundialmente difundido tanto para nutrição humana quanto, para a nutrição animal. Além disso, o milho é uma excelente fonte de energia advinda do seu elevado teor de carboidratos (COELHO, 2018). Segundo Souza *et al.* (2018), o milho é o segundo grão mais exportado e comercializado no Brasil. O cultivo do milho cresce continuamente com o aumento da demanda mundial. O país ganha espaço no mercado, visto que os Estados Unidos da América, hoje maior produtor do grão no mundo, têm destinado sua produção principalmente para a produção de combustível. Segundo a CONAB (2017) desde a década de 70 a produção de milho no Brasil registra aumento de 245%.

O amendoim está entre as principais oleaginosas produzidas no mundo, perdendo apenas para a produção de soja, algodão e canola (FREITAS *et al.*, 2005). Impulsionando o setor, a China, Índia e Estados Unidos figuram como os maiores produtores mundiais. No Brasil, o destaque para o crescimento na produção de amendoim encontra-se no estado de São Paulo, que domina a produção nacional sendo responsável por 80% do amendoim cultivado no país (AGRIANUAL, 2012). O principal produto da industrialização é o óleo de amendoim, gerando um subproduto posterior a esse processo chamado de torta de amendoim, que desperta interesse das fábricas de ração, pois após seco e moído dá origem ao farelo de amendoim, que se caracteriza por possuir interessantes níveis de proteína. Níveis, porém, um tanto quanto variáveis de acordo com o método utilizado na extração do óleo (BUTOLO, 2002).

Tanto para produção de soja e milho, quanto para o amendoim levantam-se questões controversas relacionadas ao impacto ambiental para implantação e manutenção das culturas, sobretudo pela utilização em larga escala de defensivos agrícolas e de espécies transgênicas que interferem na biodiversidade local. Além disso, a abertura de novas áreas de cultivo de grãos para o desenvolvimento do agronegócio, tem acentuado o desmatamento principalmente na região do cerrado brasileiro. Estima-se que o aumento das áreas agrícolas seja de 4,7% ao ano nas próximas décadas sendo um dos maiores crescimentos no mundo (SILVA *et al.*, 2015).

O ingrediente de maior valor econômico utilizado na fabricação de rações para aquicultura é a farinha de peixe. Este ingrediente oriundo do resíduo da produção de pescado corresponde 40% da massa produzida. Resíduo este, composto principalmente por vísceras e ossos que além do fator quantitativo, exerce também relevância qualitativa, uma vez que é a

principal fonte de proteína utilizada em rações para espécies aquícolas. Entretanto, é um ingrediente caro e cada vez mais escasso no mercado (NAYLOR *et al.*, 2000). Apesar da farinha de peixe normalmente ser produzida a partir de subprodutos, a valorização deste ingrediente chama atenção para uma problemática, pois a maior parte deste insumo é proveniente de resíduos gerados pela atividade da pesca, possuindo então, potencial para aumentar a pressão sobre os recursos pesqueiros (FABREGAT *et al.*, 2018).

Uma alternativa para reduzir os impactos causados pela produção de ração é a formulação de alimentos à base de ingredientes alternativos, que apresentem valor nutricional semelhante aos ingredientes utilizados convencionalmente pela indústria. Pois o fornecimento de rações com ingredientes de baixa digestibilidade gera a redução da absorção de nutrientes e o aumento da excreção de compostos poluentes reduzindo a eficácia do processo produtivo (CYRINO *et al.*, 2010).

3 INGREDIENTES ALTERNATIVOS COMO SOLUÇÃO SUSTENTÁVEL PARA A AQUICULTURA

O foco das pesquisas para tornar possível a substituição da farinha de peixes por uma fonte de proteína mais sustentável tem sido sobre matérias primas como resíduos do processamento da produção animal (farinha de ossos, farinha de vísceras de aves e farinha de sangue), proteínas microbianas e subprodutos do processamento de sementes oleaginosas em especial a soja (HARDY, 2010).

Um dos maiores obstáculos na utilização da proteína vegetal é a ausência de aminoácidos essenciais que atendem as necessidades nutricionais dos peixes, como a lisina e metionina, tornando necessário, portanto, a complementação (NAYLOR *et al.*, 2000). A farinha de glúten de milho, por exemplo, apesar de ser altamente digestível para peixes possui perfil aminoácido incompatível para boa substituição da farinha de peixe além de conter carboidratos não solúveis. As desvantagens, porém, não inviabilizam seu uso, visto que pode-se incorporar à farinha de glúten de milho, concentrados de proteína de trigo/soja ou lisina sintética, para atender de forma mais adequada o perfil aminoácido do peixe (HARDY, 2010).

Diversos alimentos de origem vegetal, quando ingeridos, apresentam compostos que atuam como inibidores da digestibilidade, utilização e absorção dos nutrientes, reduzindo o valor nutricional dos mesmos, essa classe de compostos é chamada de “fator antinutricional” (SANTOS, 2006). Os fatores antinutricionais podem ser divididos em quatro grupos: fatores que agem na utilização e digestão da proteína; fatores que agem na utilização dos minerais; anti

vitaminas; substâncias mistas como as micotoxinas, mimosina, cianogênicos, nitrato, alcaloides, agentes fotossensibilizantes, fitoestrogênios e saponinas. Também podemos classificá-los de acordo com a resistência dos mesmos à temperaturas mais elevadas: os termolábeis, sensíveis aos processamentos térmicos e os termoestáveis, não anuláveis ou desestabilizados quando expostos a maiores temperaturas (FRANCIS; MAKKAR; BECKER, 2001; MIURA *et al.*, 2001).

Os fatores antinutricionais presentes em alguns alimentos podem prejudicar a morfologia intestinal do animal, ocasionando inflamações e alergias. Podem também atuar diretamente na atividade enzimática, e acabam suprimindo enzimas específicas essenciais na digestão, como a amilase e a protease, que por sua vez tem a função de hidrolisar as proteínas ingeridas, quebrando-as em moléculas simples, facilitando a absorção pelo intestino e consequentemente permitindo que sejam utilizadas nos processos biológicos do animal (LOVATTO *et al.*, 2017). Portanto, os fatores antinutricionais presentes em vegetais aqui citados é uma das principais dificuldades e desafios da substituição parcial da farinha de peixe por tais alternativas, sendo verificados em alguns estudos afetando o desempenho de diversas espécies de peixes como a Dourada (*Sparus aurata*) (KOKOU *et al.*, 2012), Sargo (*Acanthopagrus schlegelii*) (SUN *et al.*, 2015) e linguado (*Platichthys stellatus*) (SONG *et al.*, 2014).

Estudos para avaliação de ingredientes provenientes de origem animal como farinha de ossos e carne para *Sparus aurata* (MOUTINHO *et al.*, 2017); farinha de penas hidrolisadas na alimentação da carpa (*Cyprinus carpio*) (GRAEFF; MONDARDO, 2006); farinha de pena e vísceras de frango para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (STEFFENS, 1994); entre outros, em sua maioria conseguiram níveis de substituições consideráveis, chegando a 75% a 100%, corroborando com a prerrogativa de que fatores antinutricionais presentes em fontes vegetais estão diretamente relacionados a perda de desempenho metabólico e crescimento do peixe quando utilizados em altos níveis de substituição à farinhas de origem animal, isso se deve também a provável carência de aminoácidos e ácidos graxos insaturados (NAYLOR *et al.*, 2000).

3.1 INGREDIENTES ALTERNATIVOS PROMISSORES PARA A INDÚSTRIA DE RAÇÃO PARA PEIXES

Por características fisiológicas próprias dos peixes, o percentual proteico e a relação proteína/energia das rações é de grande importância para os resultados no crescimento

(BOSCOLO *et al.*, 2011). Toda substituição de ingredientes convencionais por seus alternativos deve ser feita sob a orientação de resultados científicos positivos. Estudos sobre digestibilidade de diversos ingredientes alternativos sugerem resultados positivos contribuindo para o avanço das pesquisas sobre o assunto. A seguir lista-se alguns ingredientes proteicos que possuem comprovado potencial para substituição ou são apontados como potenciais para tal.

3.1.1 Derivados do beneficiamento da soja

Produtos oriundos do processamento da soja são vistos como nutritivos e econômicos, com equilíbrio de aminoácidos razoável e de alto teor proteico, podendo conter de 44 a 50% de proteína bruta. Durante a extração do óleo da soja, parte dos fatores antinutricionais são removidos ou inativados depois de submetidos à alta temperatura, melhorando os resultados de desempenho animal (GATLIN *et al.*, 2007). O farelo de soja demonstra ser alternativa viável a ser utilizado por possuir adequado equilíbrio de aminoácidos, e ainda possuir quantidade maior de lisina em relação aos demais vegetais, aminoácido este, considerado um dos mais limitantes em dietas para peixes. Para peixes de água doce, contem quase todos os ácidos graxos necessários (FABREGAT *et al.*, 2018).

Ao se comparar com a farinha de peixe, o farelo de soja possui pouca quantidade de aminoácidos sulfurados como a cistina e metionina, porém é possível suplementar com aminoácidos sintéticos, que melhoram a retenção de nitrogênio, conversão alimentar, ganho de peso e redução de gordura na carcaça. Em peixes carnívoros, como a truta, é aceitável utilizar até 50% de farelo de soja no lugar da farinha de peixe e em peixes onívoros essa percentagem pode chegar em até 95% (ALVAREZ *et al.*, 2007).

O concentrado proteico de soja é outra alternativa oriunda do processamento da soja, e em sua composição o nível de proteína bruta chega a 70%, enquanto o concentrado proteico isolado pode chegar aos 90% de proteína (TSUKAMOTO; TAKAHASHI, 1992). Quando suplementado com aminoácidos, o concentrado proteico de soja tem se mostrado um ingrediente promissor na utilização de rações em testes realizados com alevinos de tilápia do Nilo. Para averiguar a eficiência do concentrado proteico de soja, foi fornecido 50% da proteína total originada da farinha de peixe e do composto isolado proteico na ração, que se mostrou viável no enfoque de desempenho econômico e zootécnico (RIBEIRO *et al.*, 2012).

Em outro estudo relatou-se que o concentrado proteico de soja é financeiramente mais viável do que a farinha de peixe de alta qualidade, devido aos elevados índices de proteína bruta, com exceção da metionina e lisina, os níveis podem chegar a 60% e dispõem dos demais

aminoácidos fundamentais para os peixes (SOLIMAN; ATWA; ABAZA, 2000). Resultados positivos são animadores, mas não se descarta a necessidade de avaliações considerando as diferentes fases de cultivo do peixe para validar o uso do concentrado proteico de soja como fonte adequada de proteína, visto que a exigência nutricional animal varia conforme a idade.

3.1.2 Farelo de amendoim

O amendoim é uma das oleaginosas mais produzidas no mundo, sendo o óleo seu primeiro produto extraído pela indústria (FREITAS *et al.*, 2005). Os principais protagonistas na produção mundial são China, Índia e Estados Unidos. A safra brasileira de amendoim 2010/11 foi de aproximadamente 223 mil toneladas, que evidenciou o estado de São Paulo como principal estado produtor. São Paulo possui área destaque em cultivo e é responsável por 80% de toda produção nacional (AGRIANUAL, 2012).

O farelo de amendoim é um subproduto obtido após o processo de extração do óleo comestível (BUTING; GIBBONS; WYNNE, 1985), destaca-se em palatabilidade e possui boas características nutricionais, além de propriedades favoráveis para a peletização (LOVELL, 1998; ROBINSON *et al.*, 1985). O alto teor proteico se apresenta como fator significativo para o farelo de amendoim ser considerado alternativo ao farelo de soja (BUTOLO, 2002). A composição química verificada no farelo de amendoim pode variar de acordo com o processo para extração do óleo (BUTOLO, 2002). Quando o farelo é obtido do amendoim descascado e desfolhado, seu valor nutritivo fica muito próximo aos valores do farelo de soja (TEIXEIRA, 1998).

Poucos estudos foram conduzidos para avaliar os efeitos da inclusão da farinha de amendoim em dietas para peixes. Destes estudos pode-se observar que a substituição da farinha de peixes pela farinha de amendoim em níveis inferiores à 50% não afetaram o desempenho de peixes, como observados em tilápia mossambica (*Sarotherodon mossambicus*) (JACKSON; CAPPER; MATTY, 1982) e carpa (*Cyprinus carpio*) (HASAN; MACINTOSH; JAUNCEY, 1997). Em níveis superiores a 50% houve perda de desempenho dos animais, tais resultados foram relacionados à deficiência de aminoácidos essenciais como lisina, metionina e treonina, ou aos fatores antinutricionais comumente presente neste alimento (SILVA, 2012).

Grande parte de alimentos de origem vegetal possui uma variedade de fatores antinutricionais. No amendoim assim como no farelo do amendoim podem-se citar os inibidores de protease e saponinas (TACON; FOSTER; EDWARDS, 2003), goitrogênios (BUTOLO, 2002) e aflatoxina (WILSON; PAYNE, 1994).

Estudos são direcionados para avaliar a capacidade com que algumas espécies toleram alguns fatores antinutricionais principalmente os inibidores de proteases. Aparentemente os salmonídeos possuem mais sensibilidade se comparados com carpas e com bagres do canal (NRC, 1983). A fim de diminuir ou sanar os efeitos negativos dos fatores antinutricionais o processamento térmico vem sendo avaliado, porém o processo exige cautela quanto à temperatura ao qual o alimento é exposto, para que não haja perda considerável da qualidade nutricional e degradação proteica (NORTON, 1991).

3.1.3 Farinha de glúten de trigo

O glúten de trigo é um coproduto de origem vegetal proveniente do processo de isolamento do amido da farinha de trigo, é um alimento com elevado percentual proteico e viscoelástico (DAY *et al.*, 2006), essa característica se dá por estruturas como gliadinas e gluteninas (WIESER, 2007), que quando hidratadas são responsáveis pela viscosidade. As mesmas estruturas aqui citadas como responsáveis pela viscosidade da farinha de glúten são por sua vez a fração proteica deste alimento e podem ainda reduzir a utilização de amido e outros agentes aglutinantes (STOREBAKKEN; SHEARER; ROEM, 2000), conferindo regularidade interna em dietas extrusadas (DRAGANOVIC *et al.*, 2013).

A farinha de glúten caracteriza-se por ser uma fonte proteica de alta qualidade e digestibilidade. Possui aproximadamente 80% de proteína podendo chegar a 95%, sendo assim mais proteica do que a farinha de peixe e o farelo de soja, comumente utilizados e por apresentar alto teor de energia bruta pode ser utilizada como fonte energética de fácil absorção (APPERBOSSARD *et al.*, 2013; ROSTAGNO *et al.*, 2011).

Diversos autores realizaram estudos para avaliar possíveis níveis de inclusão de glúten de trigo na elaboração de dieta de diferentes espécies de peixes como *Oncorhynchus mykiss* (SUGIURA *et al.*, 1998), *Bidyanus bidyanus* (ALLAN *et al.*, 2000), *Gadus morhua* (TIBBETTS; MILLEY; LALL, 2006), *Perca flavescens* (KWASEK *et al.*, 2012).

3.1.4 Farinha de minhoca

A farinha de minhoca possui alto valor proteico, aminoácidos balanceados e um perfil de ácidos graxos essenciais adequados à alimentação de peixes. Tais características sugerem a farinha de minhoca como possível alternativa para a substituição da farinha de peixes utilizada para a fabricação de rações comerciais utilizadas na piscicultura (HILTON, 1983; TACON;

STAFFORD; EDWARDS, 1983).

Segundo Hilton (1983) a digestibilidade aparente da farinha de minhoca na matéria seca foi de aproximadamente 70%, enquanto a digestibilidade aparente da proteína chegou a aproximadamente 95%. Entretanto, alguns fatores negativos na farinha de minhoca podem limitar a sua utilização na alimentação animal. A hemolisina é uma proteína capaz de promover a destruição dos glóbulos vermelhos e a liberação da hemoglobina no sangue. A hemolisina é uma das cinco principais proteínas encontradas no líquido celomático da minhoca e parece ser um fator antinutricional em potencial, porém estudos afirmam que pode ser destruído quando aquecido. Pesquisadores apontam que esse mesmo componente possui grande capacidade antibacteriana, utilizado pelas minhocas em sua defesa contra patógenos alocados no solo (NANDEESHA *et al.*, 1988).

Em experimento realizado por Buting, Gibbons e Wynne, 1985, foi possível observar que a retirada do líquido celomático aumentou a palatabilidade da farinha de minhoca pelas trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Em contraponto, os autores também observaram redução na atividade proteolítica dos peixes alimentados com rações formuladas com mais de 50% de substituição da farinha de peixe pela farinha de minhoca (*Eisenia foetida*). Consideraram assim que possivelmente a hemolisina estaria inibindo a atividade enzimática do aparelho digestivo dos animais. Contudo os trabalhos não mostraram concordância nos resultados.

Outros trabalhos indicaram que níveis inferiores a 50% de substituição da farinha de peixe pela farinha de minhoca promoveram melhores resultados no crescimento de peixes. Em alevinos de truta arco-íris, o crescimento foi mais elevado quando o nível de substituição ficou entre 10 e 25%, ao passo que, quando acima de 50%, as taxas de crescimento diminuíram (ROTTA *et al.*, 2003).

3.1.5 Ingredientes a base de insetos

A alta fecundidade, ausência de grandes áreas de criatório, diversas fases de desenvolvimento que podem ser exploradas, variedade de espécies e composição corporal são vantagens que essa alternativa possui, podendo alcançar 77,13% de proteína bruta (RUMPOLD; SCHLÜTER, 2013) e 58,6% de gordura (SÁNCHEZ-MUROS; BARROSO; MANZANO-AGUGLIARO, 2014).

A forma mais comum na utilização de insetos como ingredientes alternativos na alimentação dos peixes, é no formato de farinha, sendo moídos e desidratados, e apesar da

grande quantidade de espécies existentes na Classe Insecta, apenas alguns são utilizados (HUIS *et al.*, 2013). Por exemplo: gafanhotos (*Zonocerus variegatus*) (ALEGBELEYE *et al.*, 2012); barata cinérea (*Nauphoeta cinérea*) (FRECCIA *et al.*, 2016); e larvas de mosca soldado negra (*Hermetia illucens*) (Figura 1 A); barata de Madagascar (*Gromphadorhina portentosa*) (Figura 1 B) e tenébrio (*Tenebrio molitor*) (Figura 1 C) (COSTA, 2019).

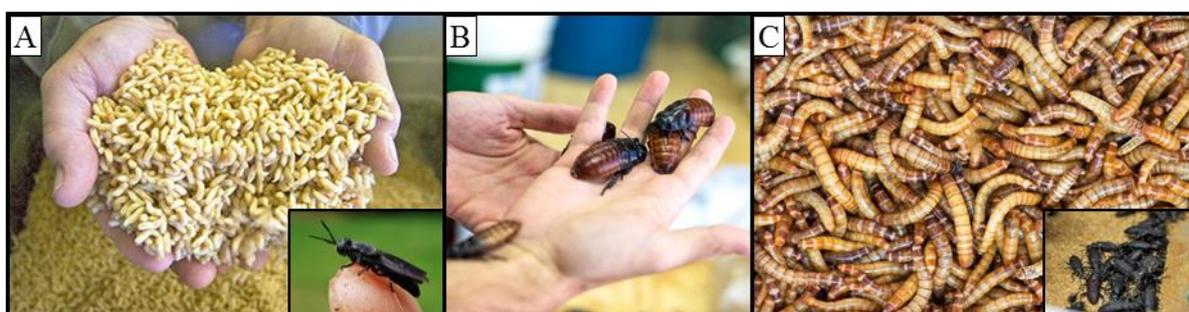


Figura 1 – Insetos utilizados na alimentação de peixes. A: larvas e adulto de mosca soldado negra (*Hermetia illucens*); B: Exemplos de barata de Madagascar (*Gromphadorhina portentosa*); C: Larvas e besouros adultos de tenébrio (*Tenebrio molitor*).

Fonte: Costa (2019).

Quanto ao perfil de aminoácidos, os insetos constituintes do grupo Diptera apresentam características equivalentes a farinha de peixe, sendo que a pupa da mosca-soldado negra possui 3,26% de metionina com relação aos aminoácidos totais, o que é maior com relação a farinha de peixe que chega a 2,93% dos aminoácidos totais. Quanto à lisina, a porcentagem presente é bem semelhante à da farinha de peixe, onde a larva de mosca doméstica apresenta 8,36% e a farinha de peixe possui 8,78% (HUIS *et al.*, 2013). Com essas semelhanças seria interessante a utilização da farinha de insetos como uma alternativa, pois possuem um custo baixo, grande prole e independem de aporte de área grande para realizar a produção.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa sobre o uso de ingredientes alternativos para a fabricação de ração de peixes mostra que é possível a inclusão parcial de muitos ingredientes de origem animal e vegetal que possuam valor nutricional e biológico de maneira a não afetar o desempenho dos peixes em criação. Apesar dos resultados promissores, a escala de produção de muitos destes ingredientes não é suficiente para atender a demanda de fábricas de grande porte.

Paralelamente à pesquisa sobre ingredientes alternativos para a fabricação de rações para peixes, se faz de grande importância o fomento de fábricas de pequeno porte, de maneira

a atender fazendas aquícolas e laboratórios de maneira individualizada conforme suas necessidades. Em fábricas de pequeno porte o arranjo logístico e operacional possibilita a obtenção de ingredientes com menor disponibilidade no mercado, aumentando o poder de barganha do piscicultor.

5 REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. 1. ed. São Paulo: Instituto FNP, 2012. 482 p.

ALEGBELEYE, W. O. *et al.* Preliminary evaluation of the nutritive value of the variegated grasshopper (*Zonocerus variegatus* L.) for African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 3, p. 412-420, 2012.

ALLAN, G. L. *et al.* Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. **Aquaculture**, v. 186, n. 3-4, p. 293-310, 2000.

ALVAREZ, J. S. *et al.* Substitution of fishmeal with soybean meal in practical diets for juvenile white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Pérez-Farfante & Kensley 1997). **Aquaculture Research**, v. 38, n. 7, p. 689-695, 2007.

APPER-BOSSARD, E. *et al.* Use of vital wheat gluten in aquaculture feeds. **Aquatic Biosystems**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2013.

APROSOJA. **A história da soja**. Cuiabá: Associação dos produtores de soja e milho do estado de Mato Grosso, 2018. Disponível em: < <http://www.aprosoja.com.br/soja-e-milho/a-historia-da-soja>>. Acesso em: 23 jun. 2021.

BARONE, R. S. C. Ração é o principal insumo da produção aquícola. **Ativos da Aquicultura**, v. 13, p. 1-7, 2017.

BOSCOLO, W. R. *et al.* Nutrição de peixes nativos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. supl. especial, p. 145-154, 2011.

BUTING, A. H.; GIBBONS, R. W.; WYNNE, J. C. Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). In: SUMMERFIELD, R. J.; ROBERTS, E. H. **Grain legume crops**, London: Collins, 1985. p. 747-800.

BUTOLO, J. E. Qualidade de ingredientes na alimentação animal. In: _____. **Ingredientes de origem vegetal**. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002. p. 93-238.

COÊLHO, J. D. Produção de grãos: feijão, milho e soja. **Caderno Setorial ETENE**, n. 51, p. 1, 2018.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Safra 2016/17: Oitavo levantamento, **CONAB**, v. 4, n. 11, p.104-112, 2017.

COSTA, D. V. Insetos como alimento para a aquicultura: devaneio ou realidade? **Panorama da Aquicultura**, v. 29, n. 171, p. 50-57, 2019.

CYRINO, J. E. P. *et al.* A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 68-87, 2010.

DAY, L. *et al.* Wheat-gluten uses and industry needs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 2, p. 82-90, 2006.

DRAGANOVIC, V. *et al.* Wheat gluten in extruded fish feed: effects on morphology and on physical and functional properties. **Aquaculture Nutrition**, v. 19, n. 6, p. 845-859, 2013.

FABREGAT, T. H. P. *et al.* Substituição da farinha de peixe pelo farelo de soja em dietas para juvenis de curimba. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 3, p. 289-294, 2018.

FELTES, M. *et al.* Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 6, p. 669-677, 2010.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish: review. **Aquaculture**, v.199, n 3-4, p.197-227, 2001.

FRECCIA, A. *et al.* Farinha de inseto em dietas de alevinos de tilápia. **Archivos de Zootecnia**, v. 65, n. 252, p. 541-547, 2016.

FREITAS, S. M. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1-12, 2011.

FREITAS, S. M. *et al.* Evolução do mercado brasileiro de amendoim. In: SANTOS, R. C. O. **Agroegócio do amendoim no Brasil**. 1.ed. Paraíba: EMBRAPA, 2005, p. 15-44.

GATLIN, D. M. *et al.* Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 6, p. 551-579, 2007.

GOMES, V. D. S. *et al.* Utilização de enzimas exógenas na nutrição de peixes - revisão de literatura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 19, n. 4, p. 259-264, 2016.

GRAEFF, A.; MONDARDO, M. Substituição da farinha de peixes pela farinha de penas hidrolizada na alimentação da carpa comum (*Cyprinus carpio* L.) na fase de recria. **Ceres**, v. 53, n. 305, p. 7-13, 2006.

HARDY, R. W. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 5, p. 770-776, 2010.

HASAN, M. R.; MACINTOSH, D. J.; JAUNCEY, K. Evaluation of some plant ingredients as dietary protein sources for common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry. **Aquaculture**, v.151, n. 1-4, p. 55-70, 1997.

HILTON, J. W. Potential of freeze-dried worm meal as a replacement for fish meal in trout diets formulations. **Aquaculture**, v. 32, n. 3-4, p. 277-283, 1983.

HUIS, A. V. *et al.* **Edible insects: future prospects for food and feed security**. 1. ed. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013. 187 p.

JACKSON, A. J.; CAPPER, B. S.; MATTY, A. J. Evaluation of some plant proteins in complete diets for the tilapia *Sarotherodon mossambicus*. **Aquaculture**, v. 27, n. 2, p. 97-109, 1982.

KOKOU, F. *et al.* Growth performance, feed utilization and non-specific immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed graded levels of a bioprocessed soybean meal. **Aquaculture**, v. 364, p. 74-81, 2012.

KWASEK, K. *et al.* The effect of lysine-supplemented wheat gluten-based diet on yellow perch *Perca flavescens* (Mitchill) performance. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 9, p. 1384-1391, 2012.

LOVATTO, N. de M. *et al.* Effects of phosphorylated protein concentrate of pumpkin seed meal on growth and digestive enzymes activity of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 201-209, 2017.

LOVELL, R. T. **Nutrition and feeding of fish**. 2. ed. New York: Springer Science, 1998. 267 p.

MIURA, E. M. Y. *et al.* Avaliação biológica de soja com baixas atividades de inibidores de tripsina e ausência do inibidor Kunitz. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 51, n. 2, p. 195-198, 2001.

MOUTINHO, S. *et al.* Meat and bone meal as partial replacement for fish meal in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles: growth, feed efficiency, amino acid utilization, and economic efficiency. **Aquaculture**, v. 468, n. 1, p. 271-277, 2017.

NANDEESHA, M. C. *et al.* Influence of earthworm meal on the growth and flesh quality of common carp. **Biological Wastes**, v. 26, n. 3, p. 189-198, 1988.

NAYLOR, R. L. *et al.* Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**, v. 405, p. 1017-1024, 2000.

NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL). **Nutrient requirements of warm water, fishes and shellfishes**: nutrient requirements of domestic animals. 12. ed. Washington: National Academy Press, 1983. 102p.

NORTON, G. Proteinase inhibitors. In: D'MELLO, F. J. P.; DUFFUS, C. M.; DUFFUS, J. H. **Toxic substances in crop plants**. 1. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1991. p. 68-106.

- PEREZ, M. S.; GOMES, J. R. M. Políticas de desenvolvimento da pesca e a aquicultura: conflitos e resistências nos territórios dos pescadores e pescadoras artesanais da Vila do Superagüi, Paraná, Brasil. **Sociedade & Natureza**, v. 26, n. 1, p. 37-47, 2014.
- RIBEIRO, R. P. *et al.* Fundamentos da moderna aquicultura. In: ZIMERMAN, S. **Estado atual e tendências da moderna aquicultura**. 1. ed. Canoas: Ulbra, 2012, p. 191-198.
- ROBINSON, C. *et al.* Nutrition and feeding. In: TUCKER, C. S. **Channel Catfish Culture** 1. ed. New York: Elsevier, 1985. p. 323-404.
- ROSTAGNO, H. S. *et al.* **Tabelas brasileiras para aves e suínos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2011. 186 p.
- ROTTA, M. A., *et al.* **Uso da farinha de minhoca como alimento para pós-larvas de tilápia**. 1. ed. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 35 p.
- RUMPOLD, B. A.; SCHLÜTER, O. K. Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 17, p. 1-11, 2013.
- SÁNCHEZ-MUROS, M. J.; BARROSO, F. G.; MANZANO-AGUGLIARO, F. Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 16-27, 2014.
- SANTOS, M. A. T. Efeito do cozimento sobre alguns fatores antinutricionais em folhas de brócolis, couve-flor e couve. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 294-301, 2006.
- SILVA, J. B. L. *et al.* Nota técnica: evolução temporal do desmatamento na bacia do riacho da Estiva, Piauí. **Revista Engenharia na Agricultura-Reveng**, v. 23, n. 4, p. 363-370, 2015.
- SILVA, R. L. **Inclusão do farelo de amendoim em dietas para juvenis de tilápia do Nilo** 2012. 42 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.
- SOLIMAN, A. K.; ATWA, A. M. F.; ABAZA, M. A. Partial replacement of fish meal protein with black seed meal protein, with and without lysine and methionine supplementation in diets of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: PROCEEDING FROM THE FIFTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5, 2000, Rio de Janeiro. **Anais...** Arizona: College of Agriculture & Life Sciences, 2000, v. 2, p. 187-196.
- SONG, Z. *et al.* Effects of fishmeal replacement with soy protein hydrolysates on growth performance, blood biochemistry, gastrointestinal digestion and muscle composition of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). **Aquaculture**, v. 426, p. 96-104, 2014.
- SONODA, D. Y.; FRANÇA, E. D.; CYRINO, J. E. P. Modelo de preço de ração no período de 2001 a 2015. **Revista Ipecege**, v. 2, n. 3, p. 57-71, 2016.
- SOUZA, A. E. *et al.* Estudo da produção do milho no Brasil. **South American Development Society Journal**, v. 4, n. 11, p. 182-194, 2018.

STEFFENS, W. Replacing fish meal with poultry by-product meal in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 124, n. 1-4, p. 27-34, 1994.

STOREBAKKEN, T.; SHEARER, K. D.; ROEM, A. J. Growth, uptake and retention of nitrogen and phosphorus, and absorption of other minerals in Atlantic salmon *Salmo salar* fed diets with fish meal and soy-protein concentrate as the main sources of protein. **Aquaculture Nutrition**, v. 6, n. 2, p. 103-108, 2000.

SUGIURA, S. H. *et al.* Apparent protein digestibility and mineral availabilities in various feed ingredients for salmonid feeds. **Aquaculture**, v. 159, n. 3-4, p. 177-202, 1998.

SUN, H. *et al.* Partial substitution of fish meal with fermented cottonseed meal in juvenile black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) diets. **Aquaculture**, v. 446, p. 30-36, 2015.

TACON, A. G. J.; FOSTER, I. P. Aquafeeds and the environment: policy implications. **Aquaculture**, v. 226, n. 1-4, p. 181-189, 2003.

TACON, A. G. J.; STAFFORD, E. A.; EDWARDS, C. A. A preliminary investigation of the nutritive value of three terrestrial lumbric worms for rainbow trout. **Aquaculture**, v. 35, p. 187-199, 1983.

TEIXEIRA, A. S. **Alimentos e alimentação dos animais**. 4. ed. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 402p.

TIBBETTS, S. M.; MILLEY, J. E.; LALL, S. P. Apparent protein and energy digestibility of common and alternative feed ingredients by Atlantic cod, *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758). **Aquaculture**, v. 261, n. 4, p. 1314-1327, 2006.

TSUKAMOTO, R. Y.; TAKAHASHI, N. S. Falta de proteína para ração: estrangulamento da aqüicultura no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, v. 14, p. 8-9, 1992.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 115-119, 2007.

WILSON, D. M.; PAYNE, G. A. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. In: EATON, D.L., GROOPMAN, J. D. **Toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 1994. p. 309-325.

Capítulo 2

Período de defeso dos camarões marinhos no Espírito Santo: importância e desafios



Amanda Soares dos Santos¹
Henrique David Lavander²
Mariana de Oliveira Lima³
Gabriela de Oliveira Resende⁴
Felipe Martins Pastor⁵
Maria Aparecida da Silva⁶

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: amandasoaresds@gmail.com

² Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: henrique.lavander@ifes.edu.br

³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: marianadeoliveiralima@outlook.com.br

⁴ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: gabrielaoresende@hotmail.com

⁵ Universidade Federal de Uberlândia, e-mail: felipempastor@gmail.com

⁶ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mvmariaaparecida@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2018, o total da produção da pesca mundial foi de 96,4 milhões de toneladas, sendo a pesca marinha responsável por 84,4 milhões de toneladas desse total. A produção pesqueira de crustáceos no mundo nesse mesmo período, correspondeu a aproximadamente 6 milhões de toneladas (FAO, 2020). De acordo com o último censo estatístico pesqueiro reportado no Brasil, em 2011 a produção total da pesca no país foi de 803.270,2 toneladas, sendo a pesca marinha a principal fonte de produção de pescado, correspondente a 68,9% da produção total nacional. Os crustáceos representaram o segundo grupo mais capturado da pesca marinha, e foram responsáveis por 10% de toda produção do país, ficando abaixo apenas da captura de peixes, que representa 87% desse total (MPA, 2012).

No Espírito Santo, a pesca extrativa marinha em 2011 correspondeu a 14.381,3 toneladas (MPA, 2012). Segundo o Boletim Estatístico da Pesca no Espírito Santo, a captura total de camarão no estado foi de 2.850,1 toneladas, representando aproximadamente 20% de toda a produção (HOSTIM-SILVA; SOARES, 2013).

Com o objetivo de diminuir os efeitos causados pela pesca camaroeira no país, o governo estabeleceu algumas medidas de manejo destes recursos, como: delimitação do esforço de pesca por meio do licenciamento e limitação de frotas; caracterização dos equipamentos ou petrechos de pesca, como também a restrição de uso; resguardo das áreas que ocorrem a pesca; tamanho mínimo de captura das espécies-alvo; e para os camarões, determinação de períodos de defeso (PEREZ *et al.*, 2001).

O período de defeso de camarões nas regiões sul e sudeste do Brasil, vivenciou mais de vinte modificações desde o ano de 1983 (FRANCO *et al.*, 2009). No ano de 2018 foi estabelecido um novo período de defeso para o estado do Espírito Santo, que vai de 01 de dezembro a 29 de fevereiro, sendo tal período determinado a partir da Portaria Interministerial nº 47, de 11 de setembro de 2018. A referida portaria, proíbe a atividade pesqueira embarcada para a captura das espécies do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*), do camarão rosa (*Penaeus paulensis*, *P. brasiliensis*, *P. subtilis*), do camarão branco (*Penaeus schmitti*), do camarão barba-ruça (*Artemesia longinaris*) e o camarão santana/vermelho (*Pleoticus muelleri*) (BRASIL, 2018).

Assim, o objetivo deste capítulo é discutir sobre o período de defeso dos camarões no estado do Espírito Santo, descrever como se estabelecem tais medidas, e relatar os desafios para o setor quanto ao sucesso de implantação desse período pelos órgãos públicos responsáveis.

2 A PESCA DO CAMARÃO NO ESPÍRITO SANTO

O litoral contém 14 municípios (Figura 1), onde, em todos eles há expressiva atividade pesqueira na costa marítima e contém em torno de cinquenta comunidades de pescadores. O esforço de pesca no estado, com as atividades de captura marinha e continental, gera cerca de 11.000 postos de trabalho, e estima-se total de 69.720 trabalhadores diretos e indiretos nos setores de captura e comercialização (KNOX; TRIGUEIRO, 2015).

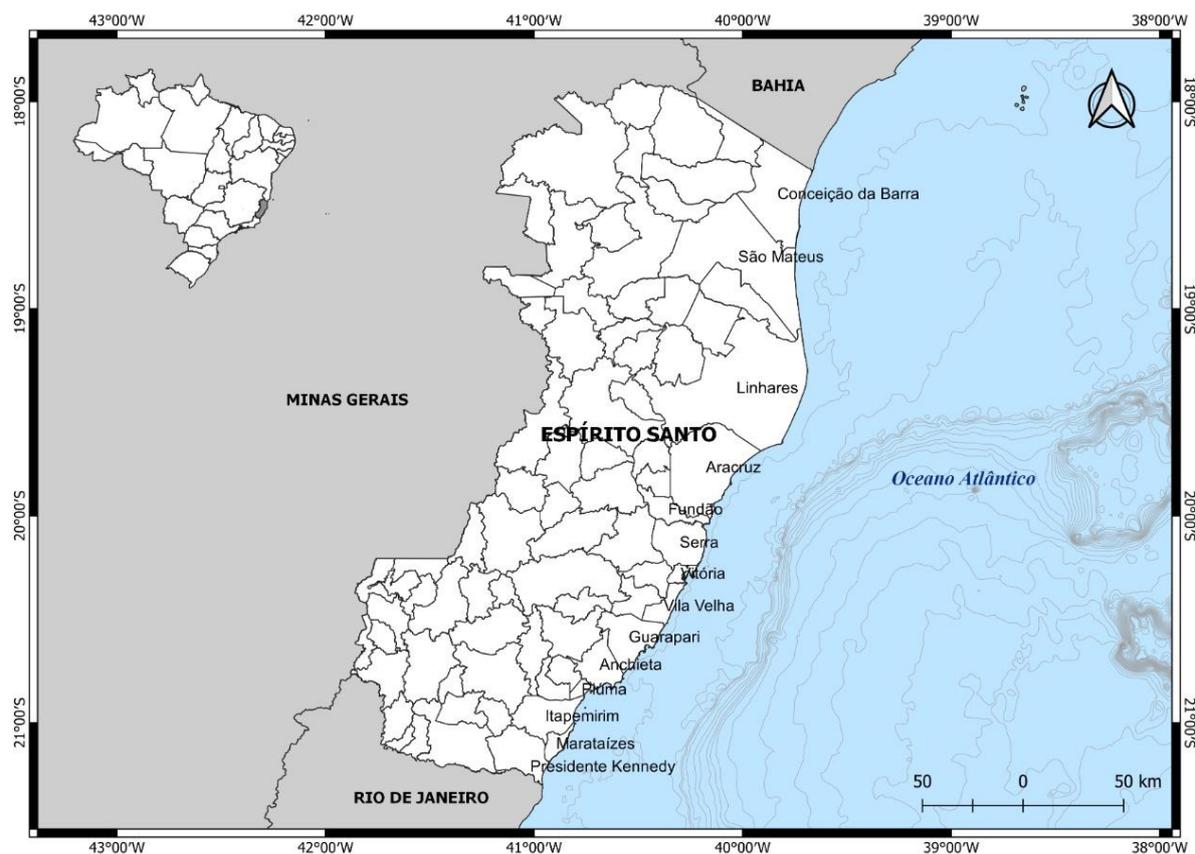


Figura 1 – Municípios litorâneos do Espírito Santo.

Fonte: Os autores com utilização do programa QGIS, ([2021])

A pesca é uma prática de importância econômica, que além da subsistência humana, implica em várias atividades, como o transporte e armazenamento, transformação do produto e venda, construção e manutenção das embarcações e apetrechos da pesca, que gera renda e emprega várias pessoas de forma indireta. O Registro Geral de Pesca é um instrumento do poder executivo essencial para o exercício da atividade pesqueira, que legaliza os respectivos usuários, credenciando pessoas físicas, jurídicas e as embarcações para o desempenho legal da pesca (JUSTO; ANELLO, 2020).

Apesar das deficiências quanto a coleta, estruturação e divulgação de dados de desembarque pesqueiro, a pesca artesanal marinha representa um número expressivo de produtividade e de frota em todo país, e sua importância é relatada em vários trabalhos (KNOX; TRIGUEIRO, 2015).

Os camarões são capturados ao longo da costa brasileira por diversas artes de pesca. Na região sudeste e sul são utilizadas: rede de aviãozinho, saco e coca, tarrafas, gerival e rede de arrasto de portas por embarcações motorizadas (Figura 2), sendo esta última, a mais utilizada no litoral do Espírito Santo (DIAS NETO, 2011).



Figura 2 – Embarcação motorizada da pesca de camarão com rede de arrasto de portas (seta) no litoral sul do Espírito Santo.

Fonte: Os autores.

As maiores produções de camarões no Brasil são obtidas com a pesca de arrasto. Tal método de pesca é considerado como um dos que possui maior eficiência, pelo fato de capturar tudo o que encontra pela frente durante o arrasto (Figura 3). No entanto, é identificado como o método mais predatório que causa danos à biodiversidade, com a grande captura de fauna acompanhante (*bycatch*) e também por causar danos ao ambiente aquático (DIAS NETO, 2011).

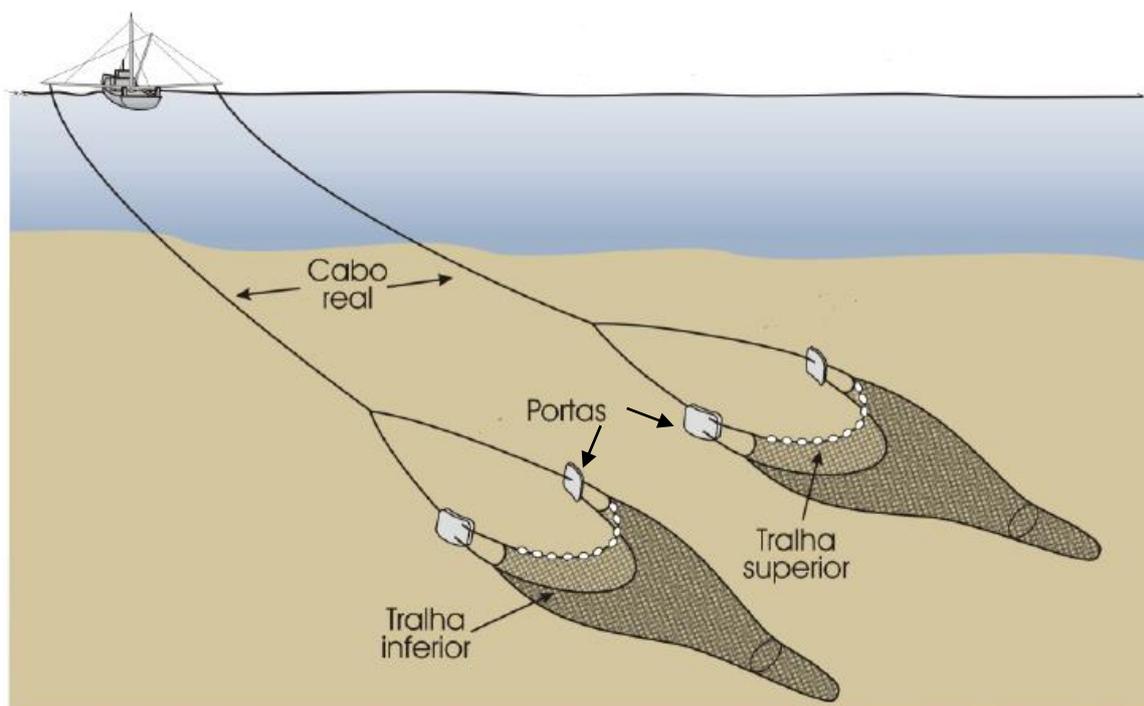


Figura 3 – Representação da pesca de arrasto de fundo, realizada na captura dos camarões.
Fonte: Fischer e Haimovici (2007).

A pesca de arrasto é então, caracterizada, por causar grandes impactos negativos no fundo marinho e por gerar imenso descarte de fauna acompanhante na pesca. Esta baixa eficiência ambiental precisa de uma gestão pesqueira eficaz, combinando diferentes estratégias para minimizar este impacto no ambiente e promover a preservação e conservação dos estoques e ecossistemas. Dentre essas estratégias está o período de defeso, e é necessário rever a forma de gestão dessa pescaria no país, pois tais consequências podem comprometer a própria atividade pesqueira a longo prazo (DIAS, 2020).

No Espírito Santo as espécies de camarão capturadas comercialmente ao longo da costa pertencem a família Penaeidae, sendo a mais abundante no total de captura, o camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*), seguido pelo camarão rosa (*Penaeus paulensis*, *P. brasiliensis*) e por último, o camarão branco (*Penaeus schmitti*) (HOSTIM-SILVA; SOARES, 2013).

Em um estudo realizado em duas comunidades pesqueiras artesanais, uma localizada ao norte, e outra na região sul do Espírito Santo, verificou-se que a pesca de arrasto de camarão possui importância econômica, cultural e social e os pescadores ativos pretendem continuar neste ramo de trabalho. Porém, a continuidade dessa profissão pode estar ameaçada, pois há poucos pescadores jovens neste ramo (MUSIELLO-FERNANDES; ZAPPES; HOSTIM-SILVA, 2017).

3 PERÍODO DE DEFESO DOS CAMARÕES

3.1 O QUE É O PERÍODO DE DEFESO E QUEM O ESTABELECE

Com o intuito de regularizar as pescarias do Brasil, foi criado o Código de Pesca no ano de 1967, atualizado pela lei n° 7.679 de 23/11/88. No entanto, a última atualização se deu pelo Decreto-lei n° 11.959 de 29 de junho de 2009 que revogou os dois anteriores. Tal documento, entre as medidas geradas de limite para a exploração dos recursos pesqueiros, implementa o período de defeso, que vem definido como uma paralisação temporária da atividade pesqueira. Sendo essa estratégia fundamental para a sustentabilidade e manutenção do estoque pesqueiro, detendo a pesca predatória em épocas de alta vulnerabilidade das espécies, possibilitando assim a continuidade de suas populações (BRASIL, 2009).

O período de defeso tem como objetivo a paralisação da pesca em épocas de reprodução ou recrutamento (chegada de nova classe etária na área de pesca), com o intuito de proporcionar benefícios ambientais e ecológicos com a proteção das espécies-alvo da pescaria. Assegurando, assim, a reposição dos estoques pesqueiros ou o ganho de peso dos indivíduos de determinada área geográfica (DIAS NETO, 2017; VASQUES; COUTO, 2011).

Este período é de grande importância, uma vez que proporciona a recuperação dos estoques, o que gera ganhos em incremento do peso de captura, resultando em benefício econômico para o setor. Além disso, também propicia uma recuperação do habitat e da biodiversidade, que são afetados pela pesca com rede de arrasto, sendo um benefício ecológico ao ambiente (SANTOS; BRANCO; BARBIERI, 2013).

De acordo com o Decreto-lei n° 10.779, de 25 de novembro de 2003, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), é o responsável no Brasil, por determinar qual o período de defeso das espécies alvo da pesca, sejam elas marinhas, fluviais ou lacustres (BRASIL, 2003).

3.2 HISTÓRICO DO PERÍODO DE DEFESO DOS CAMARÕES NO ESPÍRITO SANTO

O período de defeso sofreu diversas modificações ao longo do tempo (Quadro 1), devido ao fato de adaptar-se melhor quanto a realidade ecológica da pescaria, quanto por pressões sociais do setor de produção (FRANCO *et al.*, 2009).

Quadro 1 – Modificações do período de defeso dos camarões no Espírito Santo desde sua implantação em 1983. Os meses do ano em que ocorre o defeso estão apresentados em cinza.

Portaria ou Instrução normativa	Meses do ano de defeso dos camarões marinhos no Espírito Santo											
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
	A	E	A	B	A	U	U	G	E	U	O	E
	N	V	R	R	I	N	L	O	T	T	V	Z
Nº 50 de 20 de outubro de 1983 (CEPSUL, 1983).												
Nº 63 de 26 de dezembro de 1984 (CEPSUL, 1984).												
Nº 06 de 06 de fevereiro de 1986 (CEPSUL, 1986).												
Nº 02 de 17 de fevereiro de 1987 (CEPSUL, 1987).												
Nº 22 de 31 de agosto de 1988 (CEPSUL, 1988).												
Nº 231 de 07 de março de 1990 (CEPSUL, 1990).												
Nº 8287 de 20 de dezembro de 1991 (BRASIL, 1991).												
Nº 144 de 17 de novembro de 1997 (IBAMA, 1997).												
Nº 21 de 11 de fevereiro de 1999 (MMA, 1999).												
Nº 74 de 13 de fevereiro de 2001 (BRASIL, 2001).												
Nº 91 de 06 de fevereiro de 2006 (BRASIL, 2006a).												
Nº 92 de 07 de fevereiro de 2006 (BRASIL, 2006b).												
Nº 189 de 23 de setembro de 2008 (BRASIL, 2008).												
Nº 47 de 11 de setembro de 2018 (BRASIL, 2018).												

Fonte: Adaptado de Franco *et al.* (2009).

O defeso continua a enfrentar muitos problemas, em relação a fiscalização ineficiente dos órgãos competentes e quanto a ausência de respeito ao período, devido a insatisfação do setor produtivo. Estes fatores problemáticos fizeram com que a correta aplicação do período de defeso, fosse considerado muitas vezes, como uma medida de gestão não efetiva (FRANCO *et al.*, 2009).

3.3 SEGURO DEFESO

No decorrer do período de defeso de atividades pesqueiras, há o seguro defeso, que trata-se de ajuda monetária momentânea. O seguro defeso, está em exercício desde o ano de 1992, sendo propiciado ao pescador profissional que realiza a prática pesqueira ininterruptamente, de forma individual, artesanal, ou em condução de economia familiar. O seu valor é de um salário-mínimo mensal (DIAS NETO, 2017).

Este seguro contém dois propósitos, um social e outro ambiental. O social é proporcionar amparo financeiro ao pescador, ao longo do período de defeso, pois não é possível ele retirar seu sustento da pesca. O propósito ambiental, é ajudar na preservação de várias espécies aquáticas, na qual sua reprodução acontece justamente durante o período de defeso (CAMPOS; CHAVES, 2014; LOBATO; FERNANDES, 2020).

De acordo com o decreto-lei nº 13.134, de 16 de junho de 2015, para o pescador ser beneficiário do Seguro-Desemprego do Pescador Artesanal ao longo do período destinado ao defeso, é preciso cumprir com as seguintes condições (BRASIL, 2015):

- Atuar na atividade pesqueira de forma ininterrupta;
- Ter o cadastro ativo no Registro Geral de Pesca (RGP), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), há pelo menos um ano, na classe de pescador profissional artesanal;
- Ser classificado como segurado especial, na classe de pescador profissional artesanal;
- Vender sua produção à pessoa jurídica ou física, e comprovar a contribuição previdenciária dos últimos 12 meses anteriores à solicitação, para receber o seguro defeso ou entre o último período de defeso até o início do próximo período, o que for menor;
- Não estar recebendo nenhum tipo de benefício da Previdência Social ou Assistência Social, exceto alguns casos, como o auxílio-acidente e a pensão por morte; e

- Não ter ligação de emprego ou alguma outra relação de trabalho ou fonte de renda diferente da atividade pesqueira.

O pescador artesanal pertencente a uma colônia de pesca, associação de pescadores, ou algum sindicato, que possua Acordo de Cooperação Técnica (ACT) com o INSS, pode então realizar o seu requerimento diretamente com essa entidade, apresentando os documentos necessários, que serão enviados ao INSS (BRASIL, 2015).

O Registro Geral de Pesca (RGP) é ordenado com a destinação dos documentos necessários dos pescadores para os Escritórios Federais de Aquicultura e Pesca (EFAP). Então analisa-se e criam o processo administrativo no Sistema Informatizado do Registro Geral da Atividade Pesqueira (SisRGP), que é destinado para a Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP). Esta secretaria possui a atribuição de preparar o documento que permite e autoriza a prática de pesca artesanal. Sem o RGP não é possível a prática de pesca legitimada, e a obtenção do seguro defeso (BRASIL, 2018; JUSTO; ANELLO, 2020).

Desde o ano de 2012, o órgão governamental responsável em deferir o RGP não apresenta o devido documento aos solicitantes. Assim, os pescadores artesanais que realizaram a solicitação deste documento após 2012, possuem apenas o protocolo. Fato este que o impossibilitava de solicitar o seguro defeso (MALVENTI, [2021]).

Após todos esses anos, só a partir da portaria SAP/MAPA nº 318, de 24 de dezembro de 2020, foi regularizada a autorização provisória da prática pesqueira, para o pescador profissional artesanal, até ser possível a finalização do cadastramento do RGP. Sendo então, a partir desta portaria considerados estes protocolos de entrega de Relatório de Exercício da Atividade Pesqueira (REAP) entregues no prazo estabelecido pela lei, referente aos que ainda não foram adequadamente inspecionados e regularizados pelo EFAP (BRASIL, 2020).

As inconstâncias na gerência do setor pesqueiro refletem as mudanças ocorridas da estrutura governamental. Com a extinção do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) em 2015, sendo incorporado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Posteriormente, a Secretaria da Aquicultura e Pesca (SEAP) com a competência para fornecer o RGP, foi subordinada ao Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços (MDIC) (JUSTO; ANELLO, 2020). Atualmente, a SEAP encontra-se vinculada ao MAPA (MAPA, 2020).

3.4 EFETIVIDADE DE IMPLANTAÇÃO

Na gestão do setor pesqueiro no Brasil, são utilizadas diversas medidas, como: o controle do esforço de pesca, que é ligado às permissões de embarcações e de pesca para os pescadores; as restrições de apetrechos de pesca; determinação de tamanho mínimo de captura de determinadas espécies; mecanismos de escape para fauna acompanhante; delineamento de reservas marinhas e o período de defeso. Em vários casos, tais medidas não geram os resultados esperados, o que pode ser atribuído a diversos motivos, como: deficiências de fundamentação científica; participação insatisfatória do setor produtivo; fiscalização ineficiente; falta de dados estatísticos pesqueiros e a ausência de uma ação conjunta entre os órgãos gestores e os representantes do setor pesqueiro. A não obtenção de resultados esperados ocasiona dificuldade da gestão em entender os interesses na pesca, e do setor pesqueiro em respeitar tais medidas restritivas (FRANCO *et al.*, 2009).

A conservação da sustentabilidade na pesca tem sido um grande desafio no Brasil, para os gestores dessa atividade (ISAAC *et al.*, 2006; MARTINS; PINHEIRO; LEITE JÚNIOR, 2013). É evidente a necessidade de estudos regionais e integrados ao conhecimento tradicional dos pescadores, visando à compatibilidade dos dados obtidos com a realidade de cada local, em busca de um período de defeso efetivo e de medidas mais eficientes de ordenamento pesqueiro (OLIVEIRA, 2018).

Um dos fatores que dificultam a implementação do defeso do camarão no Espírito Santo, é a escassez de estudos que comprovem o período reprodutivo e de recrutamento dos camarões. Visto que os últimos estudos relacionados a esse assunto no referido estado, foram publicados no ano de 2013, por Martins, Pinheiro e Leite Júnior (2013). Tais autores coletaram dados referente aos anos de 2003 e 2004, e relataram a existência de desova contínua e do recrutamento de dezembro a fevereiro e em julho e agosto de uma das espécies, *Xiphopenaeus kroyeri*, incluídas na legislação do período de defeso do estado. Por sua vez, Eutrópio *et al.* (2013) coletaram dados referente ao ano de 2008, e indicaram um período de recrutamento e reprodução nos meses do verão e outono, para esta mesma espécie.

Pescadores da região sul do Espírito Santo que atuam na pesca de arrasto sabem identificar as espécies de crustáceos por características de coloração, tamanho corporal, estruturas morfológicas e abdome, demonstrando um saber local sobre biologia e ecologia das espécies de camarão. Além disso, compreendem que o período de defeso é necessário para a manutenção da pesca ao longo dos anos, mas consideram a época que é estabelecida no estado inadequada, por relacionarem que, fora deste período os camarões estão pequenos, e que

durante, os camarões estão grandes e prontos para a comercialização, então consideram mais adequado se fosse nos meses de maio e julho (OLIVEIRA; BRAGA; ZAPPES, 2021).

Outro fator para o período de defeso não surtir o efeito de que é esperado para o manejo dos recursos pesqueiros, é o fato de muitos pescadores não o seguirem, pois continuam pescando e violando a lei, apesar da proibição da captura de camarão. O maior fator motivador desse comportamento é o valor do seguro defeso pago aos pescadores, pois é inferior à renda mensal que eles obtêm com a pesca e, portanto, acabam sendo motivados a buscar fontes alternativas de renda para sustentar suas famílias (MUSIELLO-FERNANDES; ZAPPES; HOSTIM-SILVA, 2017).

Em comunidades de pescadores do Espírito Santo e da Bahia, os entrevistados relatam que essa compensação do seguro defeso é insuficiente para sustentar financeiramente suas famílias, já que a proibição da pesca diminui sua renda. A maior parte dos participantes da pesquisa afirmou que o valor ideal para o seguro defeso seria o dobro do valor atualmente pago (MUSIELLO-FERNANDES; ZAPPES; HOSTIM-SILVA, 2017).

Outra grande problemática é garantir que a pesca artesanal receba do Governo Federal o devido tratamento. Seja das instituições diretamente conectadas à emissão das autorizações, assim como, a garantia de sua subsistência nos períodos de defeso. O que vem ocorrendo nos últimos anos é uma fragilização das instituições que regem as atividades relacionadas à pesca, como a extinção do Ministério da Pesca e Aquicultura em 2015, que acarretou, por conseguinte, constantes modificações da estrutura governamental. Fato este que fragiliza um sistema que já é por si, precário, composto por classe trabalhadora humilde e que sofre com uma série de limitações (JUSTO; ANELLO, 2020).

Abreu *et al.* (2020) citaram que a baixa escolaridade pode afetar a situação econômica, social e a qualidade de vida dos pescadores artesanais, pois este fator colabora com a dificuldade de se organizarem na busca pelos seus direitos e melhoria de condições de trabalho. A partir do entendimento dos relatos dos pescadores e o diálogo entre os atores locais e as governanças, é proporcionado uma facilidade no auxílio da gestão pesqueira e na solução de possíveis conflitos entre as partes envolvidas.

Considerando o cenário da pesca artesanal de camarão, Fernandes, Keunecke e Di Benedetto (2014) sugeriram medidas para melhoria da qualidade de vida destes pescadores, como investimento na educação de adultos, aumentando seu nível de escolaridade, e a realização de cursos de qualificação em função de atender a demanda da pesca local e do público-alvo.

A fim de incentivar um assentimento ao período de defeso, para incorporar a participação de todas as partes envolvidas do setor, como os atores locais e os cientistas, de forma a promover o diálogo nas comunidades pesqueiras, algumas ações são sugeridas. Dentre estas, citam-se: obtenção de informações detalhadas sobre a pesca de arrasto no local; limitar a quantidade de redes de arrasto por dia; em conjunto com a comunidade, determinar quais práticas tradicionais pesqueiras podem substituir a rede de arrasto no período de defeso; incluir todas as comunidades de pescadores na elaboração de legislações, como o próprio período de defeso; estimular o surgimento de grupos de liderança; valorizar os atores sociais, trocando conhecimentos sobre os recursos pesqueiros da pesca de camarão; promover educação ambiental que ressalte a importância deste período; e avaliar o valor pago no seguro defeso de forma a diminuir os conflitos sociais (MUSIELLO-FERNANDES; ZAPPES; HOSTIM-SILVA, 2017).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O período de defeso passou por diversas mudanças ao longo dos anos, e ainda passa por desafios de compreensão do comportamento e habitat dos camarões presentes na pesca camaroeira do estado, o que demonstra a necessidade de estudos regionais sobre a biologia e reprodução dessas espécies.

Além das questões biológicas, os aspectos sociais de todos os envolvidos precisam ser incluídos nessa análise do período ideal de defeso para os camarões. O valor dado pelo Governo de seguro defeso não é o suficiente para a classe trabalhadora manter o sustento de suas famílias, caracterizando como uma das principais motivações para o não respeito desse período. É preciso mais pesquisas, e que os pescadores sejam inseridos em todas as etapas, buscando compreender conjuntamente sobre o comportamento das espécies até a tomada de decisão pelos órgãos competentes.

Ações de educação ambiental com a comunidade são de extrema importância, para todos serem envolvidos e engajados com o propósito do período de defeso de preservação das espécies. Portanto, só é possível o sucesso dessa ação, com o empenho do trabalho em conjunto com todos os participantes, e com fundamentações sociais práticas que valorizem o setor.

5 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo auxílio financeiro e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

6 REFERÊNCIAS

ABREU, J. S. de *et al.* Pesca artesanal no município de Guarapari, estado do Espírito Santo: Uma abordagem sobre a percepção de pescadores que atuam na pesca de pequena escala. **Sociedade e Natureza**, v. 32, n. 1, p. 59-74, 2020.

BRASIL. Decreto-lei nº 8.287 de 20 de dezembro de 1991. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 dez. 1991. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Decreto-lei nº 10.779 de 25 de novembro de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 nov. 2003. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Decreto-lei nº 11.959 de 29 de junho de 2009. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 jun. 2009. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Decreto-lei nº 13.134 de 16 de junho de 2015. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 17 jun. 2015. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Instrução Normativa nº 6 de 20 de agosto de 2018. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 21 ago. 2018. Seção 1, p. 3.

BRASIL. Instrução Normativa nº 91 de 06 de fevereiro de 2006. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 07 fev. 2006a. Seção 1, p. 51.

BRASIL. Instrução Normativa nº 92 de 07 de fevereiro de 2006. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 fev. 2006b. Seção 1, p. 80.

BRASIL. Instrução Normativa nº 189 de 23 de setembro de 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 set. 2008. Seção 1, p. 83.

BRASIL. Portaria Interministerial nº 47 de 11 de setembro de 2018. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 12 set. 2018. Seção 1, p. 5.

BRASIL. Portaria MMA nº 74 de 13 de fevereiro de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 15 fev. 2001. Seção 1, p. 40.

BRASIL. Portaria SAP/MAPA nº 318 de 24 de dezembro de 2020. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 dez. 2020. Seção 1, p. 6.

CAMPOS, A. G.; CHAVES, J. V. **Seguro defeso: problemas enfrentados pelo programa.** Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea). Mercado de trabalho: conjuntura e análise,

Brasília: Ipea, 2014. Disponível em: <<http://repositorio.ipea.gov.br/handle/11058/3782>>. Acesso em: 28 mai. 2021.

CEPSUL (CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE MARINHA DO SUDESTE E SUL). **Portaria IBAMA nº 231/1990**.

Itajaí: ICMBio, 1990. Disponível em: <

https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/1990/p_ibama_231_1990_revkd_defesocamaroes_nac_revkd_p_ibama_25_1992_8_1993.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2021.

CEPSUL (CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE MARINHA DO SUDESTE E SUL). **Portaria SUDEPE nº 02-N/1987**.

Itajaí: ICMBio, 1987. Disponível em:

<https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/1987/p_sudepe_02_1987_revkd_defesocamaroes_ba_se_s_1_revkd_p_sudepe_22_1988.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2021.

CEPSUL (CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE MARINHA DO SUDESTE E SUL). **Portaria SUDEPE nº 06-N/1986**.

Itajaí: ICMBio, 1986. Disponível em: <

https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/1986/p_sudepe_06_n_1986_revkd_defesocamarao_se_s_revkd_p_02_1987.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2021.

CEPSUL (CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE MARINHA DO SUDESTE E SUL). **Portaria SUDEPE nº 22-N/1988**.

Itajaí: ICMBio, 1988. Disponível em: <

https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/1988/p_sudepe_22_1988_revkd_defesocamaroes_ba_se_revkd_p_sudepe_2_1987_revkd_27_1988.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2021.

CEPSUL (CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE MARINHA DO SUDESTE E SUL). **Portaria SUDEPE nº 50-N/1983**

Itajaí: ICMBio, 1983. Disponível em:

<https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/1983/p_sudepe_50_1983_revogada_defesocamarao_se_s_alterada_p_7_1984_revogada_p_63_1984.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2021.

CEPSUL (CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE MARINHA DO SUDESTE E SUL). **Portaria SUDEPE nº 63-N/1984**.

Itajaí: ICMBio, 1984. Disponível em:

<<https://www.icmbio.gov.br/cepsul/legislacao/portaria/256-1984.html>>. Acesso em: 27 jun. 2021.

DIAS, M. **Impactos da pesca de arrasto no Brasil e no mundo: dados atualizados e tendências globais**. Brasília: Oceana Brasil, 2020. 68p.

DIAS NETO, J. **Análise do seguro-desemprego do pescador artesanal e de possíveis benefícios para a gestão pesqueira**. Brasília: Ibama, 2017. 120p.

DIAS NETO, J. **Proposta de plano nacional de gestão para o uso sustentável de camarões marinhos do Brasil**. Brasília: Ibama, 2011. 242p.

EUTRÓPIO, F. J. *et al.* Population parameters of the shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea, Penaeidae), caught by artisanal fisheries in Anchieta, Espírito Santo State. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 2, p. 141-147, 2013.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **The state of world fisheries and aquaculture 2020**. Sustainability in action. Rome: FAO, 2020. Disponível em: <<http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en>>. Acesso em: 10 mai. 2021.

FERNANDES, L. P.; KEUNECKE, K. A.; DI BENEDITTO, A. P. M. Produção e socioeconomia da pesca do camarão sete-barbas no norte do estado do Rio de Janeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 40, n. 4, p. 541-555, 2014.

FISCHER, L. G.; HAIMOVICI, M. Ilustrações das divisões do mar e de petrechos utilizados nas prospecções pesqueiras. In: HAIMOVICI, M. **A prospecção pesqueira e abundância de estoques marinhos no Brasil nas décadas de 1960 a 1990**: levantamento de dados e avaliação crítica. Brasília: MMA/SMCQA, 2007. p. 321.

FRANCO, A. C. N. P. *et al.* Levantamento, sistematização e análise da legislação aplicada ao defeso da pesca de camarões para as regiões sudeste e sul do Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 4, p. 687-699, 2009.

HOSTIM-SILVA, M.; SOARES, G. S. S. **Boletim estatístico da pesca do Espírito Santo - Ano 2011**: programa de estatística pesqueira do Espírito Santo. São Mateus: Universidade Federal do Espírito Santo, 2013. 94p.

IBAMA (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS). **Portaria IBAMA nº 144, 17 de novembro de 1997**. Brasília: ICMBio, 1997. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/1997/p_ibama_144_1997_revogada_defesocamarao_ba_se_s_revoga_p_ibama_115_1996_revogada_p_mma_21_1999.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2021.

ISAAC, V. J. *et al.* **A pesca marinha e estuarina do Brasil no início do século XXI**: recursos, tecnologias, aspectos socioeconômicos e institucionais. Belém: Universidade Federal do Pará, 2006. 188p.

JUSTO, F. S.; ANELLO, L. F. S. de. O descaso da administração pública para com os pescadores artesanais e a importância da educação ambiental para oferecer alternativas viáveis à manutenção das suas atividades e qualidade de vida. **Revista Latino-Americana de Estudos em Cultura e Sociedade**, v. 6, Edição especial, p. 1-13, 2020.

KNOX, W.; TRIGUEIRO, A. **Saberes, narrativas e conflitos na pesca artesanal**. Vitória: EDUFES, 2015. 229p.

LOBATO, R. S.; FERNANDES, J. F. F. Aspectos legais do seguro defeso sobre a atividade da pesca. **Mares: Revista de Geografia e Etnociências**, v. 2, n. 1, p. 123-126, 2020.

MALVENTI, D. **Justiça garante seguro-defeso a pescador artesanal, mesmo sem Registro Geral da Pesca (RGP)**. Brasília: Jusbrasil. Disponível em:

<<https://dimitriadv.jusbrasil.com.br/noticias/886169877/justica-garante-seguro-defeso-a-pescador-artesanal-mesmo-sem-registro-geral-da-pesca-rgp>>. Acesso em: 27 jun. 2021.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Secretaria de Aquicultura e Pesca - SAP/MAPA**. Brasília: Secretaria de Aquicultura e Pesca, 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/acao-informacao/institucional/quem-e-quem-novo/secretaria-de-aquicultura-e-pesca>>. Acesso em: 27 jun. 2021.

MARTINS, A. S.; PINHEIRO, H. T.; LEITE JÚNIOR, N. O. Biologia reprodutiva do camarão sete-barbas no litoral centro sul e sul do Espírito Santo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 39, n. 3, p. 205-215, 2013.

MMA (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE). **Portaria MMA nº 21, de 11 de fevereiro de 1999**. Brasília: ICMBio, 1999. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/1999/p_mma_21_1999_defesocamaroes_ba_es_rs_alterada_p_mma_74_2001.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2021.

MPA (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA). **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011**. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2012. 60p.

MUSIELLO-FERNANDES, J.; ZAPPES, C. A.; HOSTIM-SILVA, M. Small-scale shrimp fisheries on the Brazilian coast: Stakeholders perceptions of the closed season and integrated management. **Ocean & Coastal Management**, v. 148, n. 1, p. 89-96, 2017.

OLIVEIRA, A. C. M. de. **Aspectos etnobiológicos e etnoecológicos na pesca artesanal em três municípios do litoral sul do Espírito Santo**. 2018. 88 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Ambiental) - Programa de Pós Graduação em Oceanografia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018.

OLIVEIRA, A. C. M. de; BRAGA, A. A.; ZAPPES, C. A. **Conhecimento tradicional de pescadores do Espírito Santo: uma abordagem sobre os crustáceos**. Campos dos Goytacazes: FAPERJ, 2021. 62p.

PEREZ, J. A. *et al.* Relatório da reunião técnica de ordenamento da pesca de arrasto nas regiões sudeste e sul do Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 1-34, 2001.

QGIS. **Um sistema de informação geográfica livre e aberto**. Disponível em: <https://www.qgis.org/pt_BR/site/>. Acesso em: 30 mai. 2021.

SANTOS, M. C. F.; BRANCO, J. O.; BARBIERI, E. Biologia e pesca do camarão sete-barbas nos estados nordestinos brasileiros onde não há regulamentação do período de defeso. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 39, n. 3, p. 217-235, 2013.

VASQUES, R. O.; COUTO, E. C. G. Percepção dos pescadores quanto ao estabelecimento do período de defeso da pesca de arrasto para a região de Ilhéus (Bahia, Brasil). **Revista da Gestão Costeira Integrada**, v. 11, n. 4, p. 479-485, 2011.

Capítulo 3

Jacarés do Brasil: biologia, manejo e conservação de *Caiman latirostris*



Mariana de Oliveira Lima¹
Amanda Soares dos Santos²
Gabriela de Oliveira Resende³
Felipe Martins Pastor⁴
Marcelo Renan de Deus Santos⁵
Yhuri Cardoso Nóbrega⁶
Rodrigo Giesta Figueiredo⁷
Maria Aparecida da Silva⁸

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: marianadeoliveiralima@outlook.com.br

² Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: amandasoaresds@gmail.com

³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: gabrielaoresende@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Uberlândia, e-mail: felipempastor@gmail.com

⁵ Instituto Marcos Daniel, Projeto Caiman, e-mail: mrenansantos@gmail.com

⁶ Instituto Marcos Daniel, Projeto Caiman, e-mail: yhuri@institutomarcosdaniel.org.br

⁷ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: rodrigo.figueiredo@ufes.br

⁸ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mvmariaaparecida@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O clado Diapsida, cuja etimologia se refere à presença de duas aberturas na região temporal do crânio, uma superior e outra inferior, é a linhagem de vertebrados amnióticos que deu origem a maioria dos vertebrados terrestres viventes (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Esse grupo foi responsável por abrigar uma das maiores diversidades de vertebrados da Era Mesozoica, fornecendo, posteriormente, importantes registros fósseis classificados nos grupos Lepidosauromorpha e Archosauromorpha (OLIVEIRA; PINHEIRO; KERBER, 2020). A Era Mesozoica, também conhecida como “Era dos Répteis”, durou cerca de 186 milhões de anos e foi caracterizada pela coexistência de uma fauna que contava com linhagens representantes de vertebrados recentes, como as aves e os crocodilianos, junto a grupos de animais extintos atualmente, a exemplo dos dinossauros. Todos habitando vários locais ao redor do mundo e com espécies presentes em diferentes habitats (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

Um dos principais grupos de arcossauromorfos é o clado dos Archosauria, exemplo de sucesso evolutivo e adaptativo, tendo em vista que foram animais capazes de ocupar diversos nichos tróficos em quase todos os continentes ao longo do Mesozoico (HOLLIDAY; GARDNER, 2012). Os representantes vivos desse clado são as aves e os crocodilianos que, portanto, podem ser considerados evolutivamente grupos-irmãos (GREEN *et al.*, 2014).

A história dos Crocodylomorpha se inicia há cerca de 231 milhões de anos, ainda no início do período Triássico Superior, e uma parte importante da história evolutiva desse grupo ocorreu no que conhecemos hoje como continente africano e continente sul-americano (RIFF *et al.*, 2012). Os Crocodylia formam o grupo-coronal dos Crocodylomorpha, ou seja, o grupo que inclui além de várias espécies extintas, todos os representantes vivos no tempo presente (POUGH; JANIS; HEISER, 2008; RIFF *et al.*, 2012). Os crocodilianos, como são conhecidos coloquialmente, são os maiores répteis vivos atualmente, sendo o maior deles *Crocodylus porosus*, que pode chegar ao tamanho de seis metros e pesar mais de uma tonelada (GRIGG; KIRSHNER, 2015; POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Atualmente o número de táxons válidos pode variar, sendo reconhecidas ao menos 24 espécies que possuem de porte médio a grande e estão distribuídas por toda faixa intertropical do globo terrestre (FIGUEIREDO, 2019). Os animais desse grupo são encontrados em quase todos os continentes, com exceção da Europa e da Antártica, sendo a América do Sul a responsável por abrigar a maior diversidade do mundo de indivíduos desse grupo, sendo, ao todo, habitat para 8 espécies (RIFF *et al.*, 2012).

A ordem Crocodylia se restringe à um pequeno grupo monofilético que possui ancestralidade comum às três famílias viventes, que são elas: Gavialidae, Crocodylidae e

Alligatoridae, sendo a última a representante de duas espécies de aligátors e de todas as espécies de jacarés viventes e que existem em território brasileiro, pertencentes aos gêneros *Melanosuchus*, *Paleosuchus* e *Caiman* (RIFF *et al.*, 2012; VASCONCELOS, 2005). Segundo Verdade (1995), dentro desses gêneros, se ramificam as seis espécies denominadas *Melanosuchus niger*, *Paleosuchus palpebrosus*, *Paleosuchus trigonatus*, *Caiman crocodilus crocodilus*, *Caiman yacare* e *Caiman latirostris*.

Apesar da vasta quantidade de espécies de crocodilianos viventes, a diversidade encontrada atualmente corresponde apenas a uma pequena fração de espécies, hábitos, habitats, tamanho e características morfológicas que pertenceu a este grande grupo ao longo de toda evolução (RIFF *et al.*, 2012).

Diante do exposto, objetivou-se apresentar as espécies de crocodilianos da família Alligatoridae que ocorrem no Brasil, bem como, descrever brevemente suas características macroscópicas, biologia reprodutiva e distribuição geográfica. Além disso, identificar e discutir sobre a principal espécie encontrada no país, *C. latirostris*, e os impactos que sua população sofre por meio da destruição de seus habitats naturais e a exploração comercial de seus subprodutos.

2 ESPÉCIES DA FAMÍLIA ALLIGATORIDAE DO BRASIL

2.1 Melanosuchus niger

No Brasil, ocorrem seis espécies pertencentes à família Alligatoridae (VERDADE, 1995, COSTA; BÉRNILS, 2018). A maior espécie descrita dentre todas é *Melanosuchus niger*, conhecida popularmente como jacaré-açú, em que machos adultos podem chegar a cinco metros de comprimento total, e as fêmeas adultas chegam próximo aos três metros, atingindo a maturidade sexual acerca dos dois metros de comprimento. São animais que em período reprodutivo constroem ninhos, como todos os outros crocodilianos, e a quantidade de ovos depositada é em torno de 40 (THORBJARNARSON, 2010).

Como único representante do gênero *Melanosuchus* no Brasil, *M. niger* possui características físicas marcantes, como o corpo de cor preta, que dá a espécie o nome popular de *black caiman*, com faixas amarelas cruzando parte da cabeça, do pescoço, do tronco e da cauda; possui de três a cinco manchas mais escuras nas laterais da mandíbula e possui algumas porções ventrais esbranquiçadas (Figura 1) (BRAZAITIS, 1973).



Figura 1 – Morfologia externa de filhote de *Melanosuchus niger*. Corpo de coloração preta com faixas amarelas (setas) que irradiam em parte do pescoço, tronco e cauda. Manchas pretas na mandíbula (círculo).

Fonte: Adaptado de Eleutério (2020).

Essa espécie está distribuída ao longo de toda bacia do rio Amazonas, mas indivíduos também podem ser encontrados em outras localidades além da Amazônia. Ocupa diversos habitats e nichos tróficos, tais como rios, riachos, lagoas marginais e alguns locais de savana que inundam em algumas épocas do ano. De acordo com estudos feitos acerca da espécie, o habitat preferencial de *M. niger* são os lagos de planície. Essa espécie se distribui geograficamente ao longo de países da América do Sul, como a Guiana e a Guiana Francesa, parte da Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Brasil (THORBJARNARSON, 2010).

2.2 *Paleosuchus palpebrosus*

Ao contrário da espécie *Melanosuchus niger*, *Paleosuchus palpebrosus*, conhecido popularmente como jacaré-paguá ou jacaré-anão, é a menor espécie de crocodilianos da família Alligatoridae. Seus indivíduos machos adultos podem chegar ao tamanho máximo de 1,5 metros de comprimento total e as fêmeas a 1,2 metros. A pigmentação das escamas dos indivíduos é preto-acinzentado, com exceção da mandíbula que possui cor mais clara; há uma faixa preta mediana em evidência no focinho; e a cauda que, em ambos os lados, se destacam manchas claras e escuras alternadas (Figura 2) (MAGNUSSON, 1992a).



Figura 2 – Morfologia externa de *Paleosuchus palpebrosus*. A) Corpo preto-acinzentado com cauda que possui manchas claras e escuras alternadas (seta). B) Mandíbula de cor mais clara (seta).

Fonte: Adaptado de Eleutério (2021a).

Pouco se sabe sobre a biologia reprodutiva dessa espécie, e o que foi observado em alguns estudos se assemelha as outras espécies de crocodilianos, como por exemplo, a construção de ninhos pelas fêmeas para a oviposição. Além disso, esses ninhos são comumente encontrados em florestas inundadas sazonalmente, construídos a base de folhas em decomposição e gravetos, e os ovos são registrados a distâncias de 15 a 20 metros da água (CAMPOS; SANAIOTTI, 2006; MAGNUSSON, 1992a). A espécie é encontrada acerca de bacias da Amazônia e do rio Orinoco, e sua distribuição estende-se pelo sul do território brasileiro em bacias de drenagem do rio Paraná e Paraguai, podendo ser encontrada nos estados da Bahia e de Minas Gerais (MEDEM, 1983).

2.3 *Paleosuchus trigonatus*

Os crocodilianos pertencentes à espécie *Paleosuchus trigonatus* são conhecidos popularmente como jacaré-coroa, jacaré-curuá ou caimão-de-cara-lisa (CAMPOS; MAGNUSSON; MUNIZ, 2019; MAGNUSSON, 1992b). Segundo Brazaitis (1973), sua coloração na superfície dorsal do tronco é marrom escura e com faixas cruzadas de cor marrom mais escuro ou preto, e que chegam até a cauda; o crânio é marrom escuro e as orelhas são mais escuras, chegando ao preto. Alguns indivíduos possuem as laterais do corpo amareladas. Apresentam uma faixa mediana na superfície dorsal do focinho marrom escura ou preta. Ventralmente, possui manchas marrons (Figura 3).



Figura 3 – Morfologia externa de *Paleosuchus palpebrosus*. Corpo dorsalmente marrom escuro e lateralmente amarelado com faixa mediana marrom escura ou preta na superfície dorsal do focinho (seta).

Fonte: Adaptado de Campos *et al.* (2013).

De acordo com Magnusson (1992b), *P. trigonatus* é considerada uma espécie que possui indivíduos de pequeno porte, sendo que o maior animal registrado foi de 2,2 metros de comprimento total. Porém, indivíduos machos adultos raramente são encontrados com tamanho maior que 1,7 metros, e as fêmeas normalmente possuem menos de 1,4 metros de comprimento. Semelhante ao que Medem (1981) descreveu sobre os ninhos de *P. palpebrosus*, os ninhos de *P. trigonatus* são construídos por serrapilheira compactada, e possuem cerca de 60 cm de altura e 1,5 metros de diâmetro.

Em estudo feito por Magnusson e Lima (1991), registrou-se que machos e fêmeas possuem diferentes idades reprodutivas, sendo que as fêmeas atingem a idade mínima para reprodução aos 11 anos, enquanto machos, aos 20 anos. Apesar disso, não se pode afirmar com precisão com qual tamanho corporal a espécie *P. trigonatus* atinge, fisiologicamente, a capacidade para reprodução.

Os indivíduos dessa espécie são encontrados em países como a Bolívia, Brasil, Equador, Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela. Em território brasileiro, é descrito principalmente nos rios e riachos com densa vegetação aquática (CAMPOS; MAGNUSSON; MUNIZ, 2019; MAGNUSSON, 1992b).

2.4 *Caiman crocodilus*

A espécie *Caiman crocodilus* possui uma larga distribuição ao longo das Américas, e atualmente se subdivide em quatro subespécies reconhecidas, sendo elas *C. c. crocodilus*, *C. c. fuscus*, *C. c. chiapasius* e *C. c. apaporiensis* (VELASCO; AYARZAGÜENA, 2010). Também conhecido como jacaré-de-óculos, a espécie é descrita em 16 países (Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago e Venezuela), e, além disso, foi introduzida em outros 3 (Cuba, Porto Rico e Estados Unidos). Tem como forte característica a alta taxa de recuperação e permanece com alta densidade populacional em vários países mesmo após décadas de exploração comercial. Estimativas afirmam que os indivíduos são numerosos (chegando aos milhões), e que não existem evidências de que ao longo dos anos a espécie tenha passado por queda na quantidade populacional (BALAGUERA-REINA; VELASCO, 2019).

Segundo Brazaitis (1973), as características macroscópicas se diferem de acordo com as subespécies. Com exceção de *C. c. fuscus* e *C. c. chiapasius* que são consideradas subespécies idênticas por alguns pesquisadores (ESPINOSA, 1998), as características macroscópicas das subespécies de *C. crocodilus* são: *C. c. crocodilus* possui cor verde-oliva na superfície dorsal de todo o corpo e manchas marrom-escuro que vão da cabeça à cauda, e ventralmente, apresentam coloração que varia entre o creme e o amarelo; *C. c. apaporiensis* apresenta coloração marrom amarelado em sua superfície corporal dorsal, manchas pretas na cabeça, as extremidades do corpo são cinza-escuro ou preto, o ventre é amarelado, e indivíduos jovens possuem coloração amarela; por sua vez, *C. c. fuscus* possui coloração marrom claro, marrom esverdeado ou amarelo claro em sua superfície corporal dorsal, manchas marrom escuras nas laterais da cauda, ventre creme ou amarelado, sendo que indivíduos mais velhos tendem a terem cor marrom-escuro uniforme, tendo suas faixas quase imperceptíveis (Figura 4) (BRAZAITIS, 1973; ESPINOSA, 1998).

A espécie é reconhecida como animal de médio porte, variando entre dois metros e 2,5 metros de comprimento, assim como *C. c. apaporiensis* e *C. c. crocodilus*, respectivamente (BRAZAITIS, 1973). Possui alto nível de adaptação para sobrevivência em qualquer habitat, podendo ser encontrado em rios, riachos, lagoas, lagos, pântanos e represas (VELASCO; AYARZAGÜENA, 2010).

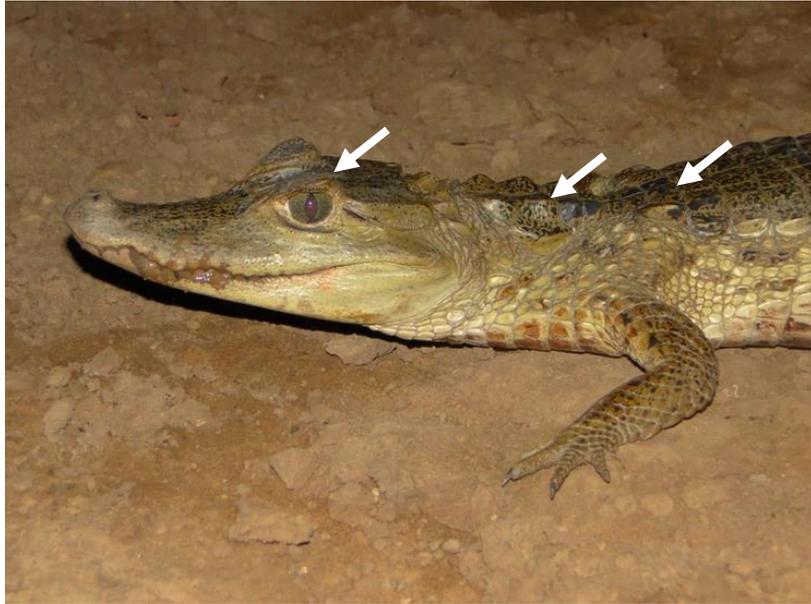


Figura 4 – Morfologia externa de *Caiman crocodilus*. Corpo dorsalmente de cor verde-oliva e ventralmente amarelado, com manchas de cor marrom escuro que se estendem da cabeça até a cauda (seta).

Fonte: Adaptado de Eleutério (2021b).

Segundo Thorbjarnarson (1994), as fêmeas de *C. crocodilus* atingem a plena idade reprodutiva com 1,2 metros de comprimento total, e ao se reproduzirem, são postos de 28 a 32 ovos por ninhada. Assim como os outros crocodilianos, a oviposição é feita em ninhos em montículos de folhas secas e galhos, e ocorre geralmente na estação chuvosa do ano.

2.5 *Caiman yacare*

Conhecido popularmente como jacaré-do-pantanal, a espécie *C. yacare* é, quase sempre, descrita como uma espécie completa (MEDEM, 1983). Porém, alguns autores descrevem o jacaré-do-pantanal como uma subespécie de *C. crocodilus*, devido à proximidade genética e morfológica que existem entre ambas, e dessa forma, descrevem cientificamente o jacaré-do-pantanal como *C. crocodilus yacare* (CAMPOS *et al.*, 2010). Apesar da grande semelhança genotípica entre ambas, essas duas espécies possuem características reprodutivas e distribuições geográficas diferentes, necessitando de estudos mais aprofundados a fim de encontrar os limites e variações entre populações de jacarés, e dessa forma, caracterizá-las geneticamente (CAMPOS *et al.*, 2010; VELASCO; AYARZAGÜAENA, 2010; ROBERTO *et al.*, 2020).

Indivíduos adultos possuem manchas pretas na superfície dorsal da cabeça, tronco e cauda, e comumente, podem apresentar coloração completamente preta no dorso do corpo. Animais jovens e adultos possuem de três a cinco manchas pretas na mandíbula. Possuem a

porção ventral do corpo com coloração creme ou amarelo, e podem apresentar coloração avermelhadas ou alaranjada que irradiam entre as escamas nas laterais do corpo (Figura 5) (BRAZAITIS, 1973). Animais dessa espécie são considerados crocodilianos de porte médio, podendo chegar aos 2,5 metros de comprimento total quando adultos, sendo que seu tamanho se assemelha ao tamanho de indivíduos de *C. latirostris* (BRAZAITIS, 1973; CAMPOS *et al.*, 2020).



Figura 5 – Morfologia externa de *Caiman yacare*. Corpo de cor preto dorsalmente, com manchas na mandíbula evidenciadas (seta).

Fonte: Adaptado de Nachtigall (2020).

Assim como todas as outras espécies de crocodilianos, a fêmea de jacaré-do-pantanal constrói seus ninhos em montículos de folhas e galhos, e a oviposição ocorre durante o pico da estação mais chuvosa, entre os meses de dezembro e fevereiro. Geralmente os ovos variam em número, normalmente sendo de 22 a 35 ovos por ninhada, e raramente chegando aos 40 (CAMPOS *et al.*, 2010). Alguns autores descrevem que o número de ovos pode variar de acordo com o habitat em que o animal está inserido (CAMPOS, 1993). Alguns machos entre dois e três anos de idade (de 30 a 40 cm de comprimento rostro-cloacal) demonstram capacidade na produção de espermatozoides, porém, testículos completamente maduros só foram observados em indivíduos que possuíam idade entre nove e dez anos (a partir de 90 cm de comprimento rostro-cloacal), considerando esta como a faixa de início da idade reprodutiva de machos dessa espécie (COUTINHO; CAMPOS, 2011).

Nas fêmeas, a capacidade vitelogênica pode se iniciar em indivíduos com cerca de cinco anos de idade (55 cm de comprimento rostro-cloacal), porém, a plena capacidade reprodutiva só se inicia quando as fêmeas dessa espécie atingem os 80 cm de comprimento rostro-cloacal,

portanto, cerca de nove a dez anos de idade, e massa corporal acima de 12 kg (CAMPOS, 1993; CAMPOS; MAGNUSSON, 1995; COUTINHO, 2000). Indivíduos de jacaré-do-pantanal têm como habitat pântanos, lagoas, lagos e rios da porção centro-sul da América do Sul. Seus indivíduos representantes dividem habitat com animais das espécies *Melanosuchus niger* e *Caiman latirostris* (COUTINHO *et al.*, 2013; FARIAS *et al.*, 2013; MARIONI *et al.*, 2013). Seu status populacional é incerto, de forma que em alguns países a espécie foi considerada extinta, mas em outros ela ocorre com densidade populacional desejável (GROOMBRIDGE, 1982). No Brasil, a distribuição da espécie possui extensão de ocorrência de 194.160,03 km², e estudos afirmam que em território brasileiro, essa espécie é símbolo de uma das mais acentuadas populações de crocodilianos de todo o mundo, atingindo densidade populacional de 100 indivíduos por km² (FARIAS *et al.*, 2013).

2.6 *Caiman latirostris*

Segundo Groombridge (1982), a espécie *Caiman latirostris* é conhecida popularmente como jacaré-do-papo-amarelo, pertence a ordem Crocodylia e a família Crocodylidae. Está inserida na família Alligatoridae é pertencente ao gênero *Caiman* (VERDADE; PIÑA, 2006). São animais que possuem majoritariamente hábitos aquáticos, mas também vivem parte da vida em ambientes terrestres. Estudos feitos acerca da composição óssea dessa espécie comprovam os hábitos semiaquáticos e a facilidade que *C. latirostris* possui em locomover-se tanto na água quanto em ambiente terrestre, podendo ser utilizado como modelo para posteriores estudos do grupo Crocodylia (MASCARENHAS JÚNIOR, 2019).

Indivíduos dessa espécie possuem três fases de vida, sendo filhotes, jovens e adultos. São considerados animais de médio porte quando comparados à outras espécies de crocodilianos, e ao chegarem a fase adulta atingem de 1,5 a 2 metros de comprimento total, sendo que machos bem desenvolvidos podem chegar aos três metros. Porém, poucos são os animais encontrados na natureza que possuem dois metros ou mais (VERDADE, 2001a; VERDADE; PIÑA, 2006). Fêmeas bem desenvolvidas podem chegar aos dois metros de comprimento total (BRAZAITIS, 1973). Os indivíduos dessa espécie são caracterizados como cautelosos, ou seja, em comparação aos outros crocodilianos, são animais que atacam menos do que os demais, sendo esse um fator importante para a sobrevivência contínua da espécie (GROOMBRIDGE, 1982).

A distribuição geográfica dessa espécie varia entre países da América do Sul, dentre eles o Uruguai, Argentina, Bolívia, Paraguai e o Brasil, sendo o território brasileiro o que possui

a maior densidade de indivíduos de jacaré-do-papo-amarelo, abrigando cerca de 70% de sua população (VERDADE; PIÑA, 2006).

C. latirostris tem preferência por ambientes de vegetação aquática densa, assim como pântanos, várzeas, mangues e pequenos riachos (GROOMBRIDGE, 1982). Porém, ao longo de toda evolução, adaptou-se a habitar ambientes passíveis de antropização, sendo eles rios, lagoas e açudes de fazendas de gado, levando a entender que o risco de extinção dessa espécie esteja intimamente ligado à ação antrópica e a pressão humana que sofrem seus habitats (MEDEM, 1983). Utilizando como referência os dados disponíveis até o ano de 2011 relativos aos critérios sobre o risco de extinção da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN 2001; 2003), essa espécie se encaixa no risco menos preocupante de extinção (LC) (COUTINHO *et al.*, 2013).

Além do nome jacaré-do-papo-amarelo, em língua inglesa o nome popular da espécie *C. latirostris* é “broad-snouted caiman”, e assim como o nome indica, comparado a outros crocodilianos essa espécie possui o focinho mais curto e mais largo (COUTINHO *et al.*, 2013). Segundo Brazaitis (1973), os indivíduos possuem coloração dorsal marrom-escuro quando filhotes e jovens, algumas manchas marrom-escuras ou pretas na cauda e na cabeça, e faixas da mesma coloração na superfície dorsal do tronco e na cauda.

Quando se tornam adultos, mantém a coloração marrom escuro ou verde-oliva escuro na superfície dorsal do tronco, assim como faixas da mesma cor no dorso da cauda. Conforme o indivíduo envelhece, essas faixas se tornam menos perceptíveis, pois a coloração corporal tende a escurecer, de modo que todo o corpo apresente cor marrom escuro. Em todos os estágios da vida, o ventre possui coloração creme uniforme ou amarelada, e a mandíbula possui grandes manchas escuras em suas laterais. A pele de *C. latirostris* possui escamas ventrais que não possuem glândulas foliculares, porém, existem placas ósseas denominadas osteodermos presentes em dupla em toda superfície dorsal (Figura 6) (BRAZAITIS, 1973; VERDADE; PIÑA, 2006).



Figura 6 – Morfologia externa de *Caiman latirostris*. Corpo dorsalmente com coloração verde-oliva, ventralmente amarelado, com faixas marrom escuras que irradiam da cabeça até a cauda (seta). Manchas marrom escuras ou pretas na mandíbula (circulado).

Fonte: Adaptado de Mascarenhas Júnior (2019).

Brazaitis (1973) descreve que, anatomicamente, além dos osteodermos, existem cristas ossificadas no dorso do corpo dos indivíduos dessa espécie. O mesmo autor cita também que uma das características mais pertinentes que permite diferenciar *C. latirostris* de outras espécies é a presença de elevações na pálpebra superior em forma de ponta ou tubérculo, semelhantes às que são encontradas na espécie *C. crocodilus*. Na cavidade oral, possui fórmula dentária de 18/18, sendo 18 dentes superiores e 18 inferiores e ligeiramente separados um do outro, fixados em cavidades ósseas distintas.

2.6.1 Hábitos alimentares

De acordo com Brazaitis (1973), a dieta de *C. latirostris* consiste em crustáceos e, às vezes, tartarugas aquáticas, e isso se deve pelo formato firme e compacto de sua mandíbula. Em análise feita por Freitas-Filho (2008) do conteúdo estomacal de amostras de *C. latirostris* de vida livre capturados em diversas localidades do Rio de Janeiro, como mangues, canais de esgoto, restinga, entre outros, foram encontrados insetos, moluscos, crustáceos, peixes e vertebrados terrestres. A dieta de animais de cativeiro geralmente é baseada em descartes de frango, peixes e, às vezes, suínos. Estudos afirmam que quando a dieta não é fornecida de forma equilibrada, ou seja, são oferecidas dietas pobres em nutrientes essenciais, ela pode interferir negativamente no crescimento dos animais, como por exemplo, dificultar a formação dos osteodermos em jacarés filhotes (SARKIS-GONÇALVES, 2000). Filhotes em cativeiro, em

sua grande maioria, têm preferência por se alimentarem de insetos quando possuem o poder de escolha entre estes e peixes (VERDADE, 1992).

Comportamentos em filhotes como a predação de gravetos e folhas mostra que o hábito de se alimentar é compreendido por meio de tentativas certas e erradas de conseguir alimento. Em cativeiro, tanto para filhotes quanto para adultos, é comum que o alimento oferecido seja processado, visto que muitas vezes são utilizados descartes de animais mortos. Porém, para animais que são criados a fim de serem reintroduzidos na natureza para repovoamento, é importante que seja oferecido alimento vivo, a fim de que esses indivíduos aprendam a realizar a caça e a captura do alimento quando estiverem em vida livre (VERDADE, 1992).

2.6.2 Biologia reprodutiva

Como todos os outros crocodilianos, essa espécie realiza a oviposição em ninhos com montículos combinados de folhas e galhos, pondo cerca de 18 a 50 ovos por ninhada sazonalmente, durante a estação chuvosa do ano (ROBERTO, 2019). Grande parte das informações adquiridas sobre a biologia reprodutiva desses animais se dá por meio de estudos em animais de cativeiro (VERDADE, 1998). Em estudo realizado por Campos *et al.* (1995) no rio Paraná, Brasil, foi descrito pela primeira vez a presença de ninhos de *C. latirostris* sobre tapetes de vegetação flutuante. E, estimou-se pela idade dos embriões, que a postura dos ovos foi realizada nos últimos dias do mês de dezembro e que a eclosão ocorreria nos primeiros dias de março, delineando o período reprodutivo da espécie. Segundo Verdade (1992), o período de postura dos ovos compreende os últimos dias de outubro até fevereiro, sendo que a maior concentração de fêmeas realiza a oviposição entre dezembro e fevereiro, e o pico é alcançado em janeiro. Esse comportamento de postura dos ovos durante o verão pode ser justificado devido a necessidade de temperaturas mais elevadas para a incubação dos ovos (VERDADE, 1992).

Foram encontradas relações significativamente positivas entre o tamanho das fêmeas nidificantes com o tamanho dos ovos e dos recém-nascidos. Ou seja, fêmeas que possuem maior comprimento total são mais propícias a gerarem descendentes maiores e mais pesados. Essa correlação não foi encontrada entre o tamanho da fêmea com o tamanho da ninhada ou com a quantidade de ovos (VERDADE, 2001a).

Geralmente o período de incubação dos ovos dura cerca de 77 dias, e o nascimento dos filhotes ocorre entre os meses de fevereiro e abril, e tem seu pico em março. Nesses meses a temperatura ambiente começa a diminuir, e devido a esse motivo, podem ocorrer quedas

bruscas de temperatura que causariam danos aos ovos, aos embriões, e posteriormente até mesmo aos recém-nascidos. A maioria das fêmeas apresentam o comportamento de proteção ao ninho, denominado de cuidado parental, e essa conduta se estende pelos próximos dois a três anos de vida do filhote (VERDADE, 1992).

2.6.3 Conservação da espécie

As principais causas que levam à diminuição da densidade populacional dessa espécie são a caça, que ocorre de forma ilegal, exploratória e predatória, e a destruição dos seus habitats (VERDADE, 1992). Tendo em vista a pressão que o grupo sofre por esses fatores, majoritariamente causados pelo homem, programas de conservação, controle e regulamentação da caça, e, principalmente, estudos aprofundados sobre a biologia e o manejo adequado, se tornam imprescindíveis para a manutenção da espécie na natureza (VERDADE, 1998). Em vários países, projetos de conservação foram implantados e a partir deles é possível obter controle rigoroso das populações de crocodilianos, e, principalmente, das espécies mais ameaçadas. Essas propostas visam a exploração de forma controlada de populações nativas, e a introdução de indivíduos de determinadas espécies em ambientes em que elas foram consideradas extintas para fins de repovoamento. De mesma forma, a criação de indivíduos em cativeiro é realizada para que a captura de animais de vida livre, visando a comercialização de seus produtos, seja reduzida (VERDADE, 1992).

É importante a criação de projetos que visem a conservação da espécie, assim como leis ambientais que atuem ativamente na preservação dos habitats naturais de *C. latirostris*, e não apenas visando a espécie em cativeiro. Atualmente, existem unidades de conservação que atuam nos locais endêmicos dessa espécie com objetivo de garantir a sobrevivência e proteção de *C. latirostris* (COUTINHO *et al.*, 2013).

3 EXPLORAÇÃO COMERCIAL, SISTEMAS DE MANEJO E PRODUÇÃO DE *Caiman latirostris*

Segundo Hutton e Webb (1992), crocodilianos em geral são animais que não podem ser comercializados sem que haja autorizações que regulamentem esses processos, assim como licenças que variam de acordo com o país em questão. As autorizações e licenças, devem ser adquiridas para que seja possível a realização de abates, venda, compra e comércio dos subprodutos fornecidos a partir da exploração desses animais (HUTTON; WEBB, 1992). A

organização internacional que é responsável por regulamentar toda a utilização desses subprodutos é a CITES (*International Consortium on Combating Wildlife Crime* - Convenção Sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora Selvagens em Perigo de Extinção). A CITES lista em seus apêndices todas as regras a serem seguidas sobre os sistemas de manejo e exploração de espécies ameaçadas de extinção (HUTTON; WEBB, 1992).

C. latirostris possui grande valor econômico, e neste cenário, o Brasil é um dos principais países interessados no comércio de produtos oriundos da espécie (BRAZAITIS, 1989). O consumo de carne de jacarés tem crescido nos últimos anos, principalmente nas grandes cidades do país, entre os estados do Sudeste, Centro-Oeste e Sul do Brasil. Mas apesar desse crescimento, ela ainda é um produto considerado exótico, pois demanda tempo de produção, visto que animais só são abatidos acima de 1 ano de idade, e a produção de quilos de carne por animal abatido é pequena. Além da carne, a indústria brasileira da moda possui grande atração pela pele de jacarés para a fabricação de bolsas e calçados, mas essa produção ainda é inviabilizada pelos mesmos motivos que dificultam a produção da carne (VERDADE, 2001b).

Esses subprodutos são obtidos a partir de três sistemas regulamentados de coleta e produção, que são: a caça moderada no ambiente natural da espécie, denominado *harvest*; a coleta de ovos desse mesmo habitat para posterior criação de filhotes em cativeiro, denominado *ranching*; e, por fim, a criação de indivíduos da espécie a partir de fêmeas matrizes e machos reprodutores adquiridos uma única vez no ambiente e levados à cativeiro para geração dentro de um ciclo fechado, denominado *farming* (HUTTON; WEBB, 1992).

O sistema mais utilizado é o *farming*, justificado por ser o método que menos impacta negativamente as populações naturais. Porém, alguns problemas são encontrados durante a captura dos progenitores. Sendo que, dificilmente, indivíduos de vida livre conseguem se adaptar em ambientes de cativeiro, e com isso, a taxa de mortalidade das matrizes e reprodutores é alta, e a capacidade de reprodução de ambos é baixa se comparado ao natural. Portanto, a técnica utilizada pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), que se tornou referência no Brasil, tem como objetivo a criação de matrizes e reprodutores em cativeiro e o fornecimento destes animais nascidos e adaptados para futuros criadouros (VERDADE, 2001b). No Brasil, existem sete criadouros regularizados pelo IBAMA que visam a comercialização dos subprodutos da espécie, e estão localizados no Nordeste, Sudeste e Sul do país, sendo que todos utilizam o sistema de manejo *farming* (COUTINHO *et al.*, 2013).

3.1. IMPLANTAÇÃO DE CRIADOUROS

Visando a proteção da espécie, a caça de *C. latirostris* é proibida pela Lei Nº. 5.197/67 de 3 de janeiro de 1967 de Proteção à Fauna (BRASIL, 1967). Enquanto a implementação de criadouros para criação em cativeiro a fim da comercialização de produtos advindos desses animais é regulamentada por duas Portarias, a de Nº. 117/97 (BRASIL, 1997a) e a de Nº. 118/97 (BRASIL, 1997b). Ambas têm como objetivo, a normatização da comercialização da pele e a criação de criadouros comerciais de crocodilianos no Brasil, respectivamente (SARKIS-GONÇALVES *et al.*, 2001).

Para que seja realizada a implantação de um criadouro regular com o objetivo de exploração comercial da espécie, alguns critérios básicos precisam ser seguidos, como: as instalações do criadouro precisam, necessariamente, estarem dentro da área de incidência da espécie do país em questão, por exemplo, no Brasil, a distribuição geográfica da espécie ocorre no Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul, portanto, criadouros podem ser estabelecidos nessa faixa territorial; e, que a aquisição de alimento para os animais do criadouro seja obtida de forma econômica, ou seja, à baixo custo, podendo inserir na alimentação os descartes de produção animal, como carcaças de frango e suíno, por exemplo (SARKIS-GONÇALVEZ *et al.*, 2001).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das informações apresentadas, dentre as seis espécies de crocodilianos endêmicas do Brasil, *Caiman latirostris* é a espécie que possui sua sobrevivência mais ameaçada pelos impactos antrópicos em seus habitats, atualmente sendo alvo de elevados níveis de poluição e desmatamento. Além dos impactos sobre sua população, a espécie é alvo de caça exploratória para comercialização da carne e do couro. Portanto, programas de conservação, ações que visem a educação da população acerca da espécie e a implantação de criadouros devidamente regulamentados, necessitam ser utilizados para que garantam a sobrevivência de *C. latirostris* em seus ambientes nativos.

5 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo auxílio financeiro e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

6 REFERÊNCIAS

- BALAGUERA-REINA, S. A.; VELASCO, A. **Spectacled caiman** *Caiman crocodilus*. Gland: IUCN, 2019. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/46584/3009688>>. Acesso em: 10 jun. 2021.
- BRASIL. Decreto-lei nº 5.197, de 3 de janeiro de 1967. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 5 jan. 1967. Seção 1, p. 177.
- BRASIL. Portaria nº 117, de 15 de outubro de 1997a. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 17 nov. 1997. Seção 1, p. 26.564.
- BRASIL. Portaria nº 118, de 16 de outubro de 1997b. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 17 nov. 1997. Seção 1, p. 23490-23491.
- BRAZAITIS, P. The forensic identification of crocodilian hides and products. In: IUCN PUBLICATION NEW SERIES. **Crocodiles: their ecology, management, and conservation**. Gland: IUCN, 1989. p. 17-43.
- BRAZAITIS, P. The identification of living crocodilians. **Zoologica**, v. 58, n. 1-4, p. 59-101, 1973.
- CAMPOS, Z. Effect of habitat on survival of eggs and sex ratio of hatchlings of *Caiman crocodilus yacare* in the pantanal, Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 27, n. 2, p. 127-132, 1993.
- CAMPOS, Z. *et al.* Avaliação do risco de extinção de jacaré-coroa *Paleosuchus trigonatus* (Schneider, 1801) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 48-53, 2013.
- CAMPOS, Z. *et al.* **Caiman yacare, Yacaré. The IUCN red list of threatened species 2020:** e.T46586A3009881. Gland: IUCN, 2020. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/46586/3009881>>. Acesso em: 12 jun. 2021.
- CAMPOS, Z. *et al.* Night-light counts, size structure, and sex ratio in wild populations of yacare caiman (*Caiman crocodilus yacare*) in the Brazilian Pantanal. **Vida Silvestre Neotropical**, v. 4, p. 46-50, 1995.
- CAMPOS, Z. *et al.* Yacare caiman *Caiman yacare*: In: MANOLIS, S. C.; STEVENSON, C. **Crocodiles. Status survey and conservation action plan**. 3. ed. Gland: IUCN, 2010. p. 23-28.

CAMPOS, Z.; MAGNUSSON, W. E.; MUNIZ, F. *Paleosuchus trigonatus*, smooth-fronted Caiman. **The IUCN red list of threatened species 2019**: e.T46588A3010035. Gland: IUCN, 2019. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/46588/3010035>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

CAMPOS, Z.; MAGNUSSON, W. E. Relationship between rainfall, nesting habitat and fecundity of *Caiman crocodilus yacare* in the Pantanal, Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 11, p. 351-358, 1995.

CAMPOS, Z.; SANAIOTTI, T. *Paleosuchus palpebrosus* (Dwarf caiman). Nesting. **Herpetological Review**, v. 37, n. 1, p. 81, 2006.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis do Brasil e suas unidades federativas: lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 11-57, 2018.

COUTINHO, M. E.; CAMPOS, Z. Ecology and management of *Caiman yacare* (Daudin, 1802) of the Brazilian Pantanal. In: JUNK, W. *et al.* **The Pantanal: ecology, biodiversity and sustainable management of a large Neotropical seasonal wetland**. Sofia: Pensoft Publishers, 2011. p. 649-671.

COUTINHO, M. E. *et al.* Avaliação do risco de extinção do jacaré-do-papo-amarelo *Caiman latirostris* (Daudin, 1802) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 13-20, 2013.

COUTINHO, M. E. **Population ecology and the conservation and management of *Caiman yacare* in the Pantanal Brazil**. 2000. 272f. Tese (Doutorado em Zoologia) – School of Biological Sciences, The University of Queensland, Brisbane, 2000.

ELEUTÉRIO, B. **Jacarés do Brasil #1 – *Melanosuchus niger***. Vitória: Instituto Marcos Daniel, 2020. Disponível em: <<https://www.imd.org.br/single-post/os-jacares-do-brasil-1-melanosuchus-niger>>. Acesso em: 22 jun. 2021.

ELEUTÉRIO, B. **Jacarés do Brasil #2 – *Paleosuchus palpebrosus***. Vitória: Instituto Marcos Daniel, 2021a. Disponível em: <<https://www.imd.org.br/single-post/jacares-dos-brasil-2-paleosuchus-palpebrosus>>. Acesso em: 22 jun. 2021.

ELEUTÉRIO, B. **Jacarés do Brasil #3 – *Caiman crocodilus***. Vitória: Instituto Marcos Daniel, 2021b. Disponível em: <<https://www.imd.org.br/single-post/jacares-dos-brasil-3-caiman-crocodilus>>. Acesso em: 22 jun. 2021.

ESPINOSA, E. *Caiman crocodilus*. In: ROSS, J. P. **Crocodiles. Status survey and conservation action plan**. 2. ed. Gland: IUCN, 1998. p. 14-17.

FARIAS, I. P. *et al.* Avaliação do risco de extinção do jacaré-do-pantanal *Caiman yacare* (Daudin, 1802) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 21-30, 2013.

FIGUEIREDO, R. G. A história dos jacarés e seus ancestrais. In: MERÇON, L; SANTOS, M. R.; NÓBREGA, Y. **Marginais: jacarés da Mata Atlântica**. Vitória: Instituto Marcos Daniel, 2019. p. 30-35.

FREITAS-FILHO, R. **Dieta e avaliação de contaminação mercurial em *Caiman latirostris* em dois parques municipais do Rio de Janeiro, Brasil.** 2008. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

GREEN, R. E. *et al.* Three crocodylian genomes reveal ancestral patterns of evolution among archosaurs. **Science**, v. 146, n. 6216, p.1335-1345, 2014.

GRIGG, G.; KIRSHNER, D. **Biology and evolution of crocodylians.** Nova York: Comstock Publishing, 2015. 672p.

GROOMBRIDGE, B. **The IUCN amphibia-reptilia red data book. Part 1: Testudines, Crocodylia, Rhynchocephalian.** Gland: IUCN, 1982. 236p.

HOLLIDAY, C. M.; GARDNER, N. M. A new *Eusuchian crocodyliform* with novel cranial integument and its significance for the origin and evolution of Crocodylia. **PloS One**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2012.

HUTTON, J. M.; WEBB, G. An introduction to the farming of crocodylians. In: LUXMOORE, R. A. **Directory of crocodylian farming operations.** 2. ed. Gland e Cambridge: IUCN, 1992. p. 1-39.

IUCN (INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE). **Guidelines for application of IUCN Red List criteria at regional levels: version 3.0.** Gland e Cambridge: IUCN, 2003.

IUCN (INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE). **IUCN red list categories and criteria: version 3.1.** Gland e Cambridge: IUCN, 2001.

MAGNUSSON, W. E.; LIMA, A. P. The ecology of a cryptic predator *Paleosuchus trigonatus* in a tropical rainforest. **Journal of Herpetology**, v. 25, n. 1, p. 41-48, 1991.

MAGNUSSON, W. E. *Paleosuchus palpebrosus*. Austin: Catalogue of American Amphibians and Reptiles (CAAR), 1992a. Disponível em: <<https://repositories.lib.utexas.edu/handle/2152/45426>>. Acesso em: 12 jun. 2021.

MAGNUSSON, W. E. *Paleosuchus trigonatus*. Austin: Catalogue of American Amphibians and Reptiles (CAAR), 1992b. Disponível em: <<https://repositories.lib.utexas.edu/handle/2152/45427>>. Acesso em: 12 jun. 2021

MARIONI, B. M. *et al.* Avaliação do risco de extinção do jacaré-açu *Melanosuchus niger* (Spix, 1825) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 31-39, 2013.

MASCARENHAS JÚNIOR, P. B. **Inferências morfofisiológicas de *Caiman latirostris* (Archosauria: Crocodylia) baseadas na histologia óssea.** 2019. 93f. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2019.

MEDEM, F. **Los crocodylia de Sur America.** Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 1981. v. I, 354p.

- MEDEM, F. **Los crocodylia de Sur America**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 1983. v. II, 270p.
- NACHTIGALL, V. **Os jacarés do Pantanal e as queimadas**. Vitória: Instituto Marcos Daniel, 2020. Disponível em: <<https://www.imd.org.br/single-post/os-jacares-do-pantanal>>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- OLIVEIRA, T. M.; PINHEIRO, F. L.; KERBER, L. Sobreviventes: diversificação de Archosauromorpha após a extinção Permo-Triássica. **Terræ Didactica**, v. 16, p. 1-23, 2020.
- POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. Os Diapsida da era Mesozoica: Dinosauria, Crocodylia e Aves. In: _____. **A vida dos vertebrados**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. p. 388-432.
- RIFF, D. *et al.* Crocodilomorfos: a maior diversidade de répteis fósseis do Brasil. **Terræ**, v. 9, p. 12-40, 2012.
- ROBERTO, I. J. *et al.* Unexpected but unsurprising lineage diversity within the most widespread Neotropical crocodylian genus *Caiman* (Crocodylia, Alligatoridae). **Systematics and Biodiversity**, v. 18, n. 4, p. 377-395, 2020.
- ROBERTO, I. J. Reprodução do jacaré-de-papo-amarelo. In: MERÇON, L.; SANTOS, M. R.; NÓBREGA, Y. **Marginais: jacarés da Mata Atlântica**. Vitória: Instituto Marcos Daniel, 2019. p. 75-77.
- SARKIS-GONÇALVES, F. *et al.* Manejo de jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em cativeiro. In: MATTOS, W. R. S. **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001. p. 565-579.
- SARKIS-GONÇALVES, F. **Uso de descartes de origem animal na alimentação do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em cativeiro**. 2000. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.
- THORBJARNARSON, J. B. Black caiman *Melanosuchus niger*. In: MANOLIS, S. C.; STEVENSON, C. **Crocodiles. Status survey and conservation action plan**. 3. ed. Gland: IUCN, 2010. p. 29-39.
- THORBJARNARSON, J. B. Reproductive ecology of the spectacled caiman (*Caiman crocodilus*) in the Venezuelan llanos. **Copeia**, v. 105, n. 4, p. 907-919, 1994.
- VASCONCELOS, W. R. **Diversidade genética e estrutura populacional dos crocodilianos jacaré-açú (*Melanosuchus niger*) e jacaré-tinga (*Caiman crocodilus*) da Amazônia**. 2005. 97f. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2005.
- VELASCO, A.; AYARZAGÜENA, J. Spectacled *Caiman crocodilus*. In: MANOLIS, S. C.; STEVENSON, C. **Crocodiles. Status survey and conservation action plan**. 3. ed. Gland: IUCN, 2010. p. 10-17.

VERDADE, L. M. Allometry of reproduction in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, p. 431-435, 2001a.

VERDADE, L. M. Biologia reprodutiva do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em São Paulo, Brasil. In: LARRIERA, A.; VERDADE, L. M. **La conservación y manejo de los Crocodylia de America Latina**. Santo Tomé: Fundación Banco Bica, 1995. v. 1, p. 57-79.

VERDADE, L. M. *Caiman latirostris*. In: ROSS, J. P. **Crocodiles. Status survey and conservation action plan**. 2. ed. Gland: IUCN, 1998. p. 18-20.

VERDADE, L. M. **Manejo reprodutivo do jacaré-do-papo-amarelo, *Caiman latirostris* (Daudin, 1802), em cativeiro**. 1992. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

VERDADE, L. M. O programa experimental de criação em cativeiro do jacaré-do-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) da ESALQ / USP: histórico e perspectivas. In: MATTOS, W. R. S. **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001b. p. 559-564.

VERDADE, L. M.; PIÑA, C. I. ***Caiman latirostris* (Daudin) broad-snouted caiman**. Austin: catalogue of American amphibians and reptiles (CAAR), 2006. Disponível em: <<https://repositories.lib.utexas.edu/handle/2152/44772>>. Acesso em: 12 jun. 2021.

Capítulo 4

Obesidade sarcopênica em gatos: revisão de literatura



Caio Vaz Baqui Lima¹
Driéle Lutzke²
Yumi Sheu³
Karina Preising Aptekmann⁴

¹ Médico Veterinário autônomo, e-mail: caiobaqui@hotmail.com

² Hospital Veterinário da Universidade de Vila Velha, e-mail: drielelutzke@gmail.com

³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: yuyusheu@gmail.com

⁴ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: kapreising@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Segundo a OMS, obesidade é definida como o acúmulo excessivo e anormal de tecido adiposo de forma a conferir riscos à saúde do indivíduo (WHO, [2019]). Enquanto o termo sarcopenia foi cunhado no final da década de 80 para definir a perda de massa muscular em decorrência, principalmente, do avanço da idade (EVANS; CAMPBELL, 1993; ROSEMBERG, 1989). A obesidade sarcopênica é uma subcategoria da obesidade, caracterizada pela ocorrência de ambos os processos descritos anteriormente. Sendo assim, é observado um excesso de tecido adiposo com concomitante perda de massa magra corporal (ZAMBONI *et al.*, 2008).

Objetivou-se com esta revisão abordar de forma isolada a obesidade e a sarcopenia em gatos, finalizando com dados referentes à obesidade sarcopênica, a fim de atentar os profissionais da área para o impacto negativo da doença na qualidade de vida dos indivíduos portadores e para a importância do desenvolvimento de futuras pesquisas na espécie felina.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 OBESIDADE

2.1.1 Definição

Diversas definições para obesidade têm sido descritas na literatura mundial. De maneira geral, a doença é definida como o acúmulo excessivo de tecido adiposo em decorrência da ingestão calórica superior ao consumo energético do organismo, levando a potenciais riscos à saúde do indivíduo (GERMAN, 2006; LAFLAMME, 2006; WHO, [2019]).

Cães e gatos com acúmulo de tecido adiposo acima de 15-20% do peso corporal ideal são classificados na categoria de sobrepeso, enquanto animais acima de 20% do peso corporal ideal passam a ser classificados como obesos. É observado um evidente aumento no risco da ocorrência de doenças em gatos com peso corporal 30% acima do ideal. Essas doenças estão descritas no item 2.1.5 (HAND; THATCHER; REMILLARD, 2000; LITTLE, 2012).

2.1.2 Prevalência

Ao longo dos anos, diversos estudos vêm estimando a prevalência da obesidade em felinos. Um trabalho de revisão identificou que os valores variam principalmente de acordo com a região do estudo, idade e critérios usados pelos profissionais para a classificação do ECC dos animais (TARKOSOVA *et al.*, 2016).

No Brasil, há carência de pesquisas que avaliem a prevalência de sobrepeso e de obesidade na população felina separadamente. Na maioria dos estudos, essas as taxas são estimadas em conjunto. No país e no mundo, essa taxa pode variar de 19 – 52% (LAFLAMME, 2006; LUND *et al.*, 2005; MENDES-JÚNIOR *et al.*, 2013). Em um estudo epidemiológico, os autores descreveram a prevalência de obesidade em gatos em vários países. Na Grã-Bretanha o índice de prevalência variou de 1,8 a 10,2%, entre os anos de 2000 e 2012; os Estados Unidos apresentou um valor de 6,4% em 2005; a Nova Zelândia 2,7% em 2000; a Austrália 6,6% em 2008; a França 7,8% em 2009; e os Países Baixos 4,5% em 2014 (TARKOSOVA *et al.*, 2016).

Um estudo no sul do estado do Espírito Santo avaliando uma população de 50 gatos, identificou uma taxa de prevalência de 6% de obesidade na espécie (MENDES-JÚNIOR *et al.*, 2013). Enquanto um levantamento mais recente envolvendo 37 gatos no estado de Mato Grosso encontrou taxa de prevalência de 40,5% para obesidade na população de gatos estudados, constatando grande variância entre as diferentes localidades do país e amostras estudadas (FREITAS *et al.*, 2018).

2.1.3 Causas e fisiopatogenia

Como citado anteriormente, o sobrepeso e obesidade são causados por desequilíbrio entre a ingestão calórica e o consumo energético do organismo, o que acontece principalmente com o avanço da idade. Na situação onde há uma ingestão calórica maior do que o consumo energético, ocorre o depósito de tecido adiposo. Sendo assim, fatores que influenciam na demanda energética diária do organismo, podem atuar diretamente no ganho ou perda de peso do indivíduo (LAFLAMME, 2006).

As causas de obesidade podem ser divididas em primárias e secundárias de acordo com a origem. Dentre as causas primárias encontram-se o excesso de ingestão calórica, o gasto energético reduzido e a predisposição genética. O excesso de ingestão calórica se dá em decorrência do consumo de alimentos densos em energia, práticas inadequadas de alimentação

e alimentação *ad libitum*. Enquanto o gasto energético reduzido, em geral, está relacionado ao baixo grau de atividade física dos gatos obesos (LITTLE, 2012; NELSON; COUTO, 2015).

Os fatores genéticos apresentam grande destaque no aumento da predisposição à obesidade em gatos como a idade, sexo, raça e castração (LITTLE, 2012). Em relação à idade, sabe-se que a doença ocorre com maior frequência em gatos de meia idade, variando de 2 a 9 anos. No quesito sexo, maior ocorrência é observada em machos, quando comparado com fêmeas (COLLIARD *et al.*, 2009; LITTLE, 2012).

As raças predispostas são controversas e ainda não estão bem estabelecidas, no entanto uma predisposição evidente foi observada em gatos da raça Manx e mestiços (LITTLE, 2012; LUND *et al.*, 2005). No fator status reprodutivo, é descrita maior ocorrência da obesidade em indivíduos castrados de ambos os sexos. Acredita-se que a castração possa contribuir para o ganho de peso por meio do aumento na ingestão de alimentos e/ou pela redução da atividade física sem redução da ingestão calórica. A taxa metabólica em gatos aparentemente não apresenta redução após a castração como ocorre em outras espécies (HARPER *et al.*, 2001; KANCHUK *et al.*, 2003). Dentre as causas secundárias de obesidade que podem ocorrer em gatos estão o hipotireoidismo, hiperadrenocorticismo, hiperinsulinismo, acromegalia, hipopituitarismo, disfunção hipotalâmica e drogas (glicocorticóides, progestágenos, fenobarbital e primidona) (NELSON; COUTO, 2015).

Fatores ambientais também apresentam grande contribuição no aumento da ocorrência da doença como a subestimação do grau de sobrepeso do gato por parte do tutor e o acesso limitado a áreas externas para a prática de exercícios, o que é observado principalmente em gatos de apartamento (COLLIARD *et al.*, 2009; LITTLE, 2012). Para os felinos, fatores comportamentais também apresentam um importante papel no desenvolvimento da obesidade. Dentre esses fatores, pode-se citar a dificuldade em manter uma rotina alimentar normal, ansiedade, problemas no controle da saciedade e depressão (GERMAN, 2006).

2.1.4 Consequências

O tecido adiposo, assim como outros órgãos, possui função endócrina com produção constante de mediadores químicos. Em indivíduos obesos ocorre a liberação crônica e excessiva dessas substâncias, conhecidas como adipocinas. As adipocinas, por vezes, atuam como citocinas pró-inflamatórias e mantêm o organismo em condição crônica e deletéria de inflamação (LITTLE, 2012).

Sendo assim, o sobrepeso e obesidade em felinos podem afetar diferentes sistemas do organismo e acarretar em diversos problemas de saúde. Os graus de riscos variam dependendo do problema de saúde desenvolvido (TENG *et al.*, 2018). No Quadro 1 estão listadas as complicações da obesidade mais frequentes de acordo com o sistema acometido em gatos.

Quadro 1 - Potenciais efeitos deletérios da obesidade em gatos

Sistema	Alterações Frequentes Observadas
Endócrino	Diabetes melitos (TENG <i>et al.</i> , 2018)
Gastrointestinal	Diarreia (TENG <i>et al.</i> , 2018) Constipação (NELSON; COUTO, 2015; TENG <i>et al.</i> , 2018) Lipidose hepática (NELSON; COUTO, 2015) Aumento da ocorrência de pancreatite (NELSON; COUTO, 2015; TENG <i>et al.</i> , 2018)
Imunológico	Alergopatias (TENG <i>et al.</i> , 2018)
Musculo esquelético	Artrite (TENG <i>et al.</i> , 2018) Doença do disco intervertebral (TENG <i>et al.</i> , 2018)
Respiratório	Asma (três vezes mais predisposição) (NELSON; COUTO, 2015; TENG <i>et al.</i> , 2018) Redução da complacência pulmonar (NELSON; COUTO, 2015; TENG <i>et al.</i> , 2018) Síndrome de Pickwickian (NELSON; COUTO, 2015)
Tegumentar	Dermatite atópica (NELSON; COUTO, 2015; TENG <i>et al.</i> , 2018) Seborréia (NELSON; COUTO, 2015) Pioderma (NELSON; COUTO, 2015)
Urinário	Doenças do trato urinário superior (NELSON; COUTO, 2015; TENG <i>et al.</i> , 2018) Doença do trato urinário inferior felino (NELSON; COUTO, 2015; TENG <i>et al.</i> , 2018) Incontinência urinária (comum em cadelas castradas) (NELSON; COUTO, 2015)
Reprodutor	Partos distócicos (NELSON; COUTO, 2015)
Outros	Intolerância ao exercício, hiperlipemia, e aumento no risco durante procedimentos anestésicos e cirúrgicos (NELSON; COUTO, 2015)

Fonte: Adaptada de Nelson e Couto (2015) e Teng *et al.*, (2018).

2.1.5 Diagnóstico

Uma série de exames complementares estão disponíveis para a estimativa da quantidade de gordura corporal em gatos (Quadro 2). Entretanto, algumas delas não são de fácil acesso à rotina clínica devido ao grau de complexidade na realização, estrutura e/ou apresentam alto custo (NELSON; COUTO, 2015).

Dentre as mais acessíveis para a aplicação clínica estão a mensuração do peso corporal, avaliação do escore de condição corporal (ECC), medidas morfométricas (MM), ultrassonografia (US), absorciometria com raio x de dupla energia (DEXA), tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) (NELSON; COUTO, 2015; SANTAROSSA; PARR; VERBRUGGHE, 2017).

Quadro 2 - Técnicas de mensuração da gordura corporal em gatos.

- Peso corporal
- Escore de Condição Corporal
- Medidas morfométricas
- Ultrassonografia
- Dupla absorção de energia de raios X (DEXA)
- Tomografia computadorizada
- Ressonância magnética

Fonte: Adaptada de Nelson e Couto (2015).

A avaliação do peso corporal é considerada o método mais simples e de fácil acesso e fornece informações aproximadas sobre a reserva total de energia corporal. No entanto, essa ferramenta não permite a mensuração da proporção de massa magra e de tecido adiposo, o que a torna pouco específica para o diagnóstico da obesidade (SANTAROSSA; PARR; VERBRUGGHE, 2017).

Assim como a pesagem, a técnica de determinação do ECC via sistema de pontuação, também é uma avaliação rápida e de fácil realização na rotina. Porém, apresenta como desvantagem a margem para subjetividade no momento da avaliação. Dentre elas, as escalas mais amplamente aceitas e utilizadas é a de 5 pontos, pela facilidade de aplicação na rotina clínica e a de 9 pontos, pela maior precisão e criteriosidade (Quadro 3) (GERMAN *et al.*, 2006; LAFLAMME, 1997; NELSON; COUTO, 2015).

As mensurações morfométricas em gatos foram estabelecidas e estão disponíveis para a avaliação do percentual de gordura corporal. Esse método consiste na determinação da circunferência torácica na direção da extremidade cranial da nona costela, associada ao índice da medida do membro pélvico que corresponde à distância da tuberosidade calcânea até a patela (Figura 1). Esse índice é conhecido como índice felino de massa corporal (IFMC) e seu resultado pode ser interpretado por meio da tabela de referência (Quadro 4) (NELSON; COUTO, 2015).

A ultrassonografia é um método não invasivo que permite a mensuração da espessura da camada adiposa subcutânea de forma eficaz, além disso é uma técnica que não emite radiação

e é considerada relativamente simples de ser realizada (SANTAROSSA; PARR; VERBRUGGHE, 2017). Apesar da US ainda não ter sido padronizada para o diagnóstico preciso da obesidade, uma correlação significativa entre a espessura da camada de tecido adiposo ventral e o peso corporal, ECC, índice de massa corporal, percentual de gordura corporal e circunferência do tórax foi identificada em gatos (IWAZAKI *et al.*, 2018).

Quadro 3 - Sistema de escore de condição corporal (ECC) de 5 e 9 pontos para gatos.

Escore de condição corporal		Descrição
5 pontos	9 pontos	
Caquético (ECC 1/5)	ECC 1	Costelas visíveis nos gatos de pelo curto. Nenhuma gordura palpável. Acentuada reentrância abdominal. Vértex lombares e asa do íleo palpáveis (LAFLAMME, 1997; NELSON; COUTO, 2015).
	ECC 2	Costelas facilmente visíveis em gatos de pelo curto. Vértex lombares são observadas com mínima massa muscular; reentrância abdominal. Não há presença de gordura palpável (LAFLAMME, 1997).
Magro (ECC 2/5)	ECC 3	Costelas facilmente palpáveis apresentam uma cobertura mínima de gordura. As vértebras lombares são visíveis. Cintura evidente depois das costelas. Mínimo de gordura abdominal (LAFLAMME, 1997).
	ECC 4	Costelas palpáveis com mínima cobertura de gordura. Cintura perceptível atrás das costelas. Mínimo de gordura abdominal. (LAFLAMME, 1997).
Ideal (ECC 3/5)	ECC 5	Bem proporcionado. Cintura visível depois das costelas. Costelas palpáveis com pequena cobertura de gordura. Panículo adiposo abdominal mínimo (LAFLAMME, 1997; NELSON; COUTO, 2015).
Sobrepeso (ECC 4/5)	ECC 6	Costelas palpáveis com mínima cobertura de gordura. Cintura e gordura abdominais visíveis, mas não evidentes (LAFLAMME, 1997).
	ECC 7	Dificuldade em palpar as costelas que têm moderada cobertura de gordura. A cintura não é muito evidente. Arredondamento evidente do abdômen. Moderado panículo adiposo abdominal (LAFLAMME, 1997).
Obeso (ECC 5/5)	ECC 8	Costelas não palpáveis, com excesso de cobertura de gordura (NELSON; COUTO, 2015). Cintura ausente. Arredondamento abdominal e presença de gordura visível. Presença de depósito de gordura lombar (LAFLAMME, 1997).
	ECC 9	Impossível palpar costelas que se encontram sob espessa cobertura de gordura. Pesados depósitos de gordura na área lombar, face e membros. Distensão abdominal e ausência de cintura. Amplos depósitos abdominais de gordura (LAFLAMME, 1997).

Fonte: Adaptada de Laflamme (1997), Nelson e Couto (2015).



Figura 1 – Avaliação do percentual de gordura corporal por meio de medidas morfométricas em gatos. (A) Representação da medida morfométrica do membro pélvico e (B) medida morfométrica da circunferência torácica. Ambas realizadas com o auxílio de fita métrica e mensuradas em centímetros.

Fonte: Extraído de Nelson e Couto (2015).

Quadro 4 – Referência do índice felino de massa corporal (FBMI).

Circunferência da caixa torácica (cm)	60																
	58																
	56																
	54																
	52																
	50																
	48																
	46																
	44																
	42																
	40																
	38																
	36																
	34																
	32																
	30																
	28																
26																	
24																	
22																	
20																	
		10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
		Medida do índice do membro pélvico (cm)															

Fonte: Adaptada de Nelson e Couto (2015).

A *Dual-energy X-ray Absorptiometry*, conhecida como DEXA, é uma técnica também utilizada para a mensuração da composição corporal em gatos, porém não é comumente encontrada para utilização na rotina (BORGES *et al.*, 2008). A tomografia computadorizada e a ressonância magnética também são duas técnicas que podem ser empregadas para a avaliação

da composição corporal, no entanto, devido ao elevado custo, necessidade de anestesia geral do paciente e exposição do paciente às radiações elevadas, no caso da tomografia computadorizada, não são rotineiramente utilizadas para esta finalidade na medicina veterinária (PRADO; HEYMSFILD, 2014).

2.2 SARCOPENIA

2.2.1 Definição

O termo sarcopenia foi cunhado no final da década de 80 na medicina para definir o processo de redução da massa muscular observada em decorrência do avanço da idade (ROSEMBERG, 1989). Este termo vem sendo utilizado até os dias atuais, tanto na medicina, quanto na medicina veterinária (CHOI, 2016; PAGANO *et al.*, 2015).

Vale ressaltar que sarcopenia é diferente de caquexia, embora se assemelhem em alguns aspectos. A caquexia é também um processo no qual ocorre perda de massa muscular de forma progressiva, porém, diferente da sarcopenia, esta se dá em decorrência de doenças crônicas como câncer, insuficiência cardíaca, doença renal crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica e artrite reumatoide. Ao passo que a sarcopenia é um processo que ocorre em decorrência do avanço da idade, como supracitado, sem relação com doenças crônicas primárias (ROSEMBERG, 1989).

2.2.2 Prevalência

Apesar dos estudos serem mais escassos na medicina veterinária, principalmente na espécie felina, a ocorrência da doença foi descrita em cães e gatos (HUTCHINSON *et al.*, 2012; MUNDAY; EARLE; ANDERSON, 1994; PAGANO *et al.*, 2015). Até o momento não foram encontradas na literatura pesquisas que estimassem a prevalência em ambas as espécies.

Raças como Labrador Retriever, a sarcopenia foi evidenciada por meio de avaliação ultrassonográfica e tomográfica (HUTCHINSON *et al.*, 2012). A histopatologia também foi utilizada para o diagnóstico em cães, se mostrando uma importante ferramenta no estudo da doença (PAGANO *et al.*, 2015).

2.2.3 Causas e fisiopatogenia

Foi comprovado que as causas da sarcopenia são multifatoriais, tanto em humanos quanto em cães (CHOI, 2013; PAGANO *et al.*, 2015). Na medicina, dentre os principais fatores associados à fisiopatogenia da perda crônica de fibras musculares estão as disfunções na síntese proteica, o aumento da lise de proteínas musculares, os defeitos na integridade da inervação muscular e o aumento da quantidade de conteúdo gorduroso na musculatura (CRUZ-JENTOFT *et al.*, 2010). Além dessas alterações, foram identificadas sucessivas mutações de deleção que ocorrem no DNA mitocondrial com avanço da idade que também contribuem para a perda de massa muscular do indivíduo. Essas mutações levam a alterações morfológicas nas fibras musculares com consequente atrofia e ruptura das mesmas (HERBST *et al.*, 2007).

Em humanos, diversas causas estão associadas à perda de massa muscular de forma crônica como baixo grau de atividade física, redução nas concentrações das frações de testosterona, redução nas concentrações de vitamina D (SZULC *et al.*, 2004), baixos níveis de GH (hormônio do crescimento) (RUDMAN, 1985), redução na síntese de miosina de cadeia pesada (BALAGOPAL *et al.*, 1997) e elevadas concentrações de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), proteína C reativa (PCR) e interleucina 6 (IL-6) (SCHAAP *et al.*, 2009).

Na medicina veterinária, avaliações histopatológicas de cães idosos com sarcopenia constataram a presença de fibras musculares necróticas e atroficas, rupturas e pré-rupturas de fibras vermelhas, vacúolos em formato de aro, fibras citocromo oxidase negativas e acúmulo de lipofuscinas. A classificação do grau de acometimento dessas fibras varia de acordo com a proporção dos achados histopatológicos citados. Sendo assim, o acometimento de 1 a 25% das fibras é considerado discreto, enquanto 26 a 50% e >50% passam a ser classificados como moderado e severo, respectivamente (PAGANO *et al.*, 2015).

Em gatos, perda de cerca 25 a 30% de massa magra foi constatada em indivíduos senis. As causas da sarcopenia na espécie vão além do avanço da idade. Sabe-se atualmente que a baixa ingestão proteica é um fator importante para a perda de massa muscular na espécie, pois reflete de forma negativa tanto na liconeogênese, quanto na conversão proteica no organismo. Sendo assim, a ingestão insuficiente de proteínas estimula o catabolismo proteico, que é refletido de forma mais evidente na musculatura esquelética. Além disso, ao contrário do que se pensava, o gato idoso tem o seu requerimento energético aumentado, devido à redução na capacidade digestiva (digestão e absorção). Esse aumento na demanda é observado principalmente após os 13 anos de idade (LITTLE, 2016).

2.2.4 Consequências

Na medicina, uma das principais preocupações com idosos sarcopênicos é o risco de quedas em decorrência da redução da massa e força muscular, além da evidente redução da velocidade no caminhar (SCOTT *et al.*, 2016). Esses fatores contribuem para a redução da qualidade de vida, o aumento da necessidade de hospitalização e institucionalização (asilos e casas de repouso) e para o aumento na taxa de mortalidade (CRUZ-JENTOFT *et al.*, 2010).

Em felinos, ainda não foram realizados estudos que correlacionassem a ocorrência de quedas ou fraturas com a doença como em humanos. No entanto, foi identificado uma relação direta entre a perda de massa magra e o aumento no risco de morte desses indivíduos. Uma pesquisa, chegou a identificar que a cada 100 gramas de massa magra perdida de um gato idoso, os riscos de morte chegam a aumentar cerca de 20% (LITTLE, 2016).

2.2.5 Diagnóstico

Na medicina, os principais métodos de diagnóstico da sarcopenia é o DEXA, a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e a ultrassonografia (PRADO; HEYMSFIELD, 2014). Na medicina veterinária, o diagnóstico de sarcopenia ainda não é rotineiro, no entanto, em nível de pesquisa o DEXA, a tomografia computadorizada e ultrassonografia foram empregados para o diagnóstico da doença em cães (FREEMAN *et al.*, 2019; HUTCHINSON *et al.*, 2012; KEALY *et al.*, 2002). A histopatologia também foi utilizada nessa espécie, se mostrando uma importante ferramenta no estudo da doença (PAGANO *et al.*, 2015). Em gatos, alterações na proporção da massa muscular também foram observadas por meio do DEXA (BORGES *et al.*, 2008; MUNDAY; EARLE; ANDERSON, 1994). Mais recentemente, a ultrassonografia vem sendo estudada com o intuito de se tornar mais uma ferramenta promissora para o diagnóstico da doença na espécie felina (FREEMAN *et al.*, 2019).

Outra técnica para identificação da sarcopenia utilizada em cães e gatos, é o escore de condição muscular (ECM). Este método, assim como o do ECC, consiste em um sistema de escala de pontos que estimam de forma qualitativa os graus da perda de massa muscular, usando como recurso a avaliação visual e a palpação de regiões específicas (Figura 2) (BALDWIN *et al.*, 2010).

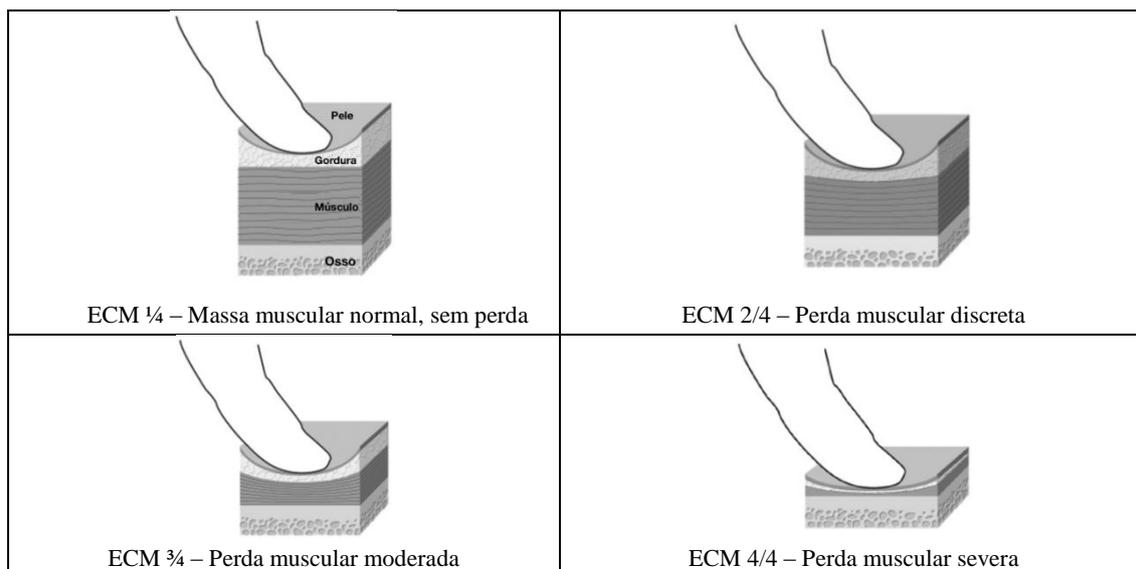


Figura 2 – Sistema de escore de condição muscular (ECM).

Fonte: Adaptada de Baldwin *et al.* (2010), cedida com cortesia por Dr. Tony Buffington.

Os locais anatômicos preconizados para aplicação da técnica é a região do osso temporal, escápula, costelas, vértebras lombares e ossos pélvicos. No entanto, o emprego desse método não é observado com frequência em estudos de sarcopenia, possivelmente devido ao elevado grau de subjetividade da técnica (BALDWIN *et al.*, 2010; FREEMAN *et al.*, 2019).

2.3 OBESIDADE SARCOPÊNICA

2.3.1 Definição

Até o momento, não existe um consenso que defina de forma exata o termo obesidade sarcopênica (OS). Em geral, essa expressão é utilizada para caracterizar pacientes que cursam obesidade e sarcopenia de forma concomitante (SCOTT *et al.*, 2016). Sendo assim, pode-se interpretar que gatos que apresentam peso corporal 20% acima do ideal, associado à uma redução da massa muscular em decorrência do avanço da idade, podem ser classificados como pacientes com obesidade sarcopênica (HAND; THATCHER; REMILLARD, 2000; ROSEMBERG, 1989). A percepção, principalmente das formas iniciais da doença é considerada desafiadora, uma vez que o ganho de tecido adiposo com concomitante perda de massa magra, por vezes, impossibilita alterações significativas no peso corporal do indivíduo durante as pesagens de rotina (LITTLE, 2016).

2.3.2 Prevalência

Em gatos, a ocorrência de obesidade sarcopênica ainda não foi descrita. Porém, um estudo de 1994 constatou que com o avanço da idade, a população de gatos estudados apresentou uma evidente redução na proporção de massa magra com consequente aumento na proporção de tecido adiposo por meio do DEXA (MUNDAY; EARLE; ANDERSON, 1994). Na medicina veterinária, estudos que determinem a prevalência da OS em cães e gatos ainda não foram realizados.

Na medicina, um estudo em 2013 avaliou os resultados de sete pesquisas que fizeram o levantamento da prevalência de obesidade sarcopênica em pessoas de diferentes idades. Em relação ao sexo, a prevalência da doença em mulheres variou de 3,6 a 94%, enquanto em homens os valores variaram de 4,4 a 84%. Essa grande variação nos valores de prevalência ocorre devido à falta de definição exata para a obesidade sarcopênica e à ausência de padronização na classificação dos pacientes, dando margem para o uso de diferentes critérios entre os avaliadores (BATSIIS *et al.*, 2013).

2.3.3 Causas e fisiopatogenia

A obesidade sarcopênica abarca uma complexa associação entre os mecanismos responsáveis por ambas as doenças. A fisiopatogenia envolve, dentre diversos fatores ainda pouco estudados, a liberação de mediadores pró-inflamatórios, distúrbios hormonais e estresse oxidativo (ver itens anteriores 2.1.4 e 2.2.3) (NELSON; COUTO, 2015; SCHAAP *et al.*, 2009; SZULC *et al.*, 2004).

Acredita-se que exista uma relação mútua entre o acúmulo de tecido adiposo e a redução da massa muscular esquelética Figura 3. De forma mais específica, na obesidade sarcopênica, o quadro de sarcopenia colabora para o acúmulo de gordura por reduzir a atividade física do indivíduo, ao passo que a obesidade promove a liberação crônica de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para a redução da massa magra, formando assim um ciclo que se repete continuamente com o avanço da idade (ZAMBONI *et al.*, 2008).

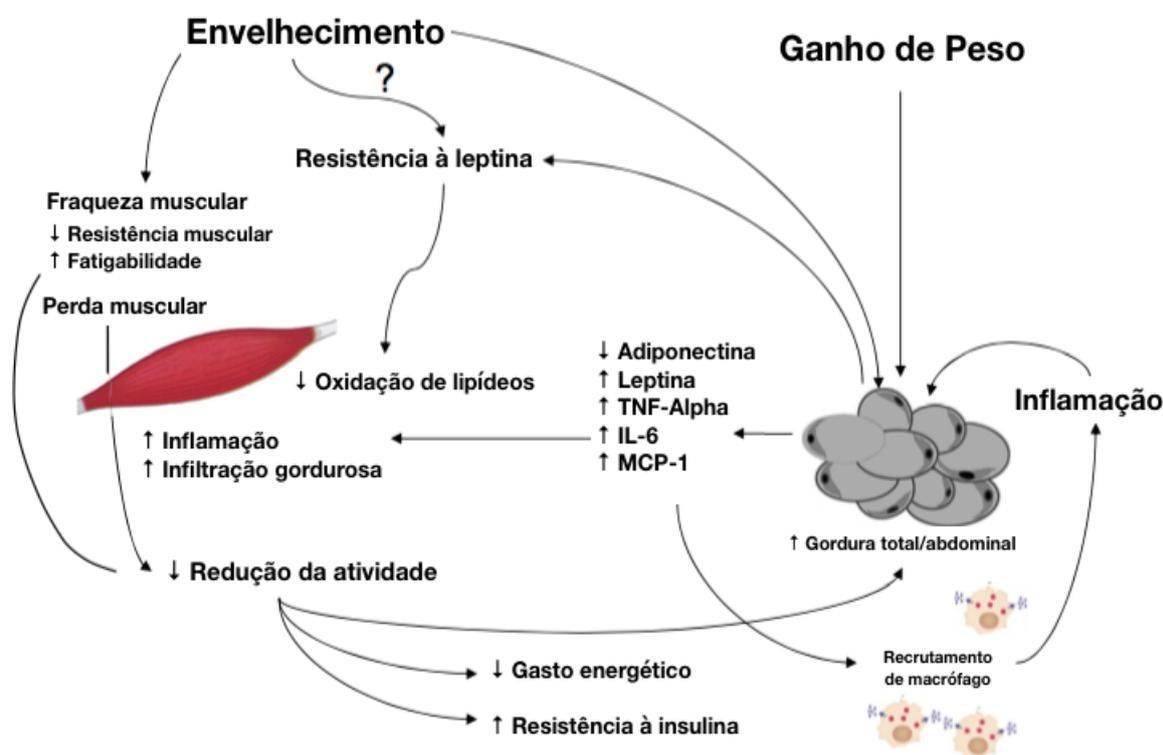


Figura 3 – Relação entre o tecido muscular e o tecido adiposo. Mecanismo desencadeador da obesidade sarcopênica.

Fonte: Adaptada de Zamboni *et al.*, (2008).

2.3.4 Consequências

Na medicina humana, a principal preocupação em pacientes com obesidade sarcopênica, assim como para a sarcopenia de forma isolada, é o risco de quedas devido ao excesso de peso e à fraqueza muscular. Um estudo recente identificou que homens com OS, que foram avaliados por um período de 2 anos, apresentaram um aumento de 60% na incidência de quedas. Além disso, as chances de fraturas nesses pacientes chegaram a ser maiores do que o dobro, quando comparado a homens saudáveis com a mesma idade (SCOTT *et al.*, 2016).

Na medicina veterinária não foram realizados estudos que estimassem as consequências da obesidade sarcopênica nas espécies felina e canina, porém, acredita-se que estas sejam a soma das observadas tanto na obesidade, quanto na sarcopenia (Figura 4) (CHOI, 2016; HERBST *et al.*, 2007; LITTLE, 2012; NELSON; COUTO, 2015; PAGANO *et al.*, 2015; SZULC *et al.*, 2004)

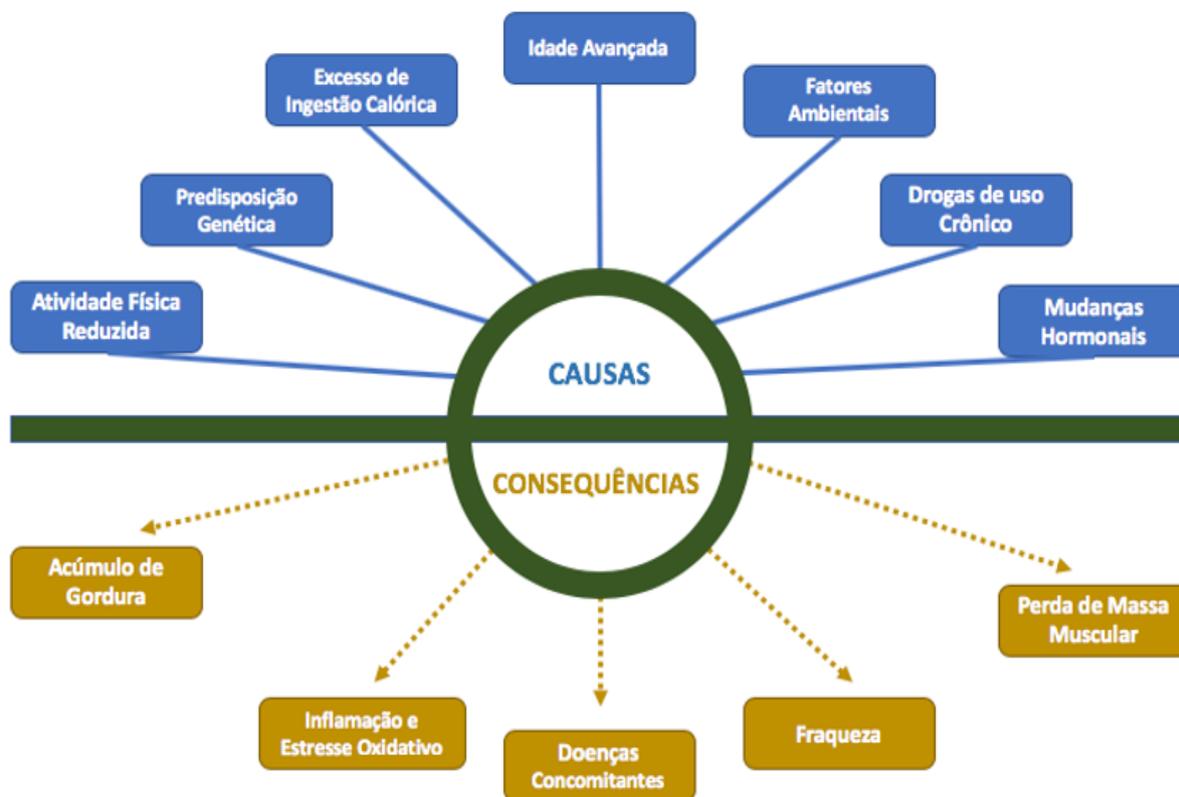


Figura 4 – Causas e consequências de obesidade sarcopênica em cães e gatos.

Fonte: Adaptada de Choi (2016), Herbst *et al.* (2007), Little (2012), Nelson e Couto (2015), Pagano *et al.* (2015) e Szulc *et al.* (2004).

2.3.5 Diagnóstico

Atualmente, várias técnicas estão disponíveis para a avaliação da composição corporal de cães e gatos (ver tópicos 2.1.6 e 2.2.5). Porém, nem todos estão disponíveis na prática clínica. No Quadro 5 encontram-se os métodos diagnósticos previamente descritos e suas respectivas vantagens e desvantagens (SANTAROSSA; PARR; VERBRUGGHE, 2017)

Quadro 5 – Métodos para avaliação da composição corporal em cães e gatos.

Métodos	Prática Clínica	Validado pelo DEXA	Vantagens	Desvantagens
Análise Química	Não	Sim	Método mais acurado	É trabalhosa e realizada em cadáveres
Peso Corporal	Sim	Não	Fácil mensurar, pode indicar mudanças de peso	Não quantifica gordura em relação à massa magra (as escalas não estão calibradas)
Escore de Condição Corporal	Sim	Sim	Fácil de realizar, estima o grau de gordura corporal	Subjetivo
Escore de Condição Muscular	Sim	Sim	Fácil de realizar, estima o grau de perda de massa muscular	Subjetivo e não há descrições publicadas
Mensurações Morfométricas	Sim	Sim	Fácil realização (circunferência), estima a porcentagem de gordura corporal	Subjetiva e desafiadora quando se realiza múltiplas medidas, além da dificuldade com a movimentação do animal
Ultrassonografia	Limitada	Não	Visualiza a gordura subcutânea	Não quantifica gordura corporal
Radiografia	Limitada	Não	Visualiza a gordura subcutânea	Não quantifica gordura corporal
Absortometria Radiológica de Dupla Energia (DEXA)	Limitada	-	Acurado em avaliar a gordura corporal e massa magra, usa baixa dose de radiação	Necessita sedação ou anestesia, alto custo e depende da hidratação e posição do paciente
Tomografia Computadorizada	Não	Sim	Visualiza a gordura visceral e subcutânea e massa magra	Necessita sedação ou anestesia com altas doses de radiação
Ressonância Magnética	Não	Não	Visualiza massa gordura corporal e massa magra	Alto custo e necessita sedação ou anestesia
Ressonância Magnética Quantitativa Diluição de Óxido de Deutério	Não	Sim	Não precisa de sedação	Alta radiação e depende do estado de hidratação
Impedância Bioelétrica	Não	Sim	Não invasiva	Depende do estado de hidratação

Fonte: Adaptada de Santarossa, Parr e Verbrughe (2017).

3 CONCLUSÕES

Pode-se concluir com o presente trabalho de revisão que apesar de não haver uma definição exata para a obesidade sarcopênica, tanto na medicina quanto na medicina veterinária, entende-se de forma geral, que a doença se dá na ocorrência simultânea de outras duas, a sarcopenia e a obesidade. Ainda, a carência de clareza e objetividade na definição, abre margem para variados critérios de classificação de pacientes no momento da realização de estudos na área, o que culmina numa grande variação nos resultados das pesquisas e na dificuldade de obtenção de dados consistentes.

Nesse contexto, um dos principais reflexos é observado na extensa variação dos índices de prevalência da doença, que chegam a apresentar uma diferença maior que vinte vezes entre os autores. Além disto, estudos que avaliem a prevalência na espécie felina são de extrema importância, porém ainda não foram realizados até o momento. Em relação à patogenia da obesidade sarcopênica, esta, está diretamente ligada ao desenvolvimento simultâneo tanto dos fatores desencadeadores da sarcopenia, quanto da obesidade. Pôde-se observar com esse levantamento de dados que alguns dos fatores envolvidos na patogenia da obesidade, são comuns também à sarcopenia, como a idade avançada e o baixo grau de atividade física. Essa informação, talvez indique que ambos os fatores, sejam, dentre os outros citados na revisão, os mais importantes a serem explorados no entendimento da doença em gatos.

Assim como ocorre com a patogenia, as consequências da doença resultam da soma das complicações observadas tanto na sarcopenia quanto na obesidade. Os métodos de diagnóstico considerados padrão ouro em âmbito de pesquisa é a tomografia computadorizada e a ressonância magnética, no entanto, na rotina clínica, a técnica considerada de escolha ainda é o DEXA. Por fim, espera-se que este trabalho de revisão tenha auxiliado no entendimento da importância da doença e instigado o desenvolvimento de pesquisas que esclareçam pontos ainda obscuros à cerca da obesidade sarcopênica na espécie felina.

4 REFERÊNCIAS

BALAGOPAL, P. *et al.* Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 273, n. 4, p. 790-800, 1997.

BALDWIN, K. *et al.* AAHA nutritional assessment guidelines for dogs and cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 46, n. 4, p. 285-296, 2010.

BATSI, J. *et al.* Variation in the prevalence of sarcopenia and sarcopenic obesity in older adults associated with different research definitions: dual-energy X-ray absorptiometry data from the national health and nutrition examination survey 1999-2004. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 61, n. 6, p. 974-980, 2013.

BORGES, N. *et al.* Precisão da técnica de absorciometria de raios-x de dupla energia na determinação da composição corporal em gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 263-266, 2008.

CHOI, K. Sarcopenia and sarcopenic obesity. **Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 2, p. 86-89, 2013.

_____. Sarcopenia and sarcopenic obesity. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 31, n. 6, p. 1054-1060, 2016.

COLLIARD, L. *et al.* Prevalence and risk factors of obesity in an urban population of healthy cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 2, p. 135-140, 2009.

CRUZ-JENTOFT, A. *et al.* Sarcopenia: european consensus on definition and diagnosis: report of the european working group on sarcopenia in older people. **Age and Ageing**, v. 39, n. 4, p. 412-423, 2010.

EVANS, W.; CAMPBELL, W. Sarcopenia and age-related changes in body composition and functional capacity. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 2, p. 465-468, 1993.

FREEMAN, L. *et al.* Evaluation of the use of muscle condition score and ultrasonographic measurements for assessment of muscle mass in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 6, p. 595-600, 2019.

FREITAS, V. *et al.* Metabolic evaluation in overweight and obese cats and association with blood pressure. **Ciência Rural**, v. 48, n. 1, p. 1-4, 2018.

GERMAN, A. The growing problem of obesity in dogs and cats. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 7, p. 1940-1946, 2006.

GERMAN, A. *et al.* A simple, reliable tool for owners to assess the body condition of their dog or cat. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 7, p. 2031-2033, 2006.

HAND, M. S.; THATCHER, C. D.; REMILLARD, R. L. **Nutrición clínica en pequeños animales**. Buenos Aires: Mark Morris Institute, 2000. 476p.

HARPER, E. *et al.* Effects of feeding regimens on bodyweight, composition and condition score in cats following ovariohysterectomy. **Journal of Small Animal Practice**, v. 42, n. 9, p. 433-438, 2001.

HERBST, A. *et al.* Accumulation of mitochondrial DNA deletion mutations in aged muscle fibers: evidence for a causal role in muscle fiber loss. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 62, n. 3, p. 235-245, 2007.

- HUTCHINSON, D. *et al.* Assessment of methods of evaluating sarcopenia in old dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 11, p. 1794-1800, 2012.
- IWAZAKI, E. *et al.* The relationship among ultrasound measurements, body fat ratio, and feline body mass in aging cats. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 4, p. 273-279, 2018.
- KANCHUK, M. *et al.* Weight gain in gonadectomized normal and lipoprotein lipase-deficient male domestic cats results from increased food intake and not decreased energy expenditure. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1866-1874, 2003.
- KEALY, R. *et al.* Effects of diet restriction on life span and age-related changes in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 9, p. 1315-1320, 2002.
- LAFLAMME, D. P. Understanding and managing obesity in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 36, n. 6, p. 1283-1295, 2006.
- _____. Development and validation of a body condition score system for cats: a clinical tool. **Feline Practice Journal**, v. 25, n. 5/6, p. 13-18, 1997.
- LITTLE, S. **August's consultations in feline internal medicine**. 7. ed. St. Louis: Elsevier - Health Sciences Division, 2016. 1061p.
- _____. The cat – clinical medicine and management. In: BARTGES, J. W *et al.* **Nutritional disorders**. Missouri: Elsevier Saunders, 2012. p. 260-261.
- LUND, E. *et al.* Prevalence and risk factors for obesity in adult cats from private us veterinary practices. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 3, n. 2, p. 88-96, 2005.
- MENDES-JUNIOR, A. *et al.* Prevalência e fatores de risco da obesidade felina em Alegres, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1801-1806, 2013.
- MUNDAY, H.; EARLE, K.; ANDERSON, P. Changes in the body composition of the domestic shorthaired cat during growth and development. **The Journal of Nutrition**, v. 124, n. 12, p. 2622-2623, 1994.
- NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 1512p.
- PAGANO, T. *et al.* Age-related skeletal muscle atrophy and upregulation of autophagy in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 206, n. 1, p. 54-60, 2015.
- PRADO, C.; HEYMSFIELD, S. Lean tissue imaging. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 38, n. 8, p. 940-953, 2014.
- ROSEMBERG, I. Summary comments. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 50, n. 5, p.1231-1233, 1989.

RUDMAN, D. Growth hormone, body composition, and aging. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 33, n. 11, p. 800-807, 1985.

SANTAROSSA, A.; PARR, J.; VERBRUGGHE, A. The importance of assessing body composition of dogs and cats and methods available for use in clinical practice. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 251, n. 5, p. 521-529, 2017.

SCHAAP, L. *et al.* Higher inflammatory marker levels in older persons: associations with 5-year change in muscle mass and muscle strength. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 64A, n. 11, p. 1183-1189, 2009.

SCOTT, D. *et al.* Sarcopenic obesity and its temporal associations with changes in bone mineral density, incident falls, and fractures in older men: the concord health and ageing in men project. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 3, p. 575-583, 2016.

SZULC, P. *et al.* Hormonal and lifestyle determinants of appendicular skeletal muscle mass in men: the MINOS study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 2, p. 496-503, 2004.

TARKOSOVA, D. *et al.* Feline obesity – prevalence, risk factors, pathogenesis, associated conditions and assessment: a review. **Veterinární Medicína**, v. 61, n. 6, p. 295-307, 2016.

TENG, K. *et al.* Associations of body condition score with health conditions related to overweight and obesity in cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 59, n. 10, p. 1-13, 2018.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Obesity**. [online] Disponível em: <<https://www.who.int/topics/obesity/en/>>. Acesso em: 21 Jun. 2019.

ZAMBONI, M. *et al.* Sarcopenic obesity: a new category of obesity in the elderly. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 18, n. 5, p. 388-395, 2008.

Capítulo 5

Alterações comportamentais em felinos decorrentes da pandemia – uma suposição



Driéle Lutzke¹
Caio Vaz Baqui Lima²
Karina Preising Aptekmann³

¹ Hospital Veterinário da Universidade Vila Velha, e-mail: drielelutzke@gmail.com

² Médico veterinário autônomo, e-mail: caiobaqui@hotmail.com

³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: kapreising@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2019, foi identificada uma nova espécie de coronavírus que infecta humanos, nomeada inicialmente como 2019-nCoV (ZHU *et al.*, 2020), sendo renomeado posteriormente como SARS-CoV-2 (GORBALENYA *et al.*, 2020), e causador da doença COVID-19 (WHO, 2020c). A COVID-19 teve seus primeiros casos registrados em Wuhan, na China (ZHU *et al.*, 2020), mas infectou milhões de pessoas em todo mundo (WHO, 2020a), produzindo desde quadros assintomáticos, até quadros respiratórios graves que podem evoluir para a morte (HUANG *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020).

Medidas preventivas consistem na principal estratégia para diminuir a transmissão do vírus, e incluem a adoção de cuidados de higiene pessoal, distanciamento social e isolamento voluntário de indivíduos com sinais respiratórios (WHO, 2020b), no entanto, várias localidades têm adotado medidas de confinamento mais rigorosas (LAU *et al.*, 2020). Essas modificações impostas a rotina de milhões de pessoas têm gerado efeitos na saúde mental de muitos indivíduos, sendo notado o aumento no compartilhamento de emoções negativas em mídias sociais, refletindo principalmente a preocupação dos usuários com saúde e família (LI *et al.*, 2020).

Nesse contexto, as relações interespecíficas entre o homem e animais de companhia podem desempenhar importante papel social, servindo como apoio emocional num momento em que milhares de pessoas têm experimentado momentos de insegurança. No entanto, os animais de companhia também podem sofrer prejuízos devido ao período de quarentena, uma vez que as características ambientais físicas, sensoriais e sociais da residência podem ser afetadas por novos comportamentos ou adaptações que seus tutores e outros moradores necessitem adotar frente ao quadro atual (BOWEN *et al.*, 2020).

Movimentos bruscos, sons diferentes ou altos, elementos ambientais novos e a presença de pessoas estranhas podem funcionar como agentes estressores para os gatos (STELLA; LORD; BUFFINGTON, 2011). Um ambiente desfavorável pode gerar, mesmo em gatos saudáveis, comportamentos inespecíficos que denotam doença, ainda que o agente estressor seja mantido por curto tempo (STELLA; CRONEY; BUFFINGTON, 2013).

As alterações sociais geradas pela pandemia podem gerar alterações comportamentais em gatos, ou pelo aumento de fatores estressantes ou pelo aumento da ligação entre tutores e seus animais. Objetiva-se revisar a relação entre coronavírus e os gatos, assim como a domesticação e o comportamento natural do gato, o papel do estresse no desenvolvimento de doenças no gato e as relações interespecíficas entre gatos domésticos e as pessoas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 CORONAVÍRUS E OS GATOS

As espécies de coronavírus pertencem a família Coronaviridae, e são vírus RNA de fita simples, envelopados e de grandes dimensões. Causam infecção principalmente do trato respiratório e gastrointestinal de mamíferos (PAYNE, 2017).

Dentro da subfamília Coronavirinae, há quatro gêneros identificados: 1. *Alphacoronavirus*, abrange espécies que infectam cães, gatos e suínos, tendo como principais representantes o Coronavírus canino tipo I e II, e o Coronavírus felino tipo I e II (CAVANAGH, 2005); 2. *Betacoronavirus*, compreende espécies que infectam bovinos, equinos, humanos e suínos, tendo como principais representantes o SARS-CoV e SARS-CoV-2 (CDC, 2020); 3 e 4. *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus*, abrange espécies que infectam principalmente aves (CAVANAGH, 2005). Uma nova espécie de coronavírus que infecta humanos foi identificada em dezembro de 2019, na China, sendo nomeada inicialmente como 2019-nCoV (ZHU *et al.*, 2020), e renomeada como SARS-CoV-2 (GORBALENYA *et al.*, 2020), causador da doença COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*) (WHO, 2020c).

Gatos são suscetíveis a infecção por coronavírus, sendo o Coronavírus felino (CoVf) capaz de causar infecções assintomáticas ou quadros entéricos que geralmente são autolimitantes. Ocasionalmente, essa espécie de vírus pode sofrer mutações e induzir no hospedeiro uma vasculite imunomediada potencialmente fatal denominada Peritonite Infecciosa Felina (PIF) (ADDIE, 2012). Apesar dos humanos não poderem ser infectados pelo CoVf e PIF (ADDIE, 2012), os gatos parecem ser sensíveis a infecção laboratorial (GAUDREAULT *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2020) e natural pelo SARS-CoV-2, mas aparentemente não são propícios a desenvolver sinais clínicos graves, e possivelmente não apresentam a capacidade de transmitir a infecção a humanos (CSISZAR *et al.*, 2020; GAUDREAULT *et al.*, 2020). O surgimento de novas espécies virais gera preocupações quanto ao potencial zoonótico, e como animais, principalmente os domésticos, podem atuar na propagação da doença (GAUDREAULT *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 infectou milhões de pessoas em todo mundo (WHO, 2020a), causando desde quadros assintomáticos, a distúrbios respiratórios graves que podem evoluir para a morte (HUANG *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). O Brasil foi o primeiro país da América Latina a notificar um caso de COVID-19, em 26 de fevereiro de 2020 (BURKI, 2020), e milhares de pessoas morreram até a presente data (BRASIL, 2021).

Ações preventivas como proteção dos profissionais de saúde com equipamentos de proteção individual, identificação rápida de pacientes sintomáticos e seu isolamento, bem como a identificação dos contatos próximos de casos positivos e realização de quarentena, auxiliaram na redução da transmissão em países como a China (MARSON; ORTEGA, 2020), porém, várias localidades têm adotado medidas de confinamento mais rigorosas na tentativa de interromper o ciclo de transmissão viral (LAU *et al.*, 2020). Medidas de isolamento social variaram no último ano no Brasil, e entre suas unidades federativas, o que refletiu na variação no número de casos ao longo do tempo. As taxas de incidência e mortalidade aparentam ser mais pronunciadas em localidades com maior desigualdade econômica (DEMENECH *et al.*, 2020), e o isolamento domiciliar tende a agravar essa situação (ROSARIO *et al.*, 2021).

Evacuações de cidades, crise econômica e o medo da transmissão zoonótica levou ao abandono de animais em várias localidades do mundo frente a pandemia do COVID-19 (KIM, 2020; VEIGA, 2020). No Brasil, além de abandonos, a adoção de animais aumentou, refletindo a necessidade de companhia nesse período em que muitas pessoas têm se sentido solitárias (PEDUZZI, 2020).

Ao longo dos anos, os gatos vêm ganhando espaço nos lares domésticos, provavelmente pela fácil adaptabilidade desta espécie ao estilo de vida moderno e pela verticalização das cidades, onde as moradias estão cada vez menores (MAGNABOSCO, 2006). No entanto, o período de quarentena pode gerar prejuízos aos gatos, uma vez que as características ambientais físicas, sensoriais e sociais podem ser afetadas pelos novos comportamentos ou adaptações que seus tutores e outros moradores da residência necessitem adotar frente ao quadro atual (BOWEN *et al.*, 2020).

Aparentemente, os tutores aprendem a perceber diferenças comportamentais em seus gatos, e para evitar ou ao menos minimizar prejuízos, o tutor de gato deveria conhecer o comportamento natural de seu animal, e desta forma, poderia controlar melhor o ambiente, e assim evitar que situações estressoras se prolonguem ou ocorram de forma repetida (ELVERS; LAWRIW; CHAMBERS, 2020).

2.2 DOMESTICAÇÃO E COMPORTAMENTO NATURAL DO GATO

Especula-se que o início do processo de domesticação do gato tenha ocorrido na região do Oriente Próximo a partir de seu ancestral, o gato selvagem africano (*Felis silvestres lybica*) (DRISCOLL *et al.*, 2007). Em sua publicação, Bradshaw (2018) descreve que exemplares selvagens teriam se aproximado das fazendas para predar roedores, porém, apenas aqueles gatos

que apresentavam o comportamento certo para se manter próximo ao homem, deram origem ao gato doméstico de hoje.

Achados em Chipre de uma ossada de gato enterrada ao lado de um esqueleto humano junto a oferendas, apontam que os gatos se encontravam na ilha há mais de 9000 anos atrás, possivelmente fruto da introdução humana e naquela época apresentavam ligações importantes e intencionais com estes (VIGNE *et al.*, 2004). No Antigo Egito, com o aumento da oferta de alimentos para os gatos nas aldeias, esses foram usados não apenas para controle de pragas, mas também para caça. Vários registros históricos apontam que os gatos eram muito populares entre os egípcios, sendo cuidados dentro de templos, e estabelecendo com os humanos laços afetivos (BALDWIN, 1975).

O processo de domesticação do gato foi retardado na Europa durante a Idade Média, pois instituições religiosas os consideravam demoníacos, no entanto, com a disseminação da Peste Negra que produziu a morte de milhares de europeus, os gatos voltaram a ter lugar nos lares e, atualmente são muito populares em todo o mundo (BREEDLOVE; IGUNMA, 2020).

Apesar de considerados animais solitários, os gatos são gregários facultativos, ou seja, são animais que podem formar grupos sociais, mas só os formarão se houver recursos suficientes para todos do grupo. Os membros do grupo são amigáveis entre si, ou pelo menos tolerantes, e quando na natureza, utilizam comunicação corporal para minimizar a ocorrência de conflitos (RODAN; HEATH, 2016). Uma estratégia para amedrontar outros gatos, bem como outros animais é o eriçamento do pelo e a envergadura da coluna para parecer maior. Rosnados, chicoteios com a cauda, retração das orelhas, dilatação das pupilas e movimentos com as patas dianteiras também são utilizados para afastar ameaças (RODAN; HEATH, 2016). No entanto, a partir do momento que são introduzidos numa casa, os gatos daquele ambiente não têm a opção de escolha sobre quantos outros gatos socializarão o espaço, nem como os recursos serão distribuídos entre eles, e esta situação pode gerar graves conflitos (RODAN; HEATH, 2016).

Os gatos também podem demonstrar comportamentos afiliativos como forma de se aproximar de outros gatos, ou até mesmo de outros animais e humanos. Estes comportamentos envolvem a alimentação conjunta, contato próximo, cuidado mútuo e esfregação (RODAN; HEATH, 2016). Por meio de alguns destes comportamentos, os gatos depositam marcas de cheiro pelo ambiente, uma vez que possuem glândulas produtoras de odor em vários locais do corpo (ex.: bochechas, queixo, entre os dedos, etc.) (BRADSHAW, 2018). Por isso, o olfato é um sentido muito utilizado pelos gatos para comunicação, sendo cerca de mil vezes mais sensível que o do homem, sendo importante na espécie para a introdução de novos membros

em um grupo, pois um gato tende a aceitar melhor um outro gato que apresente um odor previamente conhecido, do que aquele totalmente desconhecido. Em contrapartida, um gato que venha a perder seu cheiro característico (p. ex.: banho, visita ao veterinário) pode ser rejeitado pelos demais, mesmo pertencendo ao grupo há muito tempo. Além disso, é por meio do olfato que os gatos reúnem informações sobre o ambiente (BRADSHAW, 2018). Além das narinas, os gatos utilizam o órgão vomeronasal (localizado entre o palato duro e o nariz) para captar cheiros e sabores dispersos em líquidos (BRADSHAW, 2018). Pelo fato das pessoas não conseguirem experimentar a mesma experiência bioquímica por meio do olfato como os gatos, há dificuldade de imaginar e identificar muitos distúrbios comportamentais na espécie que podem ter origem do ambiente olfativo (BRADSHAW, 2018).

A arranhadura de superfícies também é uma importante forma de comunicação, por meio da qual, os gatos depositam os feromônios produzidos por glândulas localizadas nas patas e criam uma mensagem visual no local. Além de afiar as garras e remover restos de unhas, tem como intuito exercitar a musculatura dos membros torácicos e alongar a coluna (DEPORTER; ELZERMAN, 2019). Esse é um comportamento natural do gato, muito embora seja visto como algo problemático pela maioria dos tutores (BRADSHAW, 2018).

Grande parte dos distúrbios comportamentais desenvolvidos pelo gato parece ser resultado do impedimento do gato exibir seu comportamento natural ou atingir seu equilíbrio emocional (BRADSHAW, 2018). Desta forma, o desenvolvimento de medidas educativas junto aos tutores, podem ajudar a prevenir comportamentos problemáticos, ou que medidas extremas, como abandonos, não aconteçam frente à comportamentos normais dos gatos (OVERALL *et al.*, 2005) como a predação, que foi considerado um hábito inaceitável e causa de devolução de gatos na Austrália (ALBERTHSEN *et al.*, 2016).

2.3 O PAPEL DO ESTRESSE NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS NO GATO

O temperamento de um gato será definido com base em sua composição genética e experiências passadas. Estes fatores junto ao ambiente em que o gato vive influenciará na sua resposta ao estresse (AMAT; CAMPS; MANTECA, 2016). Um ambiente desfavorável pode gerar, mesmo em gatos saudáveis, comportamentos inespecíficos que denotam doença, ainda que o agente estressor seja mantido por curto tempo (STELLA; CRONEY; BUFFINGTON, 2013).

O estresse gerado em gatos admitidos em um abrigo pareceu predispor a perda de peso e poderia facilitar o desenvolvimento de infecções no trato respiratório superior desses animais,

principalmente em situações de altos escores de estresse (TANAKA *et al.*, 2012). Desta forma, mudanças ambientais, ambientes com recursos insuficientes, conflito entre gatos e pouca interação entre humanos e gatos (AMAT; CAMPS; MANTECA, 2016), movimentos bruscos, cheiros e/ou sons diferentes e a presença de animais e/ou pessoas estranhas podem funcionar como agentes estressores para os gatos (STELLA; LORD; BUFFINGTON, 2011).

O estresse pode fazer com que o gato fique mais tempo escondido, reduza seu nível de atividades e de brincadeiras, demonstre menos comportamentos afiliativos, ou dispenda menos tempo em sua própria higiene. Além disso, o estresse pode gerar distúrbios alimentares como anorexia, polifagia ou alotriofagia (AMAT; CAMPS; MANTECA, 2016) e diminuir a expectativa de vida do gato (RODAN; HEATH, 2016).

O tamanho do ambiente pode influenciar no nível de atividade do gato, e a densidade de animais no ambiente influencia na adaptação do gato ao ambiente, e consequentemente no nível de estresse (KESSLER; TURNER, 1999). Estresse crônico pode ocorrer em ambientes com grandes densidades, e isso gerar não só distúrbios comportamentais, mas também físicos (RODAN; HEATH, 2016). Além disso, gatos mantidos sem acesso à rua, aparentam maior probabilidade de desenvolver problemas comportamentais, do que aqueles com acesso ao ar livre (AMAT *et al.*, 2009).

Distúrbios comportamentais foram responsáveis por 4% dos abandonos de gatos na Austrália entre os anos de 2006 e 2010 (ALBERTHSEN *et al.*, 2016), 7% no Reino Unido no ano de 2001 (CASEY *et al.*, 2009), 19% nos Estados Unidos (SALMAN *et al.*, 2000) e 24% na Dinamarca (JENSEN; SANDØE; NIELSEN, 2020). Além do abandono, distúrbios comportamentais predispõe tutores a optar pela eutanásia de seus animais, mesmo que estes sejam saudáveis e sociáveis (ALBERTHSEN *et al.*, 2016).

Em um estudo desenvolvido entre os anos de 2008-2014, no Brasil, a agressão foi a queixa comportamental mais relatada, sendo a agressão entre gatos a condição mais comum (31%), e em uma proporção menor, a agressão contra pessoas (13,5%) (RAMOS *et al.*, 2019).

Medo, ansiedade, disputas por território, eventos traumáticos, introdução de um novo gato ou mudanças sociais são causas que deflagram a agressão entre gatos, enquanto o comportamento agressivo contra humanos pode ser aprendido durante brincadeiras quando os gatos ainda são jovens, e caso não seja manejado adequadamente, se perpetuar durante a vida adulta, e resultar em acidentes graves ou até transmissão de doenças, e com isso levar ao abandono desses animais (NORSWORTHY, 2018).

Além disso, os gatos podem apresentar bons relacionamentos com adultos, e interações menos afetuosas com crianças como relatado por Hart *et al.* (2018). Uma forma de melhorar o

relacionamento entre ambos, seria a habituação de gatos quando ainda filhotes a crianças com comportamentos amigáveis (HART *et al.*, 2018).

Outra condição comum que Ramos *et al.* (2019) identificaram como motivo para um tutor de gato procurar auxílio de um comportamentalista é a eliminação inadequada. Urinar fora da caixa (18,7%), demarcar território (6,5%) e defecar em locais não apropriados (1,3%) foram as condições apontadas. A eliminação inadequada de urina é um comportamento problemático comum em gatos e foi causa de abandonos na Austrália (ALBERTHSEN *et al.*, 2016). A cistite intersticial felina é a principal doença que provoca periúria nesta espécie, e agentes estressores, mudanças no manejo ou na rotina do gato são os principais fatores que desencadeiam o primeiro evento ou favorecem recorrências (DANTAS, 2018).

A demarcação de território difere da eliminação inadequada de urina com base na forma como são executados. O ato de demarcar envolve a eliminação de pequenas quantidades de urina em superfícies verticais ou locais horizontais importantes da residência, com o intuito de comunicação e evidenciar a presença do marcador na casa. O gato geralmente está de pé e com a cauda erguida (CARNEY *et al.*, 2014; NEILSON, 2004). Em contrapartida, na eliminação inadequada, o gato deposita sua urina ou mesmo fezes em superfícies horizontais com uma postura agachada, com o intuito de esvaziamento da bexiga e/ou intestinos, porém, em locais intencionalmente diferentes da caixa de areia (NEILSON, 2004) ou anteriormente aprendido (DANTAS, 2018).

Aversão à caixa de areia pode ser desenvolvida devido a sua limpeza, localização, tamanho e tipo de substrato, e podem incitar um gato a eliminar em locais inadequados (CARNEY *et al.*, 2014; NEILSON, 2004). No entanto, condições infecciosas, inflamatórias e metabólicas, ou que aumentem a urgência, frequência ou provoquem dor ao urinar ou defecar podem contribuir para eliminações inadequadas, e devem ser consideradas antes do diagnóstico de uma alteração de origem comportamental (CARNEY *et al.*, 2014; DANTAS, 2018; NEILSON, 2004).

Condições dermatológicas também podem ser desencadeadas pelo estresse, e os cuidados excessivos ou inadequados com o pelame, bem como sua arrancadura são as principais manifestações. A alopecia psicogênica felina é uma condição sobre diagnosticada nesta espécie, no entanto, causas dermatológicas deflagrando esta alteração são mais comuns do que causas comportamentais propriamente ditas (HNILICA, 2011). Ramos *et al.* (2019) apontaram que 8,4% dos gatos atendidos com queixas comportamentais apresentavam cuidados excessivos com o pelame.

Privar os gatos do comportamento de arranhadura pode resultar na destruição de itens domésticos, e a punição do gato pode diminuir o bem-estar e aumentar seu estresse (DEPORTER; ELZERMAN, 2019), e ser motivo para uma consulta com comportamentalista (RAMOS *et al.*, 2019). Em países onde a onicectomia em gatos, ainda é realizada na tentativa de correção deste comportamento indesejado, tem como consequências dor crônica, que pode colaborar no desenvolvimento de outros distúrbios comportamentais como aversão à caixa e aumento do comportamento de morder (MARTELL-MORAN; SOLANO; TOWNSEND, 2018), além do sentimento de insegurança do gato pela perda de um mecanismo de defesa (BRADSHAW, 2018).

A ingestão de objetos sem valor nutricional ou alotriofagia foi relacionada a problemas comportamentais em 4,3% dos gatos de um estudo dos Estados Unidos, sendo este distúrbio mais frequente em gatos jovens, e nos 2 meses seguintes a adoção (BAMBERGER; HOUP, 2006), e representou 8,4% dos casos atendidos por especialistas em comportamento felino no Brasil (RAMOS *et al.*, 2019).

Os casos atendidos por especialistas em comportamento provavelmente refletem aqueles mais desafiadores e/ou apresentam grande impacto na família do tutor, fazendo com que estes procurem ajuda especializada (RAMOS *et al.*, 2019).

Em todos estes contextos, condições médicas devem ser investigadas, uma vez que elas podem incitar ou contribuir para respostas agressivas, por gerarem dor ou aumentarem a irritabilidade (NORSWORTHY, 2018), e em alguns casos, mesmo após o tratamento do problema médico que desencadeou determinada condição, ela pode ser mantida por razões comportamentais (NEILSON, 2004). Desta forma, uma melhor compreensão de todos estes aspectos, pode ajudar a melhorar o bem-estar do gato, e com isso melhorar as relações humano-gato (PONGRÁCZ; SZAPU, 2018).

2.4 RELAÇÕES INTERESPECÍFICAS ENTRE GATOS DOMÉSTICOS E HUMANOS

As modificações impostas pela pandemia da COVID-19 à rotina de milhões de pessoas têm gerado efeitos na saúde mental de muitos indivíduos, sendo notado o aumento no compartilhamento de emoções negativas em mídias sociais, refletindo principalmente a preocupação dos usuários com saúde e família (LI *et al.*, 2020).

Diminuição da qualidade do sono, aumento no índice de massa corpórea (BARREA *et al.*, 2020), possivelmente pelo aumento no comportamento alimentar (45%) e diminuição de atividades físicas (56%), além do aumento no consumo de bebidas alcoólicas (32%) foram

comportamentos identificados durante a quarentena (TURNA *et al.*, 2021). Pacientes psiquiátricos também têm sido afetados com as medidas de isolamento, tendo seu quadro clínico agravado durante a quarentena (HAO *et al.*, 2020). Feter *et al.* (2021) relataram aumento nos sintomas moderados e graves de depressão e ansiedade em pacientes brasileiros.

Straede e Gates (1993) investigaram a relação entre a posse de animais de estimação e a saúde psicológica, e alguns resultados sugeriram que tutores de gatos podem possuir uma melhor saúde mental e bem-estar. Além disso, os gatos funcionariam como suporte emocional e substitutos humanos, principalmente em casas com número reduzido de pessoas, porém, menores momentos de interação humano-gato, podem gerar relações de qualidade inferior e, com isso ocorrer a diminuição do apego entre tutor e gato (STAMMBACH; TURNER, 1999).

Neste contexto, as relações interespecíficas entre o homem e animais de companhia pode desempenhar um papel social, servindo como apoio emocional neste momento que milhares de pessoas têm experimentado sentimento de insegurança ocasionado pela pandemia da COVID-19 (BOWEN *et al.*, 2020). A redução nos vínculos sociais e o maior tempo de permanência nas residências durante a pandemia foi associado a tristeza e ansiedade (BARROS *et al.*, 2020), o que tem permitido o aumento dos vínculos afetivos dos humanos com seus cães e gatos, o que aparenta não substituir o desejo de contato social (SHOESMITH *et al.*, 2021).

Tutores de gatos apontaram diferentes benefícios na posse de um gato, como: companhia, aconchego, relaxamento, alegria e amizade (KIENZLE; BERGLER, 2006). Além disso, alguns tutores acreditam que seus gatos possuem comportamentos empáticos, e interações lúdicas melhoram a relação entre estes (PONGRÁCZ; SZAPU, 2018). Tutores de cães, durante os primeiros meses da pandemia da COVID-19, relataram que seus animais auxiliaram na redução da angústia e do estresse gerado, servindo como distração, diminuindo os sentimentos de solidão e isolamento, bem como melhorando a saúde mental dos tutores (BUSSOLARI *et al.*, 2021). Estudos com tutores de gatos ainda não foram publicados até a redação deste capítulo.

No entanto, preocupações relacionadas a possibilidade de transmissão do SARS-CoV-2 a gatos, e o papel incerto desta espécie no ciclo de transmissão, pode gerar ansiedade em seus tutores e limitar o contato com seus animais, bem como reduzir os cuidados com a saúde destes (SHOESMITH *et al.*, 2021), ao passo que esta espécie em tempos de não pandemia, recebiam com menos frequência cuidados veterinários (LUE; PANTENBURG; CRAWFORD, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

Outra preocupação relacionada ao isolamento social é o retorno das atividades normais após a pandemia, uma vez que os animais se acostumaram a presença prolongada de humanos

nas residências, o que pode ocasionar futuramente problemas relacionados à separação (SHOESMITH *et al.*, 2021), o que deve ser objeto para estudos futuros.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até o momento não há evidências de que os gatos apresentam um papel significativo na disseminação do SARS-CoV-2. Sendo assim, o abandono ou a decisão por eutanásia de gatos como forma de controle da COVID-19 não é recomendado.

O conhecimento do tutor de gato que as alterações em sua rotina podem gerar distúrbios comportamentais no seu animal, pode aumentar a atenção e os laços entre tutor e gato, bem como permitir sua conscientização em controlar melhor o ambiente, evitando que situações estressoras se prolonguem ou ocorram de forma repetida. Além disso, a companhia felina a seus tutores oferece benefícios cotidianos que pode auxiliá-los a enfrentar o período de quarentena ocasionado pela pandemia da COVID-19.

4 REFERÊNCIAS

ADDIE, D. D. Feline coronavirus infections. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4. ed. St Louis: Elsevier Saunders, 2012. p 92-108.

ALBERTHSEN, C. *et al.* Numbers and characteristics of cats admitted to royal society for the prevention of cruelty to animals (RSPCA) shelters in Australia and reasons for surrender. **Animals**, v. 6, n. 3, p. 23-44, 2016.

AMAT, M.; CAMPS, T.; MANTECA, X. Stress in owned cats: behavioural changes and welfare implications. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 8, p. 577-586, 2016.

AMAT, M. *et al.* Potential risk factors associated with feline behaviour problems. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 121, n. 2, p. 134-139, 2009.

BALDWIN, J. A. Notes and speculations on the domestication of the cat in Egypt. **Anthropos**, v. 70, n. 3-4, p. 428-448, 1975.

BAMBERGER, M.; HOUP, K. A. Signalment factors, comorbidity, and trends in behavior diagnoses in cats: 736 cases (1991-2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 10, p. 1591-1601, 2006.

BARREA, L. *et al.* Does Sars-Cov-2 threaten our dreams? Effect of quarantine on sleep quality and body mass index. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 318, p. 1-11, 2020.

BARROS, M. B. A. *et al.* Report on sadness/depression, nervousness/anxiety and sleep problems in the Brazilian adult population during the COVID-19 pandemic. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, n. 4, p. 1-12, 2020.

BOWEN, J. *et al.* The effects of the Spanish COVID-19 lockdown on people, their pets and the human-animal bond. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 40, p. 75-91, 2020.

BRADSHAW, J. Normal feline behaviour ... and why problem behaviours develop. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 20, n. 5, p. 411-421, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Painel Coronavírus**. Brasília: MS, 2021. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 08 mai. 2021.

BREEDLOVE, B.; IGUNMA, J. In consideration of our mutual relationship with cats. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 12, p. 3108-3109, 2020.

BURKI, T. COVID-19 in Latin America. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 547-548, 2020.

BUSSOLARI, C. *et al.* “I couldn’t have asked for a better quarantine partner!”: Experiences with companion dogs during Covid-19. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 330-344, 2021.

CARNEY, H. C. *et al.* AAFP and ISFM guidelines for diagnosing and solving house-soiling behavior in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 16, n. 7, p.579-598, 2014.

CASEY, R. A. *et al.* Reasons for relinquishment and return of domestic cats (*Felis silvestris catus*) to rescue shelters in the UK. **Anthrozoös**, v. 22, n. 4, p. 347-358, 2009.

CAVANAGH, D. Coronaviridae: a review of coronaviruses and toroviruses. **Nature Public Health Emergency Collection**, p. 1-54, 2005.

CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). **Human coronavirus types**. CDC, 2020. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/types.html>>. Acesso em: 12 dez. 2020.

CSISZAR, A. *et al.* Companion animals likely do not spread COVID-19 but may get infected themselves. **GeroScience**, v. 42, p. 1229-1236, 2020.

DANTAS, L. M. S. Vertical or horizontal? Diagnosing and treating cats who urinate outside the box. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 48, n. 3, p. 403-417, 2018.

DEMENECH, L. M. *et al.* Desigualdade econômica e risco de infecção e morte por COVID-19 no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 23, p. 1-12, 2020.

DEPORTER, T. L.; ELZERMAN, A. L. Common feline problem behaviors: destructive scratching. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 21, n. 3, p. 235-243, 2019.

- DRISCOLL, C. A. *et al.* The Near Eastern origin of cat domestication. **Science**, v. 317, n. 5837, p. 519-523, 2007.
- ELVERS, G. C.; LAWRIW, A. N.; CHAMBERS, T. N. Stability of owners' perception of the behavioral style of their cats. **Anthrozoös**, v. 33, n. 3, p. 401-413, 2020.
- FETER, N. *et al.* Sharp increase in depression and anxiety among Brazilian adults during the COVID-19 pandemic: findings from the PAMPA cohort. **Public Health**, v. 190, p. 101-107, 2021.
- GAUDREAULT, N. N. *et al.* SARS-CoV-2 infection, disease and transmission in domestic cats. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 2322-2332, 2020.
- GORBALENYA, A. E. *et al.* The species severe acute respiratory syndrome related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536-544, 2020.
- HAO, F. *et al.* Do psychiatric patients experience more psychiatric symptoms during COVID-19 pandemic and lockdown? A case-control study with service and research implications for immunopsychiatry. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 87, p. 100-106, 2020.
- HART, L. A. *et al.* Compatibility of cats with children in the family. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, p. 278-290, 2018.
- HNILICA, K. A. **Small animal dermatology: a color atlas and therapeutic guide**. 3. ed. Missouri: Elsevier, 2011. p. 331-332.
- HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.
- JENSEN, J. B. H.; SANDØE, P.; NIELSEN, S. S. Owner-related reasons matter more than behavioural problems - a study of why owners relinquished dogs and cats to a danish animal shelter from 1996 to 2017. **Animals**, v.10, n. 6, p. 1-14, 2020.
- KESSLER, M. R.; TURNER, D. C. Socialization and stress in cats (*Felis silvestris catus*) housed singly and in groups in animal shelters. **Animal Welfare**, v. 8, n. 1, p. 15-26, 1999.
- KIENZLE, E.; BERGLER, R. Human-animal relationship of owners of normal and overweight cats. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 7, p. 1947-1950, 2006.
- KIM, A. **Cats and dogs abandoned at the start of the coronavirus outbreak are now starving or being killed**. CNN, 2020. Disponível em: <<https://edition.cnn.com/2020/03/15/asia/coronavirus-animals-pets-trnd/index.html>>. Acesso em: 23 abr. 2021.
- LAU, H. *et al.* The positive impact of lockdown in Wuhan on containing the COVID-19 outbreak in China. **Journal of Travel Medicine**, v. 27, n. 3, p. 1-7, 2020.

LI, S. *et al.* The impact of COVID-19 epidemic declaration on psychological consequences: a study on active weibo users. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 6, p. 1-9, 2020.

LUE, T. W.; PANTENBURG, D. P.; CRAWFORD, P. M. Impact of the owner-pet and client-veterinarian bond on the care that pets receive. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 4, p. 531-540, 2008.

MAGNABOSCO, C. **População domiciliada de cães e gatos em São Paulo: perfil obtido através de um inquérito domiciliar multicêntrico**. 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MARSON, F. A. L.; ORTEGA, M. M. COVID-19 in Brazil. **Pulmonology**, v. 26, n. 4, p. 241-244, 2020.

MARTELL-MORAN, N. K.; SOLANO, M.; TOWNSEND, H. G. G. Pain and adverse behavior in declawed cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 20, n. 4, p. 280-288, 2018.

NEILSON, J. C. Feline house soiling: elimination and marking behaviors. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 19, n. 4, p. 216-224, 2004.

NORSWORTHY, G. D. **The feline patient**. 5. ed. Hoboken: Wiley Blackwell, 2018. 1088p.

OVERALL, K. L. *et al.* Feline behavior guidelines from the American association of feline practitioners. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 1, p. 70-84, 2005.

PAYNE, S. Family Coronaviridae. In: _____. **Viruses: from understanding to investigation**. 1. ed. Cambridge: Academic Press, 2017. p. 149-158.

PEDUZZI, P. **Adoção e abandono de animais domésticos aumentam durante a pandemia**. Brasília: Agência Brasil, 2020. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2020-10/adocao-e-abandono-de-animais-domesticos-aumentam-durante-pandemia>>. Acesso em: 23 abr. 2021.

PONGRÁCZ, P.; SZAPU, J. S. The socio-cognitive relationship between cats and humans – companion cats (*Felis catus*) as their owners see them. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 207, p. 57-66, 2018.

RAMOS, D. *et al.* Feline behaviour problems in Brazil: a review of 155 referral cases. **Veterinary Record**, v. 186, n. 16, p. 1-3, 2019.

RODAN, I.; HEATH, S. E. **Feline behavioral health and welfare**. 1. ed. Missouri: Elsevier, 2016. 460p.

ROSARIO, D. *et al.* The COVID-19 pandemic in Brazil built on socioeconomic and political pillars. **Pathogens and Global Health**, v. 115, n. 2, p. 75-77, 2021.

SALMAN, M. D. *et al.* Behavioral reasons for relinquishment of dogs and cats to 12 shelters. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 3, n. 2, p. 93-106, 2000.

SHI, J. *et al.* Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. **Science**, v. 368, n. 6494, p. 1016-1020, 2020.

SHOESMITH, E. *et al.* The influence of human–animal interactions on mental and physical health during the first COVID-19 lockdown phase in the U.K.: a qualitative exploration. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 3, p. 976-991, 2021.

SILVA, M. H. S. *et al.* Caracterização demográfica e epidemiológica de cães e gatos domiciliados em Barbacena, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 1002-1006, 2010.

STAMMBACH, K. B.; TURNER, D. C. Understanding the human - cat relationship: human social support or attachment. **Anthrozoös**, v. 12, n. 3, p. 162-168, 1999.

STELLA, J.; CRONEY, C.; BUFFINGTON, T. Effects of stressors on the behavior and physiology of domestic cats. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 143, n. 2-4, p. 157-163, 2013.

STELLA, J. L.; LORD, L. K.; BUFFINGTON, C. A. T. Sickness behaviors in response to unusual external events in healthy cats and cats with feline interstitial cystitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 238, n. 1, p. 67-73, 2011.

STRAEDE, C. M.; GATES, R. G. Psychological health in a population of Australian cat owners. **Anthrozoös**, v. 6, n. 1, p. 30-42, 1993.

TANAKA, A. *et al.* Associations among weight loss, stress, and upper respiratory tract infection in shelter cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 240, n. 5, p. 570-576, 2012.

TURNA, J. *et al.* Anxiety, depression and stress during the COVID-19 pandemic: Results from a cross-sectional survey. **Journal of Psychiatric Research**, v. 137, p. 96-103, 2021.

VEIGA, E. A 'epidemia de abandono' dos animais de estimação na crise do coronavírus. Bled: BBC News, 2020. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/brasil-53594179#:~:text=De%20acordo%20com%20ele%2C%20os,tem%20como%20levar%20o%20animal.%22>>. Acesso em: 23 abr. 2021.

VIGNE, J. D. *et al.* Early taming of the cat in Cyprus. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 1-5, 2004.

WANG, D. *et al.* Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. **Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 11, p. 1061-1069, 2020.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) **Coronavirus disease (COVID-19) advice for the public**. Genebra: WHO, 2020b. Disponível em:

<<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/advice-for-public>>. Acesso em: 14 jun. 2020.

_____. **Coronavirus disease (COVID-19): situation report - 142**. Genebra: WHO, 2020a. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>>. Acesso em: 11 jun. 2020.

_____. **Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV**. Genebra: WHO, 2020c. Disponível em: <<https://www.who.int/dg/speeches>>. Acesso em: 11 jun. 2020.

ZHU, N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, p. 727-733, 2020.

Capítulo 6

Principais enfermidades bacterianas e virais observadas em codornas: atualidades e perspectivas



Matheus Joaquim dos Santos Candido¹

Débora Cantarin Neiva²

Márcio Phillip Andrade Correia³

Thalia Cipriano da Silva⁴

Jorge Luiz Rizzo Gervais⁵

Lukas Souza Felisberto⁶

Maria Aparecida da Silva⁷

Isabella Vilhena Freire Martins⁸

Jankerle Neves Boeloni⁹

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mcandido0352@gmail.com

² Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: deboranei97@gmail.com

³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: phillipandreadec@outlook.com

⁴ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: thalia.cipriano.16@outlook.com

⁵ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jorluiz1998@gmail.com

⁶ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lukas.souza07@hormail.com

⁷ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mvmariaparecida@gmail.com

⁸ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: ivfmartins@gmail.com

⁹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jarkerle@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Desde o ano 2016 a coturnicultura brasileira tem obtido crescimento ascendente, atingindo 16,20% a mais de produção de ovos em 2019 quando comparado ao período de 2016, consagrando a atividade do país no mercado mundial e garantindo rentabilidade a diversos produtores de aves (AVES, 2021; FAO, 2019). Associado a maior intensificação da produção, ocorre elevado risco de infecções por diversos patógenos como agentes bacterianos e virais, por exemplo, acarretando grandes prejuízos econômicos (SILVA *et al.*, 2018).

O interesse pela criação de codornas tem relação com seu rápido ciclo produtivo e lucratividade em menor tempo, quando comparada a outras criações. Estima-se que poedeiras comerciais, iniciam a produção no 45º dia de vida com duração do ciclo em até 40 semanas. As codornas destinadas ao corte, estão aptas para o abate em até seis semanas. Estas vantagens, somadas a precocidade sexual, rusticidade, menor investimento inicial e espaço (VIOLA *et al.*, 2018), têm feito com que o número de codornas alojadas e o consumo de ovos tenha crescimento no país, além de estudos relacionados à sensibilidade aos microrganismos e melhoramento genético (BARBIERI *et al.*, 2015; BERTECHINI, 2010; CASAGRANDE *et al.*, 2014; FREITAS NETO *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2013). Para Silva *et al.* (2018), a coturnicultura é uma escolha para produtores menores, pois acarreta o retorno do investimento no segundo ano de produção de ovos.

O Brasil é um dos mais importantes produtores de ovos de codornas (FAO, 2019), sendo o Espírito Santo, o estado com a maior produtividade (IBGE, 2019). A criação comercial é predominante nas terras capixabas, sendo observada treze estabelecimentos produtores e aproximadamente 10 milhões de faturamento anual (AVES, 2021). Apesar de existir relatos de infecções naturais causando colibacilose (ARENAS *et al.*, 1999; ISLAM *et al.*, 2016), coriza infecciosa (WAHYUNI *et al.*, 2018), clostridioses (RADI, 2004), adenovirose (SINGH *et al.*, 2016), aspergilose (OLSON, 1969) e enfermidades parasitárias (MONTE; CAVALCANTE; OLIVEIRA, 2018; SHAIKH; NAZ; BIRMANI, 2019; TEIXEIRA; TEIXEIRA-FILHO; LOPES, 2004). Observa-se na literatura maior densidade de pesquisas experimentais (BERTRAN *et al.*, 2013; GALIZA *et al.*, 2014; MOHAMED; HAFEZ, 2016; SHARAWI *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016).

Devido ao crescimento expressivo da coturnicultura, bem como o interesse de elucidar a susceptibilidade das codornas aos microrganismos e agrupar as informações encontradas até os dias atuais sobre a ocorrência de doenças nessas aves, este estudo tem por objetivo descrever

as principais enfermidades bacterianas e virais observadas em codornas, enfocando também atualidades e perspectivas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DA COTURNICULTURA NO BRASIL E NO MUNDO

Codornas pertencem à ordem galináceos, família Phasianidae e gênero *Coturnix*, a qual se originou na Ásia, Europa e norte da África. Inicialmente foi criada na China e Coreia, seguida do Japão onde houve a realização dos primeiros trabalhos envolvendo cruzamentos entre as codornas e criação racional na primeira década do século vinte. O resultado foi o surgimento da ave doméstica denominada *Coturnix coturnix japonica*, dando início à sua exploração comercial (MATOS, 2007; PASTORE; OLIVEIRA; MUNIZ, 2012). Além da codorna japonesa, com alta taxa de postura de ovos, tem-se a codorna americana (*Colinus virginianus*) e a europeia (*Coturnix coturnix coturnix*), sendo estas de maior peso corporal com sua produção voltada para a carne (MATA, 2018).

A criação tecnificada de codornas iniciou-se no Brasil em 1989, por uma empresa avícola no sul do país (SILVA *et al.*, 2012). Essa atividade tem se desenvolvido bastante nos últimos anos, devido ao uso de tecnologias atuais e de aplicação de recursos de baixo custo, se tornando um setor cada vez mais explorado entre os produtores (SILVA *et al.*, 2018). Diante disso, tem-se elevado mundialmente a ingestão de carne de codorna (SANTOS *et al.*, 2017).

Alguns países se sobressaem na produção e no consumo em larga escala de ovos de codorna como a China, Tailândia, Indonésia e Brasil, sendo o último considerado o quarto maior produtor (FAO, 2019). Além disso, essas aves também podem ser utilizadas como modelos de pesquisa e experimentação animal em áreas como genética, desenvolvimento embrionário, fisiologia e comportamento animal (MARQUES, 2009).

Conforme o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), em 2019 o número de codornas no Brasil foi de 17,4 milhões e a produção de ovos foi de 315,6 milhões de dúzias. A Região Sudeste se destaca por ser responsável pela maior produção de ambos os setores, em especial, por incluir dentro do seu território os principais estados produtores do país (Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo), perfazendo 63,5% das aves e 67,3% da produção de ovos no país.

Nesse contexto, o Espírito Santo se sobressaiu quanto ao crescimento desses setores ao atingir uma produção de 4,5 milhões de ovos e população de 3,8 milhões de codornas,

ultrapassando a média de São Paulo, demonstrando aumento de 10,0% e 14,9%, respectivamente. Neste caso, mais precisamente, a cidade de Santa Maria de Jetibá é a grande influenciadora do crescimento desse segmento na região (IBGE, 2019).

2.2 ENFERMIDADES BACTERIANAS

Antes de abordar as doenças bacterianas é importante comentar sobre o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), instituído pela Portaria nº 193 de 19 de Setembro de 1994, que apresenta várias funções, e entre elas, a principal é a gestão de enfermidades em aves. Neste documento, é descrito algumas doenças bacterianas em aves de notificação, como por exemplo micoplasmoses, salmonelose e clamidiose, que requerem notificação de qualquer caso confirmado (BRASIL, 1994). Ainda, alguns estados acrescentam outras enfermidades no controle oficial, sendo que o Espírito Santo realiza a vigilância da Laringotraqueíte Infecciosa Aviária por meio do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal (IDAF) (IDAFES, 2021).

Entretanto, não existe ainda um programa nacional voltado para a sanidade de codornas de maneira específica, e, portanto, as medidas de controle, diagnóstico e tratamentos estabelecidos no PNSA devem ser consideradas para as codornas, com ressalvas às características da própria espécie.

2.2.1 Salmonelose

A salmonelose é uma importante zoonose mundialmente distribuída, causada por bactérias do gênero *Salmonella*, que nas aves podem levar aos casos de tifo, paratifo e pulorose (BARROS; LIMA; STELLA, 2020). Apesar de ocorrer em codornas e ser extremamente relevante no que diz respeito às zoonoses, existem poucos trabalhos sobre o paratifo aviário nessa espécie. São vários sorovares de *Salmonella* e em sua maioria, não fermentam lactose, são móveis, flageladas e com formato de bastonetes curtos (1 a 2 µm) (FORSYTHE, 2013; MS, 2011; QUINN *et al.*, 2007). Porém, dois biovares de grande importância no que diz respeito à saúde aviária de maneira geral, e também para codornas, são exceções nesse quesito (flagelo), *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* (FORSYTHE, 2013; MS, 2011).

No mundo todo, a espécie de maior importância na veterinária de um modo geral é *S. enterica*. No Brasil, um estudo trabalhou com os principais sorotipos de salmonelas em aves, utilizando apenas 18 codornas (0,84% do total de aves), sendo, portanto, difícil generalizar esses resultados para a cunicultura nacional como um todo. Neste trabalho, os sorotipos

Gallinarum, Pullorum, Typhimurium, Heidelberg, Enteritidis e Infantis foram os mais frequentemente isolados (HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1997). Enquanto, um estudo mais recente no estado de São Paulo identificou *S. enterica* subespécie *enterica*; *S. Corvalis*; *S. Give*; *S. Lexington*; *S. Minnesota*; *S. Schwarzengrund*; *S. Rissen*; e *S. Typhimurium* de amostras de mecônio de filhotes de codornas com um dia de idade (FREITAS NETO *et al.*, 2013).

A infecção acontece principalmente por via oral, através da ingestão, mas também podem ocorrer através da mucosa do trato respiratório superior e conjuntiva. A transmissão pode ser vertical, mas normalmente ocorre de maneira horizontal, dependendo do sorovar, sendo as aves silvestres uma importante fonte de transmissão, bem como a via transovariana. É válido ressaltar que os microrganismos podem estar presentes na carcaça e nos ovos e ainda, é necessário destacar que a contaminação ambiental ocorre sempre pelas fezes de indivíduos infectados (QUINN *et al.*, 2007).

Os sinais clínicos do tifo aviário são semelhantes ao visto nas galinhas, porém, existem trabalhos que buscaram detalhar esses sinais clínicos em codornas japonesas no Brasil e para isso, inocularam experimentalmente *S. Gallinarum* em fêmeas com 23 semanas de idade. Os sinais clínicos começaram a surgir no quarto dia após a inoculação, sendo que foram semelhantes aos de galinhas, como apatia, prostração, eriçamento de penas e diarreia. No entanto, outros sinais clínicos também foram relatados nas codornas, como canto dos olhos fechados e relutância em se locomover, mesmo quando estimuladas (SILVA *et al.*, 2016).

Macroscopicamente, foram observadas na infecção experimental de *S. Gallinarum* em codornas japonesas hepatomegalia, esplenomegalia e hemorragia em baço (órgão mais afetado); atrofia de folículos ovarianos; e hemorragia ovariana (SILVA *et al.*, 2016).

Em relação ao tratamento, os antibióticos eram utilizados como aditivo em rações buscando a profilaxia, porém essa prática nos dias atuais é controversa. Isso porque essa medida exerce uma pressão seletiva, que pode acarretar em resistência bacteriana em longo prazo (GRANT; HASHEM; PARVEEN, 2016). Um trabalho isolou cepas de *Salmonella* com resistência a múltiplas drogas em codornas (HELM *et al.*, 1999), o que demonstra um risco perante tratamento profilático. Igualmente, a vacinação e o uso de antibióticos, como tratamento após a infecção instalada, também são debatidos. Assim, essas medidas dificultam o controle dos indivíduos infectados (SWAYNE *et al.*, 2013).

2.2.2 Clamidiose

A clamidiose em codornas é uma doença pouco relatada e causada pelo gênero *Chlamydia* que são bactérias Gram negativas (SWAYNE *et al.*, 2013).

Em relação ao quadro clínico, foram encontrados poucos trabalhos que detalharam a doença em codornas. Mas, em um estudo experimental que inoculou várias cepas de *Chlamydia psittaci* em codornas de 12 dias, foi observado que no segundo dia após a infecção, a cepa da pneumonia dos bezerros e a da pneumonia dos porcos, gerou quadro clínico da enfermidade. Os sinais observados foram angústia respiratória, diarreia, embotamento e penas eriçadas. A diarreia foi acompanhada por grande quantidade de muco até o quinto dia, período em que a diarreia começou a abrandar. Outras cepas como a de abortamento em cabras, aborto de ovelha e enterite infantil também apresentaram diarreia como sinal clínico, mas o quadro foi brando. E por fim a cepa da conjuntivite de bezerros não causou sinal clínico nas codornas nesse estudo (BATTA *et al.*, 1999).

Nesse mesmo estudo, as alterações macroscópicas ocorreram principalmente em trato respiratório, observando aerossaculite e congestão pulmonar associada a áreas focais de coloração branco acinzentada e consolidação nodular em alguns casos, e nos intestinos, caracterizada por enterite, mas apenas quando a infecção foi causada pela cepa da pneumonia dos bezerros ou pneumonia dos porcos (BATTA *et al.*, 1999). As alterações sofrem variações conforme a espécie da ave e conseqüentemente a espécie de *Chlamydia* spp. que estará infectando o indivíduo (SWAYNE *et al.*, 2013), que no caso das codornas, *C. psittaci* é a principal representante (BATTA *et al.*, 1999). As alterações microscópicas em codornas foram: congestão acentuada e infiltrado de células mononucleares em lâmina própria dos brônquios após dois dias de inoculação. No entanto, entre os dias cinco e sete pós inoculação, a intensidade da infecção se agravou, e nestes animais encontrou-se hiperplasia do epitélio bronquiolar. No dia dez, a amplitude das alterações patológicas havia diminuído, demonstrando congestão em todo o pulmão e presença de células mononucleares ao redor do brônquio (BATTA *et al.*, 1999).

Um aspecto importante é que existem cepas mais patogênicas e que aparecem de forma fulminante, levando rapidamente à morte. Essas cepas de *C. psittaci* altamente patogênicas, muitas vezes, aparecem em casos de estresse e erros de manejo (BATTA *et al.*, 1999; SWAYNE *et al.*, 2013).

O isolamento desse patógeno em culturas é difícil, sendo o diagnóstico de eleição a reação de cadeia em polimerase (PCR) (GERLACH, 1994).

O tratamento pode ser realizado com antibióticos como eritromicina, ceftriaxona, ampicilina, tetraciclina e doxiciclina, sendo que o tempo de tratamento é longo (45 dias) e o monitoramento do animal deve ser contínuo. No entanto, o tratamento tem custo elevado e pode trazer ainda mais prejuízos por conta dos óbitos, dessa maneira a prevenção é a melhor medida a ser empregada (GERLACH, 1994).

2.2.3 Pasteurelose

A pasteurelose em aves é causada principalmente pela bactéria *Pasteurella multocida*, que se apresenta principalmente como bacilo, mas por vezes, cocobacilos. É Gram negativa, imóvel e não tem capacidade de formar esporos (QUINN *et al.*, 2007; SWAYNE *et al.*, 2013). A bactéria é anaeróbica facultativa, oxidase positiva e frequentemente catalase positiva, sendo comensal das mucosas do trato respiratório superior de diversas espécies animais (QUINN *et al.*, 2007) como as codornas (GOTO *et al.*, 2001; ODUGBO *et al.*, 2004).

P. multocida muitas vezes causa a infecção em animais imunocomprometidos, podendo infectar as codornas, especialmente pela faringe e vias aéreas superiores, mas também pela conjuntiva e feridas cutâneas. Não foram encontrados estudos sobre a susceptibilidade das codornas em relação à doença, portanto, sabe-se que são passíveis de infecção e que essas ocorreram previamente, mas não se sabe as alterações ocasionadas nessa espécie de ave (SWAYNE *et al.*, 2013).

A virulência está ligada a vários fatores que envolvem a adesão na mucosa, as fímbrias e a fuga a fagocitose, que por sua vez está relacionada com a cápsula (QUINN *et al.*, 2007; SWAYNE *et al.*, 2013). Outros fatores importantes são as toxinas proteicas e as endotoxinas que podem ser responsáveis pelo estabelecimento do choque e consequentemente, a morte (QUINN *et al.*, 2007; SWAYNE *et al.*, 2013).

Especificamente em codornas japonesas, o relato de caso de infecção natural em um criatório, demonstrou que os sinais aparecem de forma aguda e disseminam-se rapidamente entre as codornas. As alterações incluíam depressão severa, inapetência, eriçamento de penas, prostração, desidratação rápida e morte em poucas horas (GLISSON *et al.*, 1989). Outro trabalho, também de infecção natural em codornas japonesas, corroborou com o estudo anterior, demonstrando que a doença ocorre na maioria dos casos em caráter hiperagudo ou agudo, sendo muitas vezes os animais encontrados mortos (ODUGBO *et al.*, 2004).

No que concerne às alterações macroscópicas, a maioria dos animais não possuíam lesão aparente, o que pode ser associado à velocidade de avanço do quadro clínico. Nos poucos

animais em que foram observadas lesões, foi relatado pequenas áreas pálidas multifocais em fígado e baço. Além disso, alguns animais apresentaram pulmão com coloração mais escura (GLISSON *et al.*, 1989), congestão generalizada, hepatomegalia, áreas multifocais de necrose em fígado e pulmão, petéquias e equimoses no epicárdio e fluido em pericárdio e peritônio (ODUGBO *et al.*, 2004).

As alterações microscópicas foram consistentes com septicemia como áreas multifocais de deposição de fibrina e regiões de necrose com infiltrado heterofílico em baço, necrose multifocal variando entre coagulativa e fibrinoide em fígado, pneumonia intersticial (GLISSON *et al.*, 1989), necrose de hepatócitos e bacteremia no coração, sangue, fígado, baço e rim (ODUGBO *et al.*, 2004).

O diagnóstico pode ser feito por inoculação de amostra suspeita em ratos, técnicas moleculares, ou, menos comumente, pelo isolamento da bactéria em cultura (RODRIGUES, 2011). Com relação ao tratamento, muitas vezes, os animais vêm a óbito antes de ser possível identificar a doença, portanto, é difícil empregar tratamento em casos agudos. Nos casos mais crônicos é possível tratar utilizando antibióticos como sulfa, tetraciclina, eritromicina, estreptomicina e penicilina. A prevenção utilizando medidas de boas práticas de manejo e biossegurança é essencial (RODRIGUES, 2011).

2.2.4 Outras doenças bacterianas

Este tópico tem por objetivo apresentar doenças bacterianas que são citadas a ocorrência em codornas, mas devido à pouca quantidade de estudos e de informação da doença para a espécie, serão abordadas de maneira pontual.

Uma dessas doenças que podem ocorrer em codorna, mas não é relatada com frequência, é a estreptococose (ALAMEEN, 2017), que é uma doença causada por bactérias do gênero *Streptococcus*, que são Gram-negativas e com formato cocoide. Esta bactéria pode aparecer isolada, em pares ou em cadeias curtas, sendo não formadora de esporo, anaeróbica facultativa e imóvel. Em aves, diversas espécies podem ser patogênicas e causar enfermidades, entre elas destacam-se por relatos de isolamento associado a doença em aves: *S. zooepidemicus*, *S. bovis*, *S. dysgalactiae*, *S. multans*, *S. pleomorphus*. Para que aconteça a infecção, as aves precisam passar por algum processo que leve ao comprometimento do sistema imune, como outra doença concomitante, e na maioria dos casos, alguma solução de continuidade, como feridas, umbigo aberto e perda da integridade da mucosa intestinal (SWAYNE *et al.*, 2013).

Outra doença importante, que acomete codornas (ALAMEEN, 2017) e todas as espécies de aves é a estafilococose. Essa doença é causada por diversas espécies, sendo *S. aureus* a mais importante. No geral, as espécies de bactérias que causam a estafilococose em aves são de formato cocoide e Gram-positivos (SWAYNE *et al.*, 2013). Essas bactérias também têm importância para saúde pública, visto que, muitas vezes são isoladas em ovos (PARI, 2017) e carcaças de codornas (FERNANDES *et al.*, 2009).

A campilobacteriose, por sua vez, é uma doença emergente de grande importância para a saúde pública, sendo considerada uma das gastroenterites bacterianas de origem alimentar mais notificadas nos países desenvolvidos. Em aves a campilobacteriose pode se manifestar como uma doença clínica que gera lesões principalmente em fígado e intestinos e na maior parte dos casos clínicos, apresenta diarreia (SWAYNE *et al.*, 2013). As codornas fazem parte das aves suscetíveis à doença (WAGENAAR; MEVIUS; HAVELAAR, 2006). Um estudo encontrou que 100% das espécies isoladas nas codornas, eram *C. jejuni* e que estas aves, possuíam resistência frente a alguns antibióticos, com destaque para a ampicilina (MIRZAIE *et al.*, 2011).

A colibacilose é outra doença importante que acontece em aves, inclusive em codornas. Causada pela *Escherichia coli*, pertencente à família Enterobacteriaceae, apresenta-se normalmente móvel, com flagelos peritríquios, e por vezes, com fímbrias. Existem diversos patótipos que são associados a colibacilose e em aves é comum a APEC (*E. coli* patogênica para aves). Cabe ressaltar ainda que essas bactérias são bacilos não formadores de esporos (SWAYNE *et al.*, 2013) e que vem ganhando destaque como importante patógeno zoonótico de transmissão alimentar, sendo responsável pela síndrome da colite hemolítico-urêmica hemorrágica (QUINN *et al.*, 2007). *E. coli* causa lesão principalmente no trato respiratório (SWAYNE *et al.*, 2013) e em codornas foi relacionada ocasionando infecção de saco vitelínico, aerossaculite, peritonite, onfalite, celulite, coligranuloma e enterite (DHO-MOULIN, 1999).

Na Espanha, um surto de colibacilose pela cepa *E. coli* O165 em codornas resultou em 90% de mortalidade. Os animais apresentaram depressão severa entre o quarto e sétimo dia, sem demonstrar outros sinais clínicos significativos. Na necropsia obtiveram poucos achados, todos os animais apresentaram congestão generalizada, com alguns apresentando ligeira esplenomegalia e espessamento da mucosa intestinal (ARENAS *et al.*, 1999).

Em Bangladesh, um estudo avaliou as doenças mais prevalentes em codornas japonesas, e a colibacilose foi a mais presente dentre as doenças bacterianas com 15,34% de taxa de prevalência. Os sinais clínicos apresentados pelas aves foram letargia, desidratação, depressão e diminuição do ganho de peso. As lesões observadas durante o exame necroscópico englobam

espessamento dos sacos aéreos, exsudação caseosa nas superfícies respiratórias e congestão em fígado e baço. As alterações microscópicas em pulmão envolveram a presença de infiltrado heterofílico, exsudação fibrinosa e coloração rósea anormal ao redor dos vasos. Enquanto o fígado, em alguns animais apresentava congestão difusa grave e no geral estavam infiltrados por heterófilos, linfócitos, macrófagos, com destaque para essas infiltrações em áreas portais (ISLAM *et al.*, 2016).

As boas práticas de manejo e medidas de biossegurança são a melhor forma de controle da colibacilose, e em caso de necessidade de realização de tratamento com antibiótico, os testes de sensibilidade ao antibiótico são uma boa ferramenta para auxílio na escolha do medicamento (EL-GHANY, 2019).

A coriza infecciosa é uma enfermidade do trato respiratório superior que também é relatada em codornas. Essa doença é causada pela bactéria *Avibacterium paragallinarum* e os sinais clínicos incluem rinite, edema ou inchaço facial, anorexia e crescimento retardado em aves jovens, sendo baixa a mortalidade pela doença, mas grandes os prejuízos (SWAYNE *et al.*, 2013). Apesar das codornas serem suscetíveis, poucos foram os trabalhos envolvendo a espécie e a maior parte desses trabalhos encontrados sobre coriza infecciosa em codornas aborda o isolamento, identificação e testes de sensibilidades aos antibióticos (THENMOZHI; MALMARUGAN, 2013; WAHYUNI *et al.*, 2018).

A clostridiose, que se caracteriza principalmente por enterites ulcerativas, é causada por bactérias do gênero *Clostridium*, sendo várias as espécies patogênicas para codornas. *C. colimun* é comum em codornas na Europa, sendo essa espécie mais suscetível que as demais aves (COOPER *et al.*, 2013). Um estudo isolou *C. perfringes* do intestino de codorna Bobwhite com sinais clínicos de anorexia, diarreia, desidratação, perda de peso e morte aguda. Porém, também foram isolados outros microrganismos, como *E. coli*, e alguns parasitas, como *Eimeria* spp. Nesses animais, foram encontradas ulcerações e perfurações intestinais, peritonite e hepatite necrosante multifocal (RADI, 2004).

A micoplasmose é uma doença causada por pequenos procariontes, que medem de 200-300 nm, não possuem parede celular, são Gram-negativos e aeróbios facultativos (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Sobre a sobrevivência ambiental, são sensíveis, sendo suscetíveis à dessecação, aquecimento, detergentes e desinfetantes (QUINN *et al.*, 2007). As duas principais espécies que infectam aves são *M. gallisepticum* e a *M. synoviae* (SWAYNE *et al.*, 2013).

A fonte de infecção mais comum da micoplasmose são aves doentes ou portadoras, sendo que a principal porta de entrada é o trato respiratório. A transmissão vertical é a de maior importância, mas também pode ocorrer por via horizontal (NASCIMENTO *et al.*, 2005). Uma

questão relevante que se relaciona a patogenicidade, é que na maior parte dos casos a doença é crônica e muitas vezes os animais são subclínicos (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

Em relação às codornas, um estudo buscou isolar espécies causadoras de micoplasmose de seis espécies de aves diferentes. Nele, foi isolado em codornas e em seus embriões principalmente *M. gallisepticum*, mas também *M. synoviae*, o que foi condizente com os achados clínicos nessas aves, que apresentavam sinais respiratórios, inchaço de seios nasais, da articulação do jarrete e das “almofadas” dos pés. Foi realizado rastreamento e detectou-se contato com um rebanho de galinhas infectadas (BENÇINA; DORRER; TADINA, 1987).

O diagnóstico da micoplasmose em aves está fundamentado em território nacional pela Normativa nº 44 do PNSA. As provas que podem ser utilizadas são aglutinação rápida em placa (SAR), aglutinação lenta em soro (SAL), sendo que as duas podem ser realizadas com soro ou gemas de ovos embrionados. Além de provas como inibição da hemaglutinação (HI) e ELISA. As provas de aglutinação funcionam como triagem, e em casos positivos é realizado HI ou ELISA para confirmação. Porém, o diagnóstico conclusivo pelo PNSA é via diagnóstico micoplasmológico, que pode ser a realização do isolamento do micoplasma em meio de cultura ou a técnica da PCR (BRASIL, 2001).

Com relação ao tratamento da micoplasmose, o fato desse agente não possuir parede celular, também impede que alguns antimicrobianos que agiriam nessa estrutura, como a penicilina, consigam ser eficientes frente a esse microrganismo (SILVA, 2019).

2.3 ENFERMIDADES VIRAIS

2.3.1 Adenovírus

A família Adenoviridae possui estrutura icosaédrica com uma única molécula linear de DNA de fita dupla. Além disso, é composta por dois gêneros, *Mastadenovirus* e *Aviadenovirus*, sendo o segundo o foco do presente estudo. O Adenovírus aviário é frequentemente isolado a partir de aves saudáveis ou após doenças respiratórias e geralmente está presente concatenado à bronquite em codornas e à hepatite por corpúsculos de inclusão (QUINN *et al.*, 2007).

A infecção é extremamente comum em criações de aves, sendo a maioria subclínica ou associada a uma doença relativamente moderada. Os adenovírus são moderadamente estáveis no meio ambiente, no qual podem sobreviver por muitas semanas (QUINN *et al.*, 2007). As codornas infectam-se com este vírus, pela via respiratória ou oro-fecal das cepas virais presentes no ambiente (MOHAPATRA *et al.*, 2014; QUINN *et al.*, 2007), apresentam quadros de

distúrbios respiratórios com ruído de sucção e engasgo (SINGH *et al.*, 2016), tamanho reduzido do ovo e alteração na casca, como amolecimento e fina (MOHAPATRA *et al.* 2014).

Os achados macroscópicos em codornas positivas para adenovírus aviário incluíram: muco na traqueia, congestão pulmonar, saculite aérea caseosa, acúmulo de uratos brancos alcalinos em órgãos internos, focos necróticos no fígado e esplenomegalia. Quanto aos achados microscópicos em codornas, tem-se rinite fibrino-heterofílica, bronquite heterofílica, traqueíte aguda e pneumonia intersticial. Os brônquios apresentavam também descamação e necrose e o epitélio brônquico exibiu cariomegalia e corpúsculos de inclusão intranucleares basofílicos (SINGH *et al.*, 2016).

Além disso, Mohapatra *et al.* (2014), utilizando-se do vírus EDS-76, constatou que este causou alterações histopatológicas em útero, baço, vagina e ovário em codornas japonesas. O útero apresentou congestão, edema, infiltrado de células mononucleares na mucosa, hiperplasia focal do epitélio superficial e picnose dos núcleos das células glandulares. O baço continha congestão, folículos rompidos, grandes linfoblastos nos folículos e cariorrexe de macrófagos na polpa vermelha. No trato reprodutor foram observados infiltrado de células mononucleares na submucosa e na camada muscular, bem como, a formação do folículo linfóide na submucosa. Enquanto em ovário ocorreu infiltrado de células mononucleares, as quais surgiram após o 6º dia pós infecção, porém entre os dias 15-18 esses folículos foram distorcidos e colapsados.

O diagnóstico de adenovírus aviário pode ser realizado por meio de PCR, método Beta (soro diluído versus vírus constante) e teste de inibição de hemaglutinação (FÁBIO; ROSSINI, 2009). Tendo em vista a inexistência de tratamentos consolidados para adenovírus em codornas, indica-se a prevenção por meio da inserção de minerais e vitaminas na água do animal com a finalidade de aumentar a imunidade das codornas (SINGH *et al.*, 2016).

2.3.2 Influenza aviária

Os vírus causadores da influenza aviária são pertencentes à família ortomixovírus, são esféricos ou pleomórficos, envelopados, são RNA linear de fita simples e sentido negativo e apresentam replicação no núcleo celular. As cepas dessa família são diferenciadas de acordo com as estruturas proteicas pertencentes ao patógeno, sendo as duas principais a hemaglutinina (H), a qual realiza a ligação do vírus, bem como, a fusão do envelope, e a neuraminidase (N), responsável pela clivagem dos receptores virais e por possibilitar tanto a entrada do vírus no meio intracelular como a liberação dos vírions de células infectadas. Além disso, as cepas

responsáveis pela manifestação da influenza aviária em geral são os subtipos que expressam determinantes H5 e H7 (QUINN *et al.*, 2007).

A influenza aviária é uma zoonose que nunca foi notificada em território brasileiro apesar da doença ser difundida pelo mundo. Neste sentido, encontra-se incluída no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), objetivando, assim, combate eficiente caso ocorram pontos de foco, a fim de minimizar perdas econômicas (MAPA, 2021; OIE, 2018).

Embora existam estudos citando a ausência de sinais clínicos evidentes, ou mesmo mortes súbitas em codornas acometidas pelo vírus da influenza aviária (JEONG *et al.*, 2009), segundo BERTRAN *et al.* (2013) essas aves apresentam sinais clínicos inespecíficos, tais como: letargia, anorexia e penas eriçadas, além disso, nos casos mais graves ocorrem disfunções neurológicas, como incoordenação, torcicolo, andar em círculos, tremores da cabeça, inclinação da cabeça e opistótono. As codornizes europeias infectadas experimentalmente com cepas de alta patogenicidade (AP), ou seja, VIA de AP apresentaram na macroscopia petéquias multifocais na mucosa da junção proventrículo-moela, esplenomegalia moderada com palidez ou manchas parenquimatosas e lesões pancreáticas caracterizadas por necrose multifocal e atrofia tímica (BERTRAN *et al.*, 2013).

O diagnóstico para confirmação da presença viral pode ser realizado via cultivo em ovos embrionados (COE), imunodifusão em ágar gel (AGP), teste de inibição de hemaglutinação (HI), método Beta (vírus constante versus soro diluído), dentre outros, como ELISA e PCR (FÁBIO; ROSSINI, 2009).

A prevenção da gripe aviária em codornas ocorre principalmente pela vacinação combinada com a implementação de medidas de biossegurança por meio da limpeza e desinfecção completas e da restrição dos movimentos de pessoas nas granjas (SARKADI *et al.*, 2013).

2.3.3 Doença de Newcastle

A doença de newcastle é causada pelo vírus da doença de Newcastle (VDN), também conhecido como paramixovírus aviário 1 (PMVA-1), que são esféricos ou pleomórficos, envelopados de RNA linear de fita simples e sentido negativo (QUINN *et al.*, 2007). No estudo realizado por Islam *et al.* (2016) em 476 codornas, as doenças virais isoladas representaram 25,21 % do total, sendo que 11,5 % eram VDN, caracterizada pela maior prevalência.

No Brasil o último caso confirmado de VDN ocorreu em 2006 nos estados do Amazonas, Mato Grosso e Rio Grande do Sul em criações de subsistência (MAPA, 2021).

Ademais, caracteriza-se por zoonose que em humanos pode acarretar conjuntivite transitória (QUINN *et al.*, 2007).

A patogenicidade do vírus da doença de Newcastle (VDN) em codornas depende de três principais fatores: cepa, dose e rota de administração (OLADELE *et al.*, 2008). Codornas japonesas costumam agir como carreadoras do VDN, pois são mais resistentes à doença quando comparadas a frangos (GOWTHAMAN *et al.*, 2013). Assim, recomenda-se a vacinação desses animais para a prevenção quanto a transmissão para outras aves comerciais (SHARAWI *et al.*, 2015). O vírus é relativamente estável no ambiente, sendo capaz de se manter em carcaças contaminadas bem como objetos e é eliminado por todas as excreções e secreções produzidas pelo animal. A transmissão geralmente ocorre por meio de aerossóis ou ingestão de líquidos ou alimentos previamente contaminados (QUINN *et al.*, 2007).

Os sinais clínicos apresentados por codornas contaminadas apresentam-se como diminuição da produção de ovos, apetite reduzido, fraqueza, leve dificuldade respiratória e sinais neurológicos como torcicolo e movimentação descoordenada. Cabe salientar que grande parte dos animais podem apresentar diarreia hemorrágica esverdeada (GOWTHAMAN *et al.*, 2013).

A inoculação da cepa velogênica de VDN em codornas japonesas de 3-6 semanas induziu diferentes taxas de mortalidade de acordo com a via de inoculação, sendo 100 % por via óculo-nasal (MOHAMED; HAFEZ, 2016) e 40 % por via intramuscular (SHARAWI *et al.*, 2015).

Em um estudo de Susta *et al.* (2018), codornas japonesas com duas semanas de idade foram inoculadas pela via óculo-nasal com quatro cepas virulentas de VDN de diferentes genótipos. Os resultados indicaram doença leve a moderada com mortalidade variando de 28 % a menos de 10 % e sinais neurológicos com encefalite supurativa. Além disso, a replicação do vírus foi moderada nas aves inoculadas, mas mínima nas aves de contato. Aves inoculadas com cepas de VDN originadas de codornas apresentaram alta disseminação do vírus, enquanto a alta transmissão do vírus ocorreu em aves inoculadas com vírus originado de galinhas. Mazlan *et al.* (2017) comprovaram a suscetibilidade de codornas japonesas à infecção experimental com genótipo VII VDN com base no desenvolvimento de sinais clínicos específicos, detecção do antígeno do vírus nos tecidos e aumento nos títulos de anticorpos hemaglutinantes.

Macroscopicamente tem-se congestão generalizada dos órgãos sem significativas alterações no trato respiratório, atrofia e manchas difusas em baço, úlceras intestinais hemorrágicas e ulcerações em pró-ventrículo (GOWTHAMAN *et al.*, 2013).

Histologicamente, observa-se no sistema nervoso, encefalomielite não supurativa, gliose, edema perineuronal, retração neuronal e necrose. Em fígado e rins ocorre congestão, hemorragias e necrose multifocal. Em baço ocorre depleção linfóide e nos intestinos há descamação da mucosa, ingurgitamento vascular nas pontas das vilosidades, hemorragias severas e infiltrado de células mononucleares na lâmina própria (GOWTHAMAN *et al.*, 2013).

O diagnóstico para confirmação da presença viral pode ser realizado via cultivo em ovos embrionados (COE), imunodifusão em ágar gel (AGP), teste de inibição de hemaglutinação (HI), método Beta (vírus constante versus soro diluído), dentre outros, como ELISA e PCR (FÁBIO; ROSSINI, 2009).

A doença de Newcastle não possui tratamento consolidado em aves (OIE, 2013) por isso é listada na Instrução Normativa nº 50 de 24 de setembro de 2013 como doença de notificação obrigatória e faz parte do Plano Nacional de Sanidade Avícola - PNSA (BRASIL, 2013).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Assim como em outras aves, as codornas também são sensíveis a diversos patógenos causadores de alterações importantes nos sistemas orgânicos e que influenciam diretamente na qualidade de vida e produtividade dessas aves, acarretando em perdas econômicas. No Brasil, as pesquisas para determinação das alterações patológicas ocasionadas nas enfermidades frequentes na coturnicultura, ainda são limitadas. Dessa forma, é possível perceber que a maior densidade de informações e conseqüentemente as doenças de maior ocorrência, é estabelecida por estudos estrangeiros, sendo necessários mais estudos voltados para a coturnicultura brasileira. Apesar das doenças, sinais clínicos, alterações anatomopatológicas da maioria das doenças serem semelhantes a outras aves de produção, como galinhas, é essencial estar atento a particularidades de cada espécie correlacionando com o ciclo produtivo, seja de ovos ou de carne.

4 REFERÊNCIAS

ALAMEEN, S. O. M. **Study of coccidiosis in quail in Khartoum State-Sudan**. 2017. 48 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Preventiva, College of Veterinary Science, University of Bahri, Bahri, 2017.

ARENAS, A. *et al.* Outbreak of septicaemic colibacillosis in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 46, n. 6, p. 399-404, 1999.

AVES (ASSOCIAÇÃO DOS AVICULTORES DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO). **Perfil da avicultura capixaba**. Marechal Floriano: AVES, 2021. Disponível em: <<https://www.associacoes.org.br/aves/perfil-da-avicultura>>. Acesso em: 25 mai. 2021.

BARBIERI, A. *et al.* Genetic parameters for body weight in meat quail. **Poultry Science**, v. 94, n. 2, p. 169-171, 2015.

BARROS, I. M.; LIMA, T. F.; STELLA, A. E. Salmonelose aviária e saúde pública: atualidades e seu controle no Brasil. **Enciclopédia Bioesfera**, v. 17, n. 32, p. 458-473, 2020.

BATTA, M. K. *et al.* Experimental studies of chlamydiosis in japanese quails. **Zentralblatt Für Bakteriologie**, v. 289, n. 1, p. 47-52, 1999.

BENÇINA, D.; DORRER, D.; TADINA, T. *Mycoplasma* species isolated from six avian species. **Avian Pathology**, v. 16, n. 4, p. 653-664, 1987.

BERTECHINI, A. G. Situação atual e perspectivas para a coturnicultura no Brasil. In: IV SIMPÓSIO INTERNACIONAL E III CONGRESSO BRASILEIRO DE COTURNICULTURA, n. 4, 2010. Lavras: **Anais...** Lavras - MG, 2010. p. 1-6.

BERTRAN, K. *et al.* Pathobiology and transmission of highly and low pathogenic avian influenza viruses in European quail (*Coturnix coturnix*). **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 1-11, 2013.

BRASIL. Instrução normativa nº 44 de 23 de agosto de 2001. **Diário Oficial [da] União**. Brasília, 24 de ago. 2001, Seção I, p. 68-70.

BRASIL. Instrução normativa nº 50 de 24 de setembro de 2013. **Diário Oficial [da] União**. Brasília, 24 de set. 2013, Seção I, p. 47.

BRASIL. Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994. **Diário Oficial [da] União**. Brasília, DF, 22 de set. 1994, Seção I. p. 4.

CASAGRANDE, R. A. *et al.* Fowl typhoid (*Salmonella Gallinarum*) outbreak in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Avian Diseases**, v. 58, n. 3, p. 491-494, 2014.

COOPER, K. K. *et al.* Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 3, p. 314-327, 2013.

DHO-MOULIN, M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **BMC Veterinary Research**, v. 30, n. 3, p. 299-316, 1999.

EL-GHANY, W. A. A. A comprehensive review on the common emerging diseases in quails. **Journal of World's Poultry Research**, v. 9, n. 4, p. 160-174, 2019.

FÁBIO, J. D.; ROSSINI, L. L. Coleta e envio de material para laboratório. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. *et al.* **Doenças das aves**. 2 ed. Campinas: Facta, 2009. p. 83-96.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS).

Production eggs, other bird, in shell. Roma: FAO, 2019. Disponível em:

<<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL/visualize>>. Acesso: 25 mai. 2020.

FERNANDES, E. F. T. S. *et al.* Contaminação por *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., coliformes fecais e termotolerantes em carcaças de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) comercializados no município do Recife-PE. **Medicina Veterinária**, v. 3, n. 2, p. 9-14, 2009.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos.** 2. ed. Porto Alegre: Artimed. 2013. 607p.

FREITAS NETO, O. C. *et al.* *Salmonella* spp. in meat-type quails (*Coturnix coturnix coturnix*) in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 15, n. 3, p. 277-281, 2013.

GALIZA, G. J. N. *et al.* Utilização de três métodos imuno-histoquímicos na detecção de aspergilose e zigomicose em animais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 7, p. 637-642, 2014.

GERLACH, H. *Chlamydia*. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G. J; HARRISON, L. R. **Avian medicine: principles and application.** Florida: Wingers, 1994, p. 984- 996.

GLISSON, J. R. *et al.* *Pasteurella multocida* infection in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Avian Diseases**, v. 33, n. 4, p. 820-822, 1989.

GOTO, Y. *et al.* Isolation of *Pasteurella multocida* durin an outbreak of infectious septicemia in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 9, p. 1055-1056, 2001.

GOWTHAMAN, V. *et al.* Natural outbreak of Newcastle disease in turkeys and Japanese quails housed along with chicken in a multi-species poultry farm in Northern India. **Advances in Animal Veterinary Science**, v. 1 n. 3, p. 17-20, 2013.

GRANT, A.; HASHEM, F.; PARVEEN, S. *Salmonella* and *Campylobacter*: antimicrobial resistance and bacteriophage control in poultry. **Food Microbiology**, v. 53, [S/N], p. 104-109, 2016.

HELM, J. D. *et al.* Multiple drug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 and DT104b isolated in bobwhite quail (*Colinus virginianus*). **Avian Diseases**, v. 43, n. 4, p. 788-791, 1999.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 55-62, 1997.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Pesquisa da pecuária municipal.** Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em:

<<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2019>>. Acesso em: 19 mai. 2021.

IDAFES (INSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA E FLORESTAL DO ESPÍRITO SANTO). **Sanidade avícola**. Vitória: IDAFES, 2021. Disponível em <<https://idaf.es.gov.br/sanidade-avicola>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

ISLAM, T. *et al.* Incidence of diseases in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) with special reference to bacterial and viral diseases in some selected areas of Bangladesh. **Asian-Australasian Journal of Bioscience and Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 410-418, 2016.

JEONG, O. M. *et al.* Experimental infection of chickens, ducks and quails with the highly pathogenic H5N1 avian influenza virus. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 1, p. 53-60, 2009.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Influenza aviária (IA)**. Brasília: MAPA, 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/influenza-aviaria-ia>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Doença de Newcastle**. Brasília: MAPA, 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/doenca-de-newcastle-dnc>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

MARQUES, D. S. **Polimorfismos no gene do hormônio do crescimento em linhagens de codorna (*Coturnix japonica*) e sua associação com características de desempenho**. 2009. 73 f. Dissertação (Mestre em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Centro de Ciência Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

MATA, Y. D. **Análise hematológica de codornas europeias alimentadas com diferentes níveis de moringa (*Moringa oleifera*)**. 2018. 42 f. Monografia (Bacharel em Medicina Veterinária) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2018.

MATOS, E. H. S. F. **Dossiê técnico – criação de codornas: centro de apoio ao desenvolvimento tecnológico da Universidade de Brasília**. Brasília, UNB, 2007. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MTky>>. Acesso em: 01 jun. 2021.

MAZLAN, L. F. *et al.* The positive expression of genotype VII Newcastle disease virus (Malaysian isolate) in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*), **Veterinary World**, v. 10, n. 5, p. 542-548, 2017.

MIRZAIE, S. *et al.* *Campylobacter* occurrence and antimicrobial resistance in samples from ceca of commercial turkeys and quails in Tehran, Iran. **International Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 9, p. 338-342, 2011.

MOHAMED, M. A.; HAFEZ, M. S. The susceptibility of Japanese quails to the infection with chicken originated Newcastle disease virus. **Journal of Advanced Veterinary Research**, v. 6, n. 1, p. 37-43, 2016.

- MOHAPATRA, N. *et al.* Egg drop syndrome-76 (EDS-76) in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*): an experimental study revealing pathology, effect on egg production/quality and immune responses. **Pakistan Journal of Biological Science**, v. 17, n. 6, p. 821-828, 2014.
- MONTE, G. L. S.; CAVALCANTE, D. G. OLIVEIRA, J. B. S. Parasitic profiling of Japanese quails (*Coturnix japonica*) on two farms with conventional production system in the Amazon region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 5, p. 847-851, 2018.
- MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE). **Manual técnico de diagnóstico laboratorial da *Salmonella* spp.** Brasília: MS, 2011. 64p.
- NASCIMENTO, E. R. *et al.* Avian mycoplasmosis update. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2005.
- ODUGBO, M. O. *et al.* Pasteurellosis in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) caused by *Pasteurella multocida multocida* A:4. **The Veterinary Record**, v. 155, n. 3, p. 90-91, 2004.
- OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH). **Newcastle disease: aetiology epidemiology diagnosis prevention and control references.** Paris: OIE, 2013. Disponível em: <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/NEWCASTLE_DISEASE.pdf>. Acesso em: 19 mai. 2021.
- OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH). **Situation report for avian influenza.** Paris: OIE, 2018. Disponível em: <<https://www.oie.int/en/disease/avian-influenza/>>. Acesso em: 19 mai. 2021.
- OLADELE, S. B. *et al.* Clinico-pathological features of Newcastle disease in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) infected with Newcastle disease virus Kudu 113 strain. **International Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 2, p. 165-168, 2008.
- OLSON, L. D. Case report-aspergillosis in Japanese quail. **Avian Diseases**, v. 13, n. 1, p. 225-227, 1969.
- PARI, K. C. **Presencia de coliformes, *E. coli* y *Staphylococcus aureus* em huevo cocido de codorniz (*Coturnix coturnix*) y la relación con las condiciones sanitaria de puestos de venta ambulatoria de los mercados del distrito de Santa Anita.** 2017. 133 f. Monografía (Bacharel em Química Farmacêutica e Bioquímica) – Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, Universidad Inca Garcilaso de la Veja, Lima, 2017.
- PASTORE, S. M.; OLIVEIRA, W. P. de; MUNIZ, J. C. L. Panorama da coturnicultura no Brasil. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 9, n. 6, p. 2041-2049, 2012.
- QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** Porto Alegre: Artimed. 2007. 512p.
- RADI, Z. A. An epizootic of combined *Clostridium perfringes*, *Eimeria* spp. and *Capillaria* spp. enteritis and *Histomonas* spp. *hapatitis* with *Escherichia coli* septicemia in bobwhite

quails (*Colinus virginianus*). **International Journal of Poultry Science**, v. 3, n. 7, p. 438-441, 2004.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasma*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

RODRIGUES, É. E. **Avaliação da resistência antimicrobiana e pesquisa de genes de virulência em amostras de *Pasteurella multocida* isoladas em aves**. 2011. 34 f. Monografia (Bacharel em Medicina Veterinária) - Bacharel em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SANTOS, J. S. *et al.* Farelo de palma na alimentação de codornas. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 14, n. 3, p. 5093-5099, 2017.

SARKADI, J. *et al.* Protection of Chinese painted quails (*Coturnix chinensis*) against a highly pathogenic H5N1 avian influenza virus strain after vaccination. **Archives of Virology**, v. 158, n. 12, p. 2577–2581, 2013.

SHAIKH, F.; NAZ, S.; BIRMANI, N. A. Prevalence of *Chewing lice* (Phthiraptera: Insecta) from common quail *Coturnix coturnix* (Aves: Galliformes: Phasianidae) from Jamshoro and Hyderabad, Sindh Pakistan. **Punjab University Journal of Zoology**, v. 34, n. 1, p. 17-20, 2019.

SHARAWI, S. *et al.* Experimental infection of quail by NDV and its immune response to vaccination. **Benha Veterinary Medical Journal**, v. 29, n. 2, p. 218-224, 2015.

SILVA, A. F. *et al.* Coturnicultura como alternativa para aumento de renda do pequeno produtor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 3, p. 913-920, 2018.

SILVA, J. H. V. *et al.* Exigências nutricionais de codornas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 775-790, 2012.

SILVA, M. F. B. **Prevalência de micoplasmose em galinhas caipiras e a proximidade com a avicultura industrial**. 2019. 28 f. Monografia (Bacharel em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

SILVA, R. C. da R. *et al.* Avaliação dos sinais clínicos em codornas japonesas (*Coturnix coturnix*) infectadas experimentalmente com *Salmonella Gallinarum*. **Acta Veterinária Brasília**, v. 10, n. 3, p. 253-257, 2016.

SINGH, A. *et al.* Molecular characterization of quail bronchitis virus isolated from Bobwhite quail in Minnesota. **Poultry Science**, v. 95, n. 12, p. 2815-2818, 2016.

SUSTA, L. *et al.* Newcastle disease virus infection in quail. **Veterinary Pathology**, v. 55, n. 5, p. 682-692, 2018.

SWAYNE, D. E. *et al.* **Diseases of poultry**. 13. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2013. 1394p.

- TEIXEIRA, B. B. *et al.* Desempenho de codornas de corte submetidas a diferentes níveis de proteína bruta e energia metabolizável. **Ciência Rural**, v. 43, n. 3, p. 524-529, 2013.
- TEIXEIRA, M.; TEIXEIRA-FILHO, W. L., LOPES, C.W. G. Coccidiosis in Japanese quails (*Coturnix japonica*) characterization of a naturally occurring infection in a commercial rearing farm. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 6, n. 2, p. 129 -134, 2004.
- THENMOZHI, V.; MALMARUGAN, S. Isolation, identification and antibiogram pattern of *Avibacterium paragallinarum* from japanese quails . **Indian Journal of Veterinary and Animal Sciences Research**, v. 9, n. 4, p. 253-258, 2013.
- VIOLA, T. H. *et al.* **Perguntas e respostas sobre criação de galinhas e codornas na agricultura familiar do Meio-Norte**. 1. ed. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2018. 72p.
- WAGENAAR, J. A.; MEVIUS, D. J.; HAVELAAR, A. H. *Campylobacter* in primary animal production and control strategies to reduce the burden of human campylobacteriosis. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 25, n. 2, p. 581-594, 2006.
- WAHYUNI, A. E. T. H. *et al.* Isolation, identification, and serotyping of *Avibacterium paragallinarum* from quails in Indonesia with typical infectious corysa disease symptoms. **Veterinary World**, v. 11, n. 4, p. 519-524, 2018.

Capítulo 7

Uma abordagem sobre leptospirose bovina no Brasil



Gabriel do Nascimento Moulin¹
Izabelle Pereira de Lacerda²
Livia Martino Duarte³
José de Oliveira Carvalho⁴

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: gabriel.n.moulin@hotmail.com

² Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: izabellelacerda@hotmail.com

³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: livia.m.duarte@edu.ufes.br

⁴ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: joseocneto@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A viabilidade econômica da pecuária leiteira é decisiva para a manutenção e o crescimento da atividade, sendo que esta viabilidade econômica está relacionada a bons índices zootécnicos de produção e reprodução. A eficiência reprodutiva do rebanho está diretamente relacionada à sua condição nutricional, sanidade e a bom manejo reprodutivo. Dentre estes, a sanidade animal ocupa posição de destaque, uma vez que, até 50% das falhas reprodutivas na pecuária bovina podem ser consideradas de origem infecciosa como a leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarreia viral bovina (BVD), campilobacteriose, neosporose (ALFIERI; ALFIERI, 2017).

O agente causador da leptospirose é uma bactéria espiroqueta móvel do gênero *Leptospira* (GIRIO; LEMOS, 2007), sendo considerada uma antroponose que possui distribuição mundial de forma endêmica, a qual pode apresentar curso agudo ou crônico, acometendo mamíferos, aves, anfíbios, peixes e répteis (PICARDEAU, 2017). Em propriedades leiteiras, as vacas devem ser inseminadas e tornarem-se gestantes dentro de um período restrito de tempo. Entretanto, com a presença da leptospirose no rebanho, pode haver atraso na concepção e/ou abortos (PASQUALOTTO; SEHNEM; WINK, 2015), assim como levar ao nascimento de bezerros imunodeficientes e diminuição temporária da produção leiteira (FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Desta forma, a rentabilidade e viabilidade econômica das propriedades podem ser comprometidas, uma vez que as mesmas necessitam de um bom manejo reprodutivo e partos regulares para garantir o sucesso econômico.

Alguns fatores, como climáticos e edáficos, podem interferir diretamente na sobrevivência de microrganismos, podendo alterar o comportamento epidêmico de doenças. Para o desenvolvimento da *Leptospira*, condições como temperatura, pH e umidade do solo podem influenciar diretamente na sua proliferação. Sendo assim, a incidência da leptospirose é comum durante e após o período das águas, por sofrer influência do regime hídrico e da capacidade do solo em reter água (PELLEGRIN *et al.*, 1999).

Portanto, esta revisão de literatura tem como objetivo abordar aspectos relacionados a leptospirose em rebanhos bovinos, detalhando as características e particularidades do agente, descrever sua soroprevalência, considerando os principais fatores de risco que favorecem a distribuição e disseminação da doença nos rebanhos brasileiros.

2 HISTÓRICO DA DOENÇA

A primeira descrição da leptospirose foi feita em 1886 em humanos, por Adolf Weil. O médico observava em seus pacientes sintomas como icterícia, esplenomegalia, erupções cutâneas, conjuntivites e disfunções renais, nomeando-a como “Doenças de Weil” (DEWES, 2017). Em 1907 foi observado a *Leptospira* em um corte de tecido renal, sendo que o agente somente foi cultivado e caracterizado com sucesso em 1915. Posteriormente, em 1917 a *Leptospira* foi isolada pela primeira vez do organismo de um rato, verificando-se a importância dos roedores como animais reservatórios e vetores da doença (LELITSCEWA *et al.*, 2018).

No Brasil, a leptospirose bovina foi reconhecida pela primeira vez no Pará, em 1917. No mesmo ano foi descrito a presença de *Leptospira icterohaemorrhagiae* ao estudar seis *Rattus norvegicus* da cidade do Rio de Janeiro, iniciando os estudos de distribuição da bactéria, e sua importância na saúde pública (ROLIM *et al.*, 2012). Posteriormente ao longo dos anos, vários outros sorogrupos e sorovares foram sendo identificados, existindo atualmente 20 espécies do gênero *Leptospira* descritas, distribuídas e classificadas em 24 sorogrupos com quase 300 sorovares descritos para leptospirosas patogênicas. Dentre estes os sorovares Hebdomadis, Pomona, Hardjo e Wolff são os mais comuns de serem identificados em rebanhos bovinos (SIMÕES *et al.*, 2016).

3 CARACTERÍSTICAS DO AGENTE ETIOLÓGICO

A leptospirose é causada por bactérias gram-negativas pertencentes ao filo Spirochaetes, classe Spirochaetes, ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e gênero *Leptospira* (LEVETT, 2001). Morfologicamente, estas bactérias são espiroquetas, espiraladas, flexíveis, móveis e delgadas. Apresentam 0,1 µm de diâmetro e 6-20 µm de comprimento, com uma ou ambas extremidades encurvadas em formato de gancho (HANSON, 1982). Devido ao tamanho pequeno, são melhores visualizadas através da microscopia de campo escuro com aumento de 600 a 1.000 x e possuindo afinidade por corantes argênticos (PEREIRA, 2014) e índice de refração a luz semelhante ao das lâminas de vidro, não podendo ser visualizadas em microscopia de luz (BROD; FEHLBERG, 1992). A *Leptospira* sp. é sensível à luz solar direta, dessecação, desinfetantes comuns, como cloro, iodo ou quaternário de amônio e pH ácido. Para seu desenvolvimento, o pH ideal varia entre 7,2 a 7,4 e a temperatura entre 7 a 37°C (BROD; FEHLBERG, 1992; GIRIO; LEMOS, 2007).

Existem duas classificações para o gênero *Leptospira*: a fenotípica e a genotípica (MURRAY *et al.*, 2013). A classificação fenotípica é baseada em características antigênicas da *Leptospira*, sendo utilizadas reações sorológicas como critérios de classificação. Desta forma, o gênero foi dividido em duas espécies de acordo com sua patogenicidade: cepas patogênicas (*Leptospira interrogans*) e cepas não patogênicas (*Leptospira biflexa*). Enquanto a classificação genotípica utiliza a relação antigênica entre sorovares para agrupá-los em sorogrupos (FAINE *et al.*, 2000). A classificação inicial da *Leptospira* se correlaciona a reações sorológicas específicas para determinação dos sorogrupos e sorovares de cepas patogênicas e não patogênicas (saprófitas). Sendo assim, os sorovares podem ser classificados dentro de sorogrupos determinados pelos antígenos que são compartilhados. Com o desenvolvimento da técnica de hibridização do DNA e da análise da homologia DNA-DNA, a classificação sorológica tem sido substituída pela classificação molecular (HASHIMOTO, 2012; SIMÕES *et al.*, 2016), sendo classificadas espécies que inclui todos os sorovares patogênicos e não patogênicos. Entre as espécies patogênicas são conhecidas: *L. interrogans*, *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. kirshneri*, *L. kmetyi*, *L. alstoni* e *L. mayottensis*; espécies com patogenicidade intermediária, *L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffi*, *L. licerasiae* e *L. venezuelensis*; e espécies não patogênicas, *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. idonii*, *L. vanthielli*, *L. yanagawae* e *L. terpstrae* (PUCHE *et al.*, 2017).

4 EPIDEMIOLOGIA

A leptospirose é uma das zoonoses mais conhecidas, de caráter endêmico e relatada como re-emergente em vários países, principalmente nos países tropicais (OIE, 2014), inclusive no Brasil (SILVA *et al.*, 2012). A ocorrência da doença está relacionada a condições precárias de infra estrutura sanitária, sendo uma doença de grande relevância para a saúde pública. Em épocas chuvosas, as inundações favorecem a disseminação e a persistência do agente causador, especialmente em ambiente urbanos, o que facilita a ocorrência de surtos neste período (SILVA, 2011).

A distribuição da leptospirose está associada com um ou mais hospedeiros (natural ou de manutenção), os quais servem como reservatórios da infecção. Os principais reservatórios da doença são os roedores, os quais são assintomáticos à leptospirose (ABDUSSALAM, 1975), hospedando leptospiras em seus rins e as eliminando no ambiente principalmente através da urina (DEWES, 2017). No Brasil, as principais espécies descritas como reservatório natural da doença são o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) (LATIFAH *et al.*, 2017; SANTA ROSA *et al.*,

1975), rato d'água (*Nectomys squamipes*) (CORDEIRO; SULZER; RAMOS, 1981) e o preá (*Cavia aperea azarae*) (PESTANA; SANTA ROSA; TROISE, 1961). Contudo, a literatura relata isolamento em várias outras espécies, que também podem representar reservatórios, como as capivaras (*Hidrochoerus hidrochoeris*) (PAULA, 2001), gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*), veado campeiro (*Ozotocero bezoarticus*), cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), quati (*Nasua nasua*) (VIEIRA *et al.*, 2013) e morcegos (*Desmodus rotundus*) (ZETUN *et al.*, 2009). Além destes, existem ainda os animais considerados reservatórios de manutenção domésticos, como os bovinos, suínos, equinos, caninos, ovinos e caprinos (SIMÕES *et al.*, 2016).

No ciclo rural, os bovinos são os principais reservatórios e disseminadores da Leptospirose, visto que uma vez instalada nos túbulos renais destes animais, as leptospiras não sofrem ação dos anticorpos, favorecendo sua eliminação por períodos superiores a 12 meses (MARINHO, 2008). A infecção dos animais pode ocorrer por contato direto ou indireto com o agente (Figura 1). Na forma direta, a transmissão ocorre pela passagem do agente através de mucosas íntegras ou lesadas, pele não lesionada ou via urogenital e monta natural. Enquanto a forma indireta ocorre pelo contato do animal com a água e solo contaminados (GIRIO; LEMOS, 2007; SLEIGHT; WILLIAMS, 1961). A via transplacentária também é relatada como forma de transmissão do agente (GIRIO; LEMOS, 2007; REIS *et al.*, 2017).

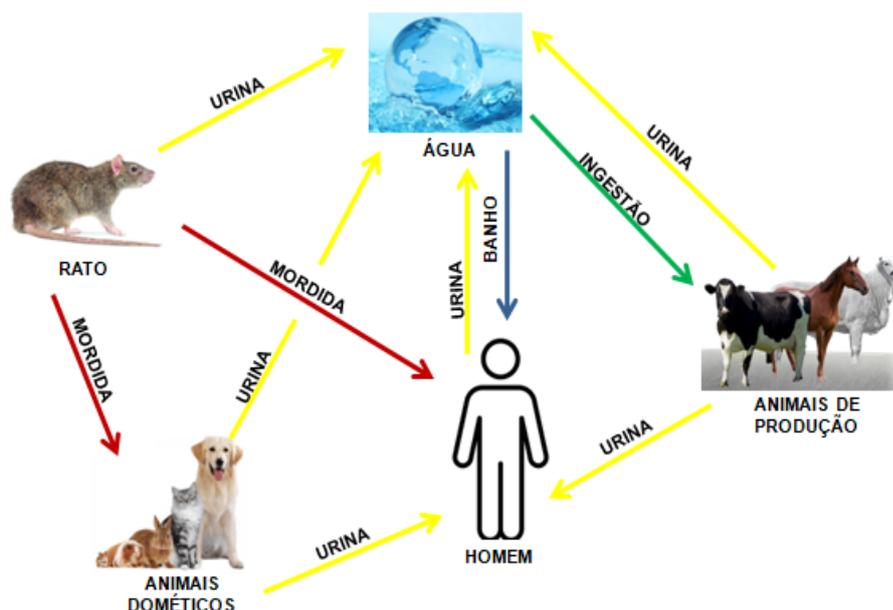


Figura 1 – Os hospedeiros de manutenção, como os roedores, eliminam as bactérias através da urina, que pode contaminar os hospedeiros acidentais, como os seres humanos, entre outros animais domésticos e selvagens, indiretamente através do solo e da água contaminados e também diretamente através do contato com esta urina.

Fonte: Adaptado de Miragaia (2016).

Alguns fatores de manejo podem facilitar a transmissão entre animais, como co-pastoreio entre diferentes espécies, sistema de produção e nível de tecnificação das propriedades rurais. Segundo Lilenbaum, Santos e Barbosa, (1995), ao avaliar 404 amostras de animais não vacinados, identificou-se que propriedades com baixa tecnificação possuem alta taxa de reatividade para leptospirose com média de 80%, seguido das fazendas de tecnificação intermediária, com 52,38% de reatividade e fazendas mais tecnificadas com uma taxa de 28,57% de reatividade. Em outro estudo, foi observado associação das taxas de assistência veterinária e sororeatividade. Em rebanhos sob supervisão veterinária frequente, ou visitados a cada duas semanas ou mais, apresentaram taxas de reatividade sorológica para leptospirose de 54,1% e 56,1%, respectivamente. Por outro lado, rebanhos com baixa ou sem assistência veterinária apresentaram taxas de sororeatividade de 91,3% e 97,4%, respectivamente. Estes fatores determinam um impacto significativo na soroprevalência geral da leptospirose, porém o tipo de alojamento relacionado a construções e currais não interferem significativamente. Dessa forma, para o controle da leptospirose não se faz necessário altos investimentos em estábulos (LILENBAUM; SANTOS; BARBOSA, 1995; LILENBAUM; SOUZA, 2003).

5 SOROPREVALÊNCIA EM BOVINOS NO BRASIL

Estudos observaram que a soro prevalência da leptospirose em rebanhos brasileiros pode variar entre estados (HOMEM *et al.*, 2001; LAGE *et al.*, 2007). Santa Rosa *et al.* (1970) avaliando um total de 15.080 bovinos, provenientes de nove estados brasileiros, encontraram 23,6% de positividade para leptospirose, com predominância do sorovar Wolffi. Favero *et al.* (2001) em estudo efetuado com 31.325 bovinos, de 1920 propriedades, as quais eram distribuídas em 540 municípios de 21 estados do Brasil encontraram soroprevalência variando de 25,2% a 62,5%, com média entre os estados de 37,94%. Em estudo mais recente, Baroni *et al.* (2020) encontraram prevalência de 50% para *Leptospira interrogans* no estado do Espírito Santo, sendo que os sorovares encontrados com maior prevalência foram Wolffi, Bratislava e Hardjo. Na Tabela 1 são apresentados a incidência em diferentes estados do Brasil.

Dentre os diversos sorovares, o Hardjo é o mais frequentemente encontrado em bovinos, sendo importante agente causador de abortamentos na espécie (AGUIAR *et al.*, 2010). Além do Hardjo, bovinos podem ainda ser infectados por outros sorovares, como Wolffi (ARAÚJO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009), Hebdomadis (MINEIRO *et al.*, 2007),

Icterohaemorrhagiae, Tarassovi (JULIANO *et al.*, 2000), Georgia, Goiano, Guaicurus (CASAGRANDE, 2009).

Tabela 1 - Soroprevalência da leptospirose em diferentes estados brasileiros.

Estados	Prevalência (%)	Nº amostras	Fonte
Bahia	61,0; 45,4	657; 10823	Favero <i>et al.</i> (2001); Oliveira <i>et al.</i> (2009)
Espirito Santo	50,0; 62,2; 12,4	100; 270; 330	Baroni <i>et al.</i> (2020); Favero <i>et al.</i> (2001); Viana, Zanini e Moreira (2010)
Goiás	46,5; 62,2	1406; 4571	Favero <i>et al.</i> (2001); Marques <i>et al.</i> (2010)
Maranhão	34,0; 58,2; 39,4	100; 371; 1527	Coelho <i>et al.</i> (2014); Favero <i>et al.</i> , 2001; Silva <i>et al.</i> (2012)
Mato Grosso do Sul	90,4; 69,8; 98,0	2573; 1801; 2766	Figueiredo (2007); Figueiredo <i>et al.</i> (2009); Miashiro <i>et al.</i> (2018)
Pará	65,5; 38,3; 77,8	176; 1675; 131	Chebião (2010); Favero <i>et al.</i> (2001); Negrão, Molnár e Molnár (2000);
Paraná	34,4	305	Hashimoto <i>et al.</i> (2012)
Piauí	56,0; 52,9	225; 1975	Favero <i>et al.</i> (2001); Mineiro <i>et al.</i> (2007)
Rio De Janeiro	41,3; 68,3; 46,9	674; 405; 379	Favero <i>et al.</i> (2001); Lilebaum, Santos e Barbosa (1995); Lilebaum e Siuza (2003)
Rio Grande Do Sul	28,9; 38,7	2471; 1360	Favero <i>et al.</i> (2001); Herrman <i>et al.</i> (2012)
São Paulo	49,4; 35,0	8216; 18558	Castro, Azevedo e Gotti (2008); Favero <i>et al.</i> (2001)
Tocantins	76,5; 41,0	257; 97	Araújo <i>et al.</i> (2005); Favero <i>et al.</i> (2001)

Fonte: Os autores.

6 SINAIS CLÍNICOS

A leptospirose bovina pode ser dividida em duas fases distintas: fase aguda, na qual o início dos sintomas coincide com a fase de bacteremia e fase crônica, que afeta de forma mais relevante o trato reprodutivo. Entretanto, a severidade da doença é dependente da idade e do

status imunológico do animal, bem como a sorovariabilidade infectante, a concentração e a virulência do agente (FAINE *et al.*, 2000). Os sinais clínicos comuns da doença são inespecíficos por se manifestarem em outras enfermidades, como: febre, anorexia, dispneia, prostração, diarreia, icterícia, hemoglobinúria, paresia ou paralisia do rúmen, nascimento de bezerros imunodeficientes e mastite (GENOVEZ *et al.*, 2018; GROOMS, 2006; SIMÕES *et al.*, 2016). Na fase aguda, a qual acomete principalmente animais jovens, as manifestações clínicas caracterizam-se por hipertermia com duração de quatro a cinco dias, hemorragias sob a forma de petéquias nas mucosas, hemoglobinúria, anemia, icterícia e septicemia. Em animais adultos, a fase aguda se manifesta principalmente em casos de mastite e quadros de agalactia, sendo que esta variação da sintomatologia entre animais jovens e adultos está relacionada ao completo desenvolvimento pelo sistema imunológico do animal adulto (GIRIO; LEMOS, 2007).

A forma crônica está, na maioria das vezes, relacionada com distúrbios de ordem reprodutiva como abortamento, natimortos e subfertilidade ou infertilidade, sendo os únicos e expressivos sinais da doença crônica no rebanho (GIRIO; LEMOS, 2007). Vacas infectadas pelo sorovar Hardjo e Interrogans apresentam abortos no primeiro trimestre de gestação e nascimento de bezerros imunodeficientes quando a gestação não é interrompida. Por outro lado, abortos no último trimestre de gestação são associados ao sorovar Pomona, podendo levar até ao abortamento de 50% das gestações (ELLIS, 1994). Em especial, o sorovar Hardjo tem efeito direto sobre a fecundação e/ou sinalização embrionária precoce, podendo interferir na função do corpo lúteo e nos perfis hormonais no final da gestação, levando a baixas concentrações de progesterona ou sulfato de estroma (GIRIO; LEMOS, 2007).

7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico inicial da leptospirose é baseado na associação de aspectos clínicos e epidemiológicos, tais como: baixa eficiência reprodutiva dos animais, presença de roedores e associação de casos suspeitos com as estações de maior índice pluviométrico (SIMÕES *et al.*, 2016). O diagnóstico definitivo deve ser feito por meio de exames laboratoriais, com métodos diretos ou indiretos (SARMENTO *et al.*, 2012). O momento de coleta e tipo de amostra são fundamentais para chegar ao diagnóstico da leptospirose (PICARDEAU, 2013).

O diagnóstico definitivo direto deve ser feito por meio da detecção da bactéria pelo isolamento de leptospiros em cultura, a qual pode ser realizada a partir de amostras de sangue, urina, produtos de abortamento, biópsia de tecido renal, hepático ou útero (HARTSKEERL;

COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). Técnicas moleculares como reação em cadeia de polimerase (PCR), imunistoquímica e imunofluorescência direta, também são métodos empregados para diagnóstico da doença (HERNÁNDEZ; RODRIGUEZ, 2011), os quais também tipificam a sorovariedade prevalente no local (CHIARELI *et al.*, 2012).

Dentre os métodos de diagnóstico indireto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) indica a técnica de soro aglutinação microscópica (SAM) como técnica de eleição, no qual utiliza-se anticorpos (IgM e IgG) que reagem com o antígeno vivo dos sorovares de interesse, formando aglutinações visíveis no microscópio de campo escuro (LEVETT, 2001). A técnica é considerada de eleição para identificação da leptospira no organismo, apresentando elevada sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos de leptospirose (CASTRO; AZEVEDO; GOTTI, 2008). Embora esta técnica seja a de eleição para detecção do agente no organismo, ela possui baixa sensibilidade para a detecção do sorovar infectante, devido a ocorrência de reações-cruzadas entre sorovares, especialmente dentro de um mesmo sorogrupo (FAINE *et al.*, 2000). Esta ocorrência é desencadeada devido a heterogeneidade de carboidratos que compõem a cadeia lateral dos lipopolisacarídeos (LPS) da membrana bacteriana (HASHIMOTO, 2012).

Outra opção de teste sorológico é o Ensaio de Imuno Absorção Enzimática (ELISA), o qual utiliza apenas frações bacterianas, não necessitando do antígeno vivo. Este teste apresenta alta sensibilidade, mas não tem a mesma especificidade proporcionada pelo SAM (MUSSO; LA SCOLA, 2013). O ELISA possui habilidade de detecção específica de anticorpos da classe IgM ou IgG, podendo correlacionar os resultados com o tempo de infecção. A identificação de anticorpos IgM está relacionado a processos infecciosos mais recentes, enquanto a detecção de IgG está relacionada a processos infecciosos crônicos (SIMÕES *et al.*, 2016).

8 CONTROLE E PROFILAXIA

Assim como a doença pode afetar inúmeras espécies, todas elas podem atuar como fonte de infecção. Logo, conhecer as cepas circulantes em um hospedeiro e região específica, por meio de isolados locais, é de grande importância para o entendimento epidemiológico da leptospirose (LILENBAUM; MARTINS, 2014). As medidas preventivas devem ser instituídas de forma simultânea em todos os três estágios da cadeia de transmissão: fontes de infecção, vias de transmissão e animais suscetíveis à doença (VILGES; ARSKY; CALDAS, 2013).

A dificuldade para o controle eficaz de leptospirose em propriedades rurais é a permanência de animais contaminados e a reintrodução da infecção por roedores ou animais

silvestres portadores da doença. Com isso, as medidas profiláticas recomendadas são: nutrição adequada, controle na aquisição e introdução de novos animais na propriedade, cuidados na inseminação artificial e qualidade do sêmen utilizado, cuidados higiênico-sanitários e sorodiagnóstico periódico em animais do rebanho reprodutor (PASQUALOTTO; SEHNEM; WINK, 2015).

Para medidas efetivas de controle da leptospirose, é necessário basear o tratamento com antibióticos em animais diagnosticados por diagnóstico clínico ou laboratorial. Como proteção específica, a vacinação é uma alternativa a rebanhos que vivem em condições susceptíveis à infecção. O protocolo vacinal tem início a partir do terceiro mês de idade, com uma dose reforço após 30 dias da primeira aplicação e revacinações semestrais a anuais conforme as condições ambientais. Quanto maior o risco de contaminação, seja por alta incidência de casos positivos, abortos ou condições climáticas durante o período das chuvas, menor o intervalo das revacinações. Em geral, as vacinas comerciais são constituídas por cinco a seis sorovares mais prevalentes no Brasil, sendo indicado optar por sorovares presentes na região de localização do rebanho e específico para a espécie bovina (FIGUEIREDO, 2007; MUGHINI-GRAS *et al.*, 2014). Além disto, alterações de manejo tais como, realizar a quarentena de animais a serem introduzidos no rebanho, drenagem de áreas alagadas, que apesar de não impedirem a transmissão e não erradicar a bactéria, podem reduzir os prejuízos reprodutivos e consequentemente econômicos (MARTINS; LILENBAUM, 2017).

Em relação aos animais infectados, a antibioticoterapia pode ser usada para minimizar a transmissão entre animais, administrando 25 mg/kg de dihidroestreptomicina em dose única por via sistêmica. Dessa forma, a potencialidade de transmissão é reduzida, bloqueando a eliminação de leptospiras através de urina, sêmen e secreção vaginal (FIGUEIREDO, 2007; MUGHINI-GRAS *et al.*, 2014).

Tratamentos precoces entre os primeiros sete a dez dias de infecção reduzem a progressão dos sintomas. Na forma aguda da doença, é sugestivo o uso de estreptomicina ou dihidroestreptomicina na dose de 12 mg/kg de peso vivo, duas vezes ao dia durante três dias, ou tetraciclina 10 a 15 mg/kg duas vezes ao dia durante cinco dias. Em casos de surto recomenda-se o tratamento com dose única de estreptomicina na dose de 25mg/kg, sendo suficiente para remover o estado de portador renal crônico do animal, assim como também deve ser realizada a vacinação simultânea do rebanho (FIGUEIREDO, 2007; GIRIO; LEMOS, 2007).

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A leptospirose é uma antropozoonose de distribuição mundial, a qual pode apresentar curso agudo ou crônico, acometendo mamíferos, aves, anfíbios, peixes e répteis, sendo endêmica no Brasil, com variação de prevalência entre os estados brasileiros. Por causa de distúrbios reprodutivos, como abortos, diminuição da fertilidade e/ou nascimento de bezerros mais fracos, pode ser responsável por perdas econômicas na cadeia de produção. Possui maior disseminação em rebanhos com ausência de controle sanitário, zootécnicos e supervisão veterinária. As medidas preventivas além do estabelecimento do protocolo vacinal estratégico do rebanho, devem ser adotadas pensando em agir nos estágios da cadeia de produção, visando diminuir a fonte de infecção, vias de transmissão e cuidados com introdução de animais susceptíveis no rebanho e realização do tratamento de animais positivos ou suspeitos.

10 REFERÊNCIAS

- ABDUSSALAM, M. Situación mundial del problema de la leptospirosis. In: REUNION INTERAMERICANA SOBRE EL CONTROL DE LA FIEBRE AFTOSA Y OTRAS ZONOSIS, 1975. **Organização Mundial da Saúde**, 1975, 172 p. 142-153.
- AGUIAR, D. M. *et al.* Anticorpo anti-*Leptospira spp.* em ovinos do município de Monte Negro, estado de Rondônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 529-532, 2010.
- ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Doenças infecciosas que impactam a reprodução de bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 133-139, 2017.
- ARAÚJO, V. E. M. *et al.* Frequência em aglutininas anti *Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 430-435, 2005.
- BARONI, A. E. *et al.* Prevalência soro epidemiológica de *Leptospira spp.* em rebanhos bovinos leiteiros da mesorregião do Rio Doce no Estado do Espírito Santo. **Pubvet**, v. 14, n. 2, p. 1-11, 2020.
- BROD, C. S.; FEHLBERG, M. F. Epidemiologia da leptospirose em bovinos. **Ciência Rural**, v. 22, n. 2, p. 239-245, 1992.
- CASAGRANDE, S. A. M. **Emprego de estirpes de leptospiras isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico de leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros**. 2009. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Escola de Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

- CASTRO, V.; AZEVEDO, S. S.; GOTTI, T. B. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 1, p. 3-11, 2008.
- CHEBIAO, D. P. **Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, anti-*Brucella abortus* e anti-*Leptospira* spp. em bovinos do Estado do Pará.** 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia experimental aplicada) - Programa de pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- CHIARELI, D. *et al.* Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, n. 32, p. 633-639, 2012.
- COELHO, E. L. M. *et al.* Prevalência de leptospirose em fêmeas bovinas abatidas em frigoríficos no município de São Luís, Maranhão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, n. 2, p. 111-115, 2014.
- CORDEIRO, F.; SULZER, C. R.; RAMOS, A. A. *Leptospira interrogans* in several wild life species in South east Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 19-29, 1981.
- DEWES, C. **Estudos epidemiológicos da leptospirose equina na região sul do Rio Grande do Sul.** 2017. 59 f. Dissertação, programa de pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses - Universidade Federal de Pelotas, Sanidade Animal, 2017.
- ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice**, v. 10, p. 463-478, 1994.
- FAINE, S. *et al.* ***Leptospira* and leptospirosis.** 2. ed. Melbourne: Medicine Science, 2000. 272p.
- FAVERO, M. *et al.* Leptospirose bovina – variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 29-35, 2001.
- FIGUEIREDO, A. D. O. *et al.* Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 375-381, 2009.
- FIGUEIREDO, A. O. **Leptospirose bovina: prevalência, variáveis de riscos e sorovares predominantes em rebanhos do Mato Grosso Do Sul, Brasil.** 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Programa de pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2007.
- GENOVEZ, M. E. *et al.* **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia.** 1 ed. 2018. 1296 p.
- GIRIO, R. S.; LEMOS, R. A. A. Leptospirose. In: CORREA, F. R. *et al.* **Doenças de ruminantes e equídeos.** 2. ed. Rio Grande do Sul: Varela Editora Livraria LTDA. 2007, p. 426.

GROOMS, D. L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, n. 3, p. 624-628, 2006.

HANSON, L. E. Leptospirosis in domestic animals: the public health perspective. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 12, p. 1505-1509, 1982.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 4, p. 494-501, 2011.

HASHIMOTO, V. L. **Clonagem e expressão gênica de antígenos candidatos vacinais contra leptospirose**. 2012. 117 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

HASHIMOTO, V. Y. *et al.* Prevalence and risk factors for *Leptospira sp.* in cattle herds in the south central region of Paraná state. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 99-105, 2012.

HERNÁNDEZ, P. H.; RODRÍGUEZ, P. A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. **Journal Microbiology Methods**, v. 84, n. 1, p. 1-7, 2011.

HERRMANN, G. P. *et al.* Soroprevalência de leptospirose em bovinos nas mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 2, p. 131-138, 2012.

HOMEM, V. S. F. *et al.* Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 173-180, 2001.

JULIANO, R. S. *et al.* Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia - GO. **Ciência Rural**, v. 30, n.5, p. 857-862, 2000.

LAGE, A. P. *et al.* Serology for *Leptospira sp.* in cattle of the State of Paraíba, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 3, p. 185-190, 2007.

LATIFAH, I. *et al.* Isolation by culture and PCR identification of LipL32 gene of pathogenic *Leptospira spp.* in wild rats of Kuala Lumpur. **Journal of Pathology**, v. 39, p. 161-166, 2017.

LELITSCEWA, R. B. C. *et al.* Um caso atípico de leptospirose no hospital geral público de Palmas. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 5, n. 3, p. 52-55, 2018.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

- LILENBAUM, W.; MARTINS, G. Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the understanding of the epidemiology. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61, c. 1, p. 63-68, 2014.
- LILENBAUM, W.; SANTOS, M. R. C.; BARBOSA, A. V. Leptospirose em reprodução animal: II. Bovinos do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 1995.
- LILENBAUM, W.; SOUZA, G. N. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 75, p. 249-251, 2003.
- MARINHO, M. Leptospirose: fatores epidemiológicos, fisiopatológicos e imunopatogênicos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 428-434, 2008.
- MARQUES, A. E. *et al.* Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* sp. e aspectos epidemiológicos da infecção em bovinos do estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 607-617, 2010.
- MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Control of bovine leptospirosis: aspects for consideration in a tropical environment. **Research in Veterinary Science**, v. 1, p. 156-60, 2017.
- MIASHIRO, A. F. *et al.* Prevalência de leptospirose em rebanhos bovinos no Pantanal de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 41-47, 2018.
- MINEIRO, A. L. B. B. *et al.* Infecção por leptospira em bovinos e a sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n.5, p. 1103-1109, 2007.
- MIRAGAIA, L. S. **Interação de proteínas de membrana de *Leptospira* com vitronectina humana**. 2016. 32 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Programa de pós-graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- MUGHINI-GRAS, L. *et al.* Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds. **Epidemiologic Infection**, v. 142, p. 1172-1181, 2014.
- MURRAY, G. L. *et al.* Evaluation of 238 antigens of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo for protection against kidney colonization. **Vaccine**, v. 31, p. 495-499, 2013.
- MUSSO, D.; LA SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**, v. 46, n. 4, p. 245-252, 2013.
- NEGRÃO, A. M. G.; MOLNÁR, E.; MOLANÁR, L. Leptospirose em bovinos abatidos em matadouros no estado do Pará. **Revista Ciência Agrária**, n. 33, p. 77-86, 2000.
- OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. **World Organization for Animal Health**, v. 130 n. 6, p. 1185-1191, 2014.

- OLIVEIRA, F. C. S. *et al.* Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 539-546, 2009.
- PASQUALOTTO, W.; SEHNEM, S.; WINCK, C. A. Incidência de rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarreia viral bovina (BVD) e leptospirose em bovinos leiteiros da região oeste de Santa Catarina – Brasil. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 8, n. 2, p. 249-270, 2015.
- PAULA, C. D. Isolamento de *Leptospira* em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) de vida livre. In: V CONGRESSO BRASILEIRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 5, 2001, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2001, p. 25.
- PELLEGRIN, A. O. *et al.* Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal Mato-Grossense. **Embrapa Pantanal**, n. 22, p. 1-9, 1999.
- PEREIRA, E. R. **Leptospirose**. 2014. 30 f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso de Graduação em Farmácia da Faculdade de Educação e Meio Ambiente) - Faculdade de Educação e Meio Ambiente, 2014.
- PESTANA, C. A. F. de; SANTA ROSA, C. A.; TROISE, C. Preás (*Cavia aperea azarae*, *Lichi.*) (Rodentia: Cavidae) como reservatório de *Leptospira* em São Paulo. isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 28, p. 219-223, 1961.
- PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, p. 1-9, 2013.
- PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 297–307, 2017.
- PUCHE, R. *et al.* *Leptospira venezuelensis* sp. a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.5, n. 2, p. 117-128, 2017.
- REIS, M. O. *et al.* Surto de leptospirose em bezerros criados em resteva de arroz. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 937-940, 2017.
- ROLIM, M. B. Q. *et al.* Leptospirose em bovinos: revisão. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 6, n. 2, p. 26-31, 2012.
- SANTA ROSA, C. A. *et al.* Leptospirosis in wildlife in Brazil; isolation of a new serotype in the pyrogenes group. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 9, p. 1363-1365, 1975.
- SANTA ROSA, C. A. *et al.* Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 29, n. 30, p. 19-27, 1970.
- SARMENTO, A. M. C. *et al.* Emprego de estirpes *Leptospira* spp. isoladas no Brasil na micro técnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em

rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 601-606, 2012.

SILVA, F. J. **Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no estado do maranhão**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária - UNESP, Botucatu, 2011.

SILVA, F. J. *et al.* Prevalence and risk factors of bovine leptospirosis in the State of Maranhão, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 303-312, 2012.

SIMÕES, L. C. *et al.* Leptospirose- revisão. **Pubvet**, v. 10, n. 2, p. 138-146, 2016.

SLEIGHT, S. D.; WILLIAMS, J. A. Transmission of bovine leptospirosis by coition and artificial insemination. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 138, n. 3. p. 151-152, 1961.

VIANA, K. F.; ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C. Frequência de anticorpos anti-*leptospira* spp em rebanhos bovinos da bacia leiteira do Caparaó, estado do Espírito Santo. **Archives of Veterinary Science**, v. 15, n. 2, p. 100-106, 2010.

VIEIRA, A. S. *et al.* Identificação de mamíferos silvestres do Pantanal Sul-Mato-Grossense portadores de *Leptospira* spp. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 373-380, 2013.

VILGES, O. S.; ARSKY, M. D.; CALDAS, E. P. Reservatórios animais da leptospirose: uma revisão bibliográfica. **Saúde**, v. 39, n. 1, p. 9-20. 2013.

ZETUN, C. B. *et al.* *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Botucatu region, SP, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. 546-552, 2009.

Capítulo 8

Ferramentas de análise molecular para identificação de patógenos na aquicultura



Ernesto Tavares Borges Neto¹
Flávia Regina Spago²
Samuel Oliveira da Silva³
David Carvalho dos Santos⁴
Erivelto Oliveira de Souza⁵
Paola de Oliveira Santos⁶
Iara Evelim da Silva Ferreira⁷
Thayná de Souza Pardo⁸
Leonardo Demier Cardoso⁹
José Gilmar da Silva Souza¹⁰
Silvia Pope de Araujo¹¹
Priscilla Cortizo Costa Pierro¹²
Pedro Pierro Mendonça¹³

¹ Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: ernestoborges1995@gmail.com

² Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: flavia.goncalves@ifes.edu.br

³ Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: engaquisamuel@gmail.com

⁴ Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: davidcdossantos99@gmail.com

⁵ Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: velto3032@gmail.com

⁶ Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: paolamanfredini111@gmail.com

⁷ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: iara-evelim@hotmail.com

⁸ Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: eng.thaynapardo@gmail.com

⁹ Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: leonardodemier@hotmail.com

¹⁰ Instituto de Pesquisa Extensão Rural e Organismos Aquáticos, e-mail: jgilmar.souza@gmail.com

¹¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, e-mail: silviapopedearaujo@gmail.com

¹² Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: pri.cortizo@gmail.com

¹³ Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: ppierrom@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O setor pesqueiro mundial se mantém em crescimento e desenvolvimento ao passar dos anos. Atualmente, o pescado é o produto alimentício mais comercializado em todo o mundo, assim proporcionando alta demanda para os produtos provenientes da aquicultura, tornando o cultivo de organismos aquáticos um mercado em expansão. Em 2018, foi registrada a produção aquícola de 114,5 milhões de toneladas de pescado mundialmente, totalizando o movimento de 263,6 bilhões de dólares (FAO, 2020).

Aquicultura é a denominação da atividade que se propõe cultivar em ambientes controlados, organismos que possuem a água como meio em alguma etapa de seu desenvolvimento. Os principais organismos cultivados mundialmente na aquicultura são os peixes, moluscos, crustáceos e algas. Essa atividade tem potencial para grande aumento na produção mundial de alimentos e é um forte aliado para lidar, de maneira sustentável, com a crescente demanda alimentar devido à alta taxa de crescimento populacional no mundo (FAO, 2020; SIQUEIRA, 2017).

Uma das principais barreiras que a produção aquícola atualmente enfrenta são os danos causados pelos surtos de doenças. Esse fator diminui o desenvolvimento do setor, causando prejuízos socioeconômicos como perda de empregos, redução de receita, insegurança alimentar, além de refletir efeitos em toda a cadeia produtiva. Estima-se que a aquicultura mundial apresenta perda total de aproximadamente seis bilhões de dólares por ano devido ao surgimento de doenças (STENTIFORD *et al.*, 2017).

A presença de patógenos na aquicultura pode comprometer o sucesso da atividade, em que as doenças causadas por esses agentes são capazes de reduzir a lucratividade do sistema, causar altas despesas e até a falência do negócio devido à grande taxa de mortalidade durante os surtos. Além disso, o tratamento para eliminar a presença desses patógenos dos viveiros e reservatórios, podem gerar ainda mais custos e demanda de tempo com mão de obra especializada, produtos e manejo. A identificação e diagnóstico precoce da presença de patógenos na aquicultura é uma prática que pode auxiliar na mitigação de problemas causados por infecções e infestações desses organismos e evitar gastos futuros com remediação (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2009).

A biologia molecular é uma ciência que busca compreender o comportamento e interação dos sistemas que compõem as células. É o ramo da biologia que estuda as ações do DNA, RNA e síntese de proteínas, assim como a regulação de suas interações. Essa área utiliza

ferramentas e metodologias para isolar, manejar e extrair informações ligadas ao material genético dos seres vivos (ALBERTS *et al.*, 2017).

Sabe-se que o desenvolvimento da tecnologia e crescimento dos bancos de dados genéticos no mundo facilitam e incentivam o uso de ferramentas para diagnóstico molecular de patógenos na aquicultura. Porém, informações dispersas dificultam a disseminação da tecnologia no meio científico e no agronegócio, portanto este capítulo busca investigar, compreender e descrever as técnicas moleculares que podem ser utilizadas para diagnóstico de patógenos que afetam organismos cultivados na aquicultura.

2 HISTÓRICO

Os métodos convencionais utilizados para detecção de patógenos em geral se baseavam fundamentalmente em realizar o cultivo dos patógenos em condições *in vitro*, análises fenotípicas, sorológicas ou análises histológicas do tecido afetado. Por muito tempo essas técnicas foram os principais meios de estudar, entender e detectar organismos patogênicos (WAGENER, 1997).

Com a evolução das ciências biológicas, começou-se a aplicar os conhecimentos sobre DNA e RNA na compreensão dos processos de manifestação de doenças, esse conceito é denominado metodologia molecular. A partir daí era possível realizar análises mais detalhadas envolvendo as expressões genéticas das células e obter resultados mais confiáveis e consistentes sobre os organismos relacionando seus fenótipos e genótipos (ALBERTS *et al.*, 2017).

Até esse ponto, o campo da biologia molecular ainda enfrentava dois grandes problemas, sendo eles a pequena quantidade de ácidos nucleicos no material a ser analisado e a baixa especificidade dos trechos de interesse que era possível isolar. Contudo, em 1983, o químico Kary Mullis desenvolveu a técnica denominada de Amplificação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) que é capaz de amplificar em milhares de vezes uma região específica de uma amostra de DNA. Com isso, a biologia molecular recebeu uma ferramenta considerada indispensável para pesquisas e análises referentes ao código genético (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2012).

Em geral, as técnicas utilizadas para diagnósticos moleculares hoje em dia se baseiam na tentativa de amplificar um trecho específico do código genético de um organismo e detectar e/ou quantificar essa amplificação.

3 TÉCNICAS DE AMPLIFICAÇÃO DE MATERIAL GENÉTICO

As técnicas de amplificação de material genético necessitam de três fatores importantes para seu funcionamento: a enzima DNA polimerase, os *primers* e a temperatura (LIMA, 2008; RAMSDEN, 2009).

A DNA polimerase é uma enzima responsável pela síntese de moléculas de DNA a partir de dNTP's (desoxirribonucleotídeos fosfatados). Ela é essencial para a amplificação do DNA, tendo a função de adicionar os nucleotídeos, um a um, à nova fita que irá ser formada a partir da fita molde (RYE *et al.*, 2013). A enzima mais comumente utilizada na PCR é a Taq DNA polimerase. Ela recebe esse nome, pois é uma enzima isolada da bactéria *Thermus aquaticus*. Esse micro-organismo vive em ambientes com temperaturas acima de 70°C, fazendo com que sua enzima polimerase tenha desempenho ideal para ser usada na PCR, que atua ciclicamente em altas temperaturas (RAMSDEN, 2009).

A DNA polimerase só atua em moléculas dupla fita. Para realizar a amplificação de material genético a partir de moléculas de RNA, é necessário primeiramente efetuar uma etapa de transcriptase reversa (*reverse transcriptase* - RT). Essa etapa consiste em adicionar a enzima RT na solução contendo RNA, essa enzima é capaz de fazer o processo de transcrição do RNA para DNA complementar (cDNA). Após esse processo de síntese, é possível utilizar o cDNA formado na realização das técnicas de amplificação de material genético (ARTIKA; IYATNO; MA'ROEF, 2020).

Os *primers* são sequências curtas de nucleotídeos (oligonucleotídeos) sintetizados artificialmente e agem especialmente em um determinado trecho do DNA alvo. Os *primers* são os componentes que garantem toda a especificidade dos diagnósticos moleculares em geral. São desenvolvidos para se ligar a região de interesse do DNA onde a polimerase irá se iniciar. Em uma PCR convencional são utilizados dois *primers* chamados de forward (atua na porção 5'-3') e reverse (atua na porção 3'-5'). Geralmente os *primers* possuem tamanho de 20 nucleotídeos de comprimento. Esse tamanho é o suficiente para garantir uma probabilidade estatística confiável em que o *primer* irá se anelar somente ao trecho desejado. Em experimentos com *primers* maiores é possível começar a ser identificado a ocorrência do fenômeno de auto-anelamento (dímero de *primer* ou *self-annealing*), em que um *primer* se liga à uma porção de si mesmo ou em outro *primer*. Para se desenvolver um *primer*, é necessário definir algumas características para garantir sua eficiência, como tamanho, temperatura de atuação, proporção de guanina-citosina e repetição de bases nitrogenadas. A elaboração de um *primer* pode ser a parte mais importante para a amplificação em cadeia, e geralmente possui

complexidade para sua definição, porém, existem alguns algoritmos como Primer3 (UNTERGASSER *et al.*, 2012) e PrimerQuest™ que podem ser utilizados para auxiliar nessa etapa (RAMSDEN, 2009; ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2012).

A temperatura é uma variável fundamental para a amplificação molecular. Sua atuação basicamente tem influência em todas as etapas desse processo. É ela a responsável por ativar a enzima polimerase e os *primers*, e também pela desnaturação do DNA. Conhecer as temperaturas ótimas para cada etapa da amplificação e como deve ser aplicada em cada tipo de processo diferente é essencial para o sucesso do procedimento (CHESTER; MARSHAK, 1993). A temperatura de melting (*melting temperature* - T_m) é a temperatura na qual a solução possuirá metade das fitas de DNA desnaturadas e a outra metade pareada, e a temperatura de pareamento (*annealing temperature* - T_a) é a temperatura onde ocorre a ligação entre primer e fita simples (CHESTER; MARSHAK, 1993). Essas variáveis são levadas em questão para definição e construção de um primer e para realizar análises quantitativas da amplificação.

3.1 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

A PCR é capaz de realizar a amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA específicos, que rapidamente pode ser concluída mesmo que com quantidade muito pequena de DNA alvo. Além dos componentes DNA polimerase e *primers*, é necessário adicionar à reação os componentes dNTPs e um cofator para a DNA polimerase (geralmente é utilizado o cloreto de magnésio MgCl). O processo de amplificação em cadeia se baseia em realizar ciclos repetitivos de três passos, sendo eles a desnaturação, anelamento e extensão. Na desnaturação a temperatura da solução é elevada entre 94°C e 96°C, e assim as moléculas de dupla fita de DNA se desfazem a partir do rompimento das ligações de ponte de hidrogênio entre elas, se tornando moléculas fita simples. Em seguida, na etapa de anelamento ocorre a ligação dos *primers* nos trechos específicos das fitas simples do DNA alvo, a temperatura é reduzida até a temperatura ótima de atuação dos *primers* particulares da reação, podendo ser geralmente entre 30°C e 60°C. Por último acontece a polimerização das novas moléculas pela DNA polimerase na etapa de extensão, em que a temperatura é elevada até por volta de 72°C e 75°C, na qual as enzimas se associam aos *primers* anelados às fitas simples e a partir desse ponto se inicia o processo de amplificação (LIMA, 2008; MCPHERSON; QUIRKE; TAYLOR, 1991).

Esse processo é repetido ciclicamente várias vezes, e ao final de cada ciclo o número de moléculas alvo na solução é dobrado. Geralmente o equipamento utilizado para as variações de temperatura é o termociclador. Uma reação de PCR pode ter duração média de duas a quatro

horas, realizando em média 30 ciclos, e ao final pode-se obter bilhões de cópias da região de interesse a partir de poucas moléculas de amostra (LIMA, 2008).

3.2 POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO

O polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) é um procedimento que pode ser utilizado nos produtos da PCR como alternativa para o diagnóstico ou diferenciação de espécies. A RFLP consiste em adicionar ao produto amplificado da PCR, uma enzima endonuclease de restrição que é capaz de reconhecer um trecho específico do DNA alvo e cortá-lo (clivar) naquele ponto, dividindo um pedaço de DNA em duas partes de tamanhos diferentes. Posteriormente, é possível detectar se houve ou não a ação da clivagem no DNA alvo por eletroforese em gel, observando a relação de moléculas de tamanho diferente na solução (PAVAN; MONTEIRO, 2014).

3.3 LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP)

É uma técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (*Loop-mediated isothermal amplification* - LAMP). Assim como a PCR, esse método também realiza amplificação de DNA a partir de um trecho específico. Porém, a LAMP tem o diferencial de ser mais rápida, ter mais especificidade e ser conduzida sem oscilação de temperatura. Além disso, essa técnica utiliza dois pares de *primers* distintos sendo eles os *primer* internos FIP (*Forward Inner Primer*) e BIP (*Backward Inner Primer*), e dois *primers* externos F3 e B3. Outra diferença é que na LAMP normalmente se utiliza de outra DNA polimerase chamada de Bst (isolada do organismo *Bacillus stearothermophilus*) (NOTOMI *et al.*, 2000).

Para se iniciar o processo da LAMP, primeiro é necessário elevar a temperatura da solução até 95°C por aproximadamente cinco minutos para que ocorra a desnaturação inicial das fitas duplas para fitas simples, após essa etapa todo o processo da LAMP ocorre isotermicamente em aproximadamente 65°C. O funcionamento dessa técnica pode ser dividido em três momentos chave, sendo eles a Produção inicial do alvo, Ciclagem/amplificação e Elongamento/reciclagem (NOTOMI *et al.*, 2000).

3.4 AMPLIFICAÇÃO DE POLIMERASE POR RECOMBINASE

A amplificação de polimerase por recombinase (*recombinase polymerase amplification* - RPA) é uma técnica recente de amplificação isothermal de DNA. A RPA também utiliza pares de *primer* e enzimas DNA polimerase, seu grande diferencial é a exploração da ação de outra enzima chamada recombinase. As recombinases se unem aos *primers* formando um complexo molecular capaz de identificar as sequências alvo do DNA, podendo se parear em sequências de fita dupla. Em seguida, uma proteína chamada SSB (*single-stranded DNA-binding*) se liga à região do pareamento estabilizando a ligação dos *primers*, no qual a polimerase inicia o processo de síntese. Uma outra diferença da RPA é a possibilidade de realizar transcrição reversa de RNA para cDNA durante a amplificação, apenas adicionando a enzima RT junto da solução, sem necessitar de uma etapa anterior apenas para isso (JAMES; MACDONALD, 2015; PIEPENBURG *et al.*, 2006).

4 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Existem diversas metodologias para observar os resultados de uma amplificação. Entre as mais utilizadas está a realização de eletroforese em gel, que consiste em separar as moléculas de uma solução a partir do seu tamanho. A solução é induzida por diferença de potencial fazendo com que as moléculas sejam transportadas através de uma matriz de gel (geralmente agarose ou poliacrilamida), dependendo do tamanho da molécula, ela irá desenvolver uma velocidade diferente pela matriz, onde as moléculas maiores são mais lentas e as moléculas menores são mais rápidas. Dessa forma, ao final da indução, é formado uma coluna com diversas células contendo um aglomerado de moléculas de mesmo tamanho (SOUZA, 2003).

Um significativo avanço para o diagnóstico de patógenos por amplificação de DNA foi o desenvolvimento da PCR em tempo real. Essa técnica, também chamada de PCR quantitativo (qPCR), consiste em adicionar um componente fluorescente à solução que irá emitir luz quando detectar a ocorrência da amplificação do material genético. Os dois componentes mais utilizados nos processos de diagnóstico em tempo real são a SYBR-Green I ® e a TaqMan®. A SybrGreen é um agente intercalante que se liga inespecificamente a moléculas de DNA dupla fita, emitindo luz proporcionalmente à quantidade de DNA presente na solução. Porém, esse agente pode se ligar a qualquer DNA dupla fita, inclusive dímeros de *primers* ou até contaminantes, podendo gerar em certos casos resultados falso positivos. Enquanto, a TaqMan é uma sonda (oligonucleotídeo) específica ao DNA alvo, similar a um *primer*. Ela é

desenvolvida para se ligar somente a um certo trecho do DNA que irá ser replicado, e quando a Taq DNA polimerase encontra essa sonda na fita durante a síntese ela a degrada. Os componentes resultantes da degradação da TaqMan têm a capacidade de emitir luz, fazendo com que essa emissão agora seja proporcional à quantidade de DNA amplificado. Outra característica da TaqMan é a capacidade de serem projetadas para emitir diversas faixas de luz diferentes, possibilitando assim, realizar e detectar em uma mesma solução à amplificação de diversas amostras de DNA distintos, essa técnica é chamada de Multiplex (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010).

5 PATÓGENOS

5.1 VÍRUS

Os vírus são considerados os organismos em maior abundância no ecossistema aquático e também essenciais para seu equilíbrio. Por isso, o estudo e entendimento desses seres são importantes alavancadores no avanço tecnológico da aquicultura marinha e continental. Nos últimos anos as ferramentas de biologia molecular têm oferecido grande suporte para entender e controlar esses agentes (JACQUET *et al.*, 2010).

Esses micro-organismos podem possuir diversas características na organização do seu genoma, podendo apresentar DNA ou RNA sendo eles em fita-dupla ou fita-simples (CANN, 2015). Para a detecção de vírus com RNA é necessário primeiramente realizar a síntese de cDNA através da transcrição reversa RT, pois ele não é um bom receptor para a Taq DNA polimerase (ARTIKA; IYATNO; MA'ROEF, 2020). A aplicação da RT para realização da PCR é denominada de RT-PCR.

O desenvolvimento e aplicação de metodologias moleculares têm impulsionado o avanço da compreensão, manejo e controle na epidemiologia dos principais vírus patógenos de salmonídeos como alphavirus salmonídeo (SAV), vírus da anemia infecciosa do salmão (ISAV) e vírus da septicemia hemorrágica viral (VHSV) (SNOW, 2011). O estudo dessas doenças tem recebido bastante atenção e novos ensaios, métodos e estudos utilizando variantes da PCR no diagnóstico de SAV (TEIGE *et al.*, 2020), ISAV (PURCELL *et al.*, 2018) e VHSV (PIERCE *et al.*, 2013) demonstrando resultados positivos.

No Arquipélago Shetland, Escócia, foi possível detectar a presença de SAV nos peixes selvagens Solha escura (*Limanda limanda*), Solha-Americana (*Hippoglossoides platessoides*) e Solha europeia (*Pleuronectes platessa*), em amostras de tecido do coração e rim por meio do

PCR em tempo real que teve como alvo o gene nsP1. Esse estudo foi capaz de levantar informações importantes para a discussão sobre a origem da SAV na aquicultura de salmonídeos (SNOW *et al.*, 2010).

Pinheiro *et al.* (2016) desenvolveu um ensaio de multiplex RT-PCR, que é capaz de simultaneamente detectar quatro principais agentes virais da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), sendo eles, vírus da necrose pancreática infecciosa (IPNV), vírus da necrose hematopoiética infecciosa (IHNV) e *sleeping disease virus* (SDV). Pela primeira vez foi registrado co-infecção de VHSV/SDV e IHNV/SDV na truta arco-íris.

As principais doenças que afetam os camarões na aquicultura no mundo são doença da síndrome da mancha branca WSSD, doença da cabeça amarela (YHD), síndrome de taura (TS), necrose hipodérmica e hematopoiética infecciosa (IHHN) e mionecrose infecciosa (IMN), todas essas causadas por vírus. Ainda hoje a PCR tem sido muito utilizada como técnica de diagnóstico para essas doenças (RAJENDRAN *et al.*, 2016).

Novos kits para detecção de vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) em camarões tiveram resultados positivos no Reino Unido, utilizando técnicas baseadas em PCR com o intuito de ser possível realizar o diagnóstico localmente, assim que preciso, com resultados rápidos e eficientes e sem necessidade de laboratórios especializados (MINARDI *et al.*, 2019). Bandeira (2016), teve sucesso na identificação de WSSV em camarão *Palaemon pandaliformis* e moluscos *Pomacea lineata* e *Melanoides tuberculatus*, no Rio Paraíba, no Vale do Paraíba – PB, Brasil, utilizando a técnica LAMP, que pode ser concluída em torno de duas horas, desde a extração do DNA à análise por eletroforese em gel. A técnica LAMP quando comparada com a PCR se mostra mais rápida, sensível, estável e possui mais especificidade, além disso, também é considerada mais barata por não necessitar de aparelhos sofisticados, sendo necessário certas vezes apenas da aplicação de banho-maria (DHAMA *et al.*, 2014).

A técnica LAMP vem ganhando espaço devido suas inúmeras vantagens comparada à PCR, fazendo com que nos últimos anos a aplicação e melhoria desse método venha recebendo mais atenção. Contudo, os métodos utilizados para detecção da amplificação da LAMP em sua maioria são por aplicação de técnicas simples como eletroforese ou adição de agentes fluorescentes como SYBR Green e sondas TaqMan. Para tanto, a avaliação de técnicas alternativas a essas tem surgido bastante e com bons resultados, com promessas de reduzir o tempo e simplificar o processo (DHAMA *et al.*, 2014).

Khunthong *et al.* (2013), desenvolveram um método para detecção do vírus da doença da cabeça amarela (YHD) a partir do produto da técnica LAMP, utilizando um dispositivo de *Lateral-Flow Dipstick* (LFD), que consiste em detectar a presença de uma molécula alvo em

amostra líquida deslocada lateralmente em fluxo laminar. O dispositivo LFD é um aparelho portátil e capaz de gerar resultados rápidos, fáceis de interpretar e com custo menor comparado às técnicas convencionais.

Suebsing, Prombun e Kiatpathomchai (2013), elaboraram ensaio para detecção de *Penaeus vannamei* nodavirus (PvNV) combinando a técnica LAMP com sondas contendo nanopartículas de ouro (gold nanoparticles probe - AuNP). Esse método proporciona a detecção visual para diagnóstico positivo (solução com coloração vermelha) e negativo (solução com coloração azul) de PvNV na amostra, que proporciona ganho significativo de tempo além de apresentar baixo custo para aplicação. Essa técnica se mostrou promissora para detecção simples e rápida para doenças de organismos na aquicultura.

5.2 BACTÉRIAS

Grande parte dos micro-organismos patogênicos que afetam a produção na aquicultura mundial são bactérias. Uma grande parcela da comunidade científica da biologia molecular se dedica ao estudo desses micro-organismos (BIRKBECK; FEIST; VERNER-JEFFREYS, 2011). As bactérias estão presentes em todos os tipos de ambientes e sobrevivem bem no meio aquático. O grande crescimento da aquicultura mundial levou a ocorrência de vários surtos de doenças causadas por bactérias, resultando em perdas bilionárias por todo o mundo, provocando incentivo para o entendimento e controle desse grupo (PRIDGEON; KLESIUS, 2012).

As bactérias em geral possuem duas estruturas responsáveis por conter suas informações genéticas, são elas o cromossomo bacteriano, também chamado de nucleóide, e os plasmídeos. Ambos são moléculas de DNA dupla fita geralmente circular, onde o nucleóide possui genes responsáveis pela síntese de proteínas essenciais para a célula e os plasmídeos são bem menores e contém apenas genes que codificam proteínas relacionadas à alguma vantagem adaptativa como por exemplo resistência a certos antibióticos (SHAKIBAIE, 2009).

As vantagens que as técnicas de diagnóstico molecular apresentam tem atraído os olhares de profissionais da área da microbiologia. Os resultados que a PCR e suas variantes vem demonstrando, só reforçam a ideia de sua capacidade de ser altamente sensível e prática (AUSTIN; AUSTIN, 2016).

Em particular, o estudo da *Aeromonas salmonicida* nos últimos anos recebeu bastante atenção. A aplicação e desenvolvimento de ensaios de PCR em tempo real para a detecção desse organismo vem sendo muito comum (BARTKOVA *et al.*, 2017). Fernandez-Alvarez, Gonzalez e Santos (2016) foram os primeiros a registrar o uso dessa técnica para detecção de A.

salmonicida utilizando SYBR green I, ambos apresentando como resultado alta especificidade e velocidade de detecção.

Borrell *et al.* (1997) foram os primeiros a aplicar a técnica de polimorfismo de comprimentos de fragmentos de restrição (RFLP) em conjunto à PCR para diferenciar espécies de *Aeromonas*. Esse método se baseava em aplicar a RFLP utilizando o gene 16S rRNA, que é uma subunidade dos ribossomos de procariontes que apresenta baixa taxa de evolução no gene, havendo assim bastante utilidade em estudos de filogenética. Posteriormente muitos trabalhos similares foram publicados utilizando ainda esse mesmo gene para diferenciação de *Aeromonas* (GHATAK; AGARWAL; BHILEGAONKAR, 2007).

Recentemente Puaa *et al.* (2018), desenvolveu um ensaio de PCR-RFLP para diferenciação das espécies desse gênero, porém, utilizou como alvo o gene de manutenção *rpoD* (RNA polymerase D subunit) que foi capaz de diferenciar 27 espécies de *Aeromonas*. Os autores afirmam que o uso do *rpoD* como alvo pode ser uma alternativa rápida, confiável e menos trabalhosa para o gene 16S rRNA.

Os genes do RNA ribossômico nos procariontes, assim como nos eucariontes, possuem regiões altamente conservadas que possuem potencial para identificar e classificar bactérias que não são cultiváveis em condições *in vitro* (DONG *et al.*, 2017). Entretanto, esse método pode não ser eficaz na tentativa de diferenciação de espécies muito próximas, pois apresentam similaridade quase idêntica dessa sequência genética, assim como em algumas espécies de *Vibrio* (THOMPSON *et al.*, 2009).

O uso de DNA de plasmídeos pode ser capaz de auxiliar na diferenciação de grupos de organismos muito próximos. Schikorski *et al.* (2013) desenvolveram um ensaio de PCR em tempo real sensível apenas para *Vibrio harveyi* em contraste com outras espécies próximas (*Vibrio brasiliensis*, *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio mytili*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio coralliilyticus*) extraídos de abalone *Haliotis tuberculata*. Utilizando em conjunto outro par de *primer* que possui como alvo o plasmídeo pVCR1, foi possível detectar a cepa ORM4 de *V. harveyi* diferenciando de outras como LEM/07/001, LEM/07/004, LEM/07/012 e LEM/07/013. Segundo Travers (2008), só há registros da presença do plasmídeo pVCR1 na cepa específica ORM4 patogena para *H. tuberculata*.

O uso da PCR em tempo real tem apresentado ser muito eficaz na identificação de *Vibrio* em moluscos. McCleary e Henshilwood (2015), reproduziram satisfatoriamente a técnica para detectar *Vibrio aestuarianus* em ostra-do-pacífico (*Crassostrea gigas*). Este molusco está entre as espécies mais importantes cultivadas na aquicultura mundialmente e o poder de controle de patógenos que os diagnósticos moleculares proporcionam, junto com sua praticidade,

velocidade e baixo custo, são grandes aliados para o desenvolvimento econômico dessa área no mundo (WIJSMAN *et al.*, 2019).

Modelos de diagnóstico molecular isotermiais como exemplo a LAMP tem mostrado ser os favoritos nos laboratórios que realizam essas análises, principalmente pelo fato de não necessitarem de termocicladores (CRAW; BALACHANDRAN, 2012). Nos últimos anos, a RPA que também opera isotermicamente, está sendo bastante usada para diagnóstico de bactérias. Na aquicultura, a técnica RPA foi otimizada para detectar a presença de *V. parahaemolyticus*, o ensaio apresentou ótimos resultados quando aplicado em amostras de molusco chinês (*Sinoavacula constricta*), mexilhão (*Mytilus edulis*), *Scapharca subcrenata*, molusco preto (*Cyclina sinensis*) e berbigão (*Venerupis philippinarum*), a análise teve duração de trinta minutos e promete bom desempenho para o diagnóstico quando se tem pouco recurso disponível (ZHU *et al.*, 2018). A RPA também possui potencial para controle e segurança de alimentos, sua aplicação obteve bons resultados detectando presença de *V. vulnificus* em amostras de frutos do mar frescos infectados, com tempo de análise entre 2 e 14 minutos (YANG *et al.*, 2020).

A técnica de RPA além de isotérmica, possui faixa de temperatura bem baixa para iniciar a reação, geralmente entre 35°C e 40°C (PIEPENBURG *et al.*, 2006). Essa característica reduz ainda mais os custos de operação da análise. Porém, a RPA é relativamente nova e possui baixa especificidade para diferenciar sequências muito parecidas, podendo resultar em altas taxas de falsos positivos e negativos nesses casos (ZOU, MANSON; BOTELA, 2020).

Para realizar análises Multiplex, as técnicas PCR e LAMP ainda são as mais utilizadas. Yu *et al.* (2013) obtiveram sucesso ao desenvolver um ensaio de LAMP para trabalhar com três espécies de *Vibrio* em uma mesma reação. E sua metodologia foi capaz de detectar simultaneamente *V. harveyi*, *Vibrio anguillarum* e *V. alginolyticus* com sensibilidade 10^3 vezes maior que PCR. A técnica multiplex para diagnóstico simultâneo de bactérias pode apresentar resultados tão bons quanto às análises individuais convencionais (CHAPELA *et al.*, 2018).

Utilizando a técnica chamada microarranjo de DNA, em conjunto à PCR, foi possível discriminar simultaneamente oito patógenos de peixes (*Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Lactococcus garvieae*, *Photobacterium damsela*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Streptococcus iniae* e *V. anguillarum*) (CHANG *et al.*, 2012). Esse modelo consiste em quantificar e diferenciar moléculas alvo marcadas com sondas amplificadas por PCR, assim sendo possível detectar vários patógenos ao mesmo tempo (YOO; LEE, 2008). Porém, essa técnica necessita de equipamentos sofisticados presentes apenas em laboratórios especializados. Zhou *et al.* (2014) propõe uma opção mais barata e acessível

aplicando o método de microfluidos para o diagnóstico de vários patógenos, em que foi possível a realização de uma Multiplex-LAMP detectando 10 espécies de bactérias distintas (*Nocardia seriolae*, *Pseudomonas putida*, *S.iniae*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *Vibrio fluvialis*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. rotiferianus* e *Vibrio vulnificus*).

A bactéria *Renibacterium salmoninarum* é o agente causador da doença bacteriana renal (*bacterial kidney disease* - BKD) que afeta salmonídeos, podendo causar altas taxas de mortalidade em fazendas. O mecanismo de ação desse organismo ainda não é muito bem compreendido, e as metodologias moleculares podem auxiliar no diagnóstico precoce da doença (DELGHANDI; EL-MATBOULI; MENANTEAU-LEDOUBLE, 2020). A eficiência da PCR em tempo real para detectar *R. salmoninarum* foi demonstrada a partir dos bons resultados encontrados (PURCELL *et al.*, 2011). Saleh, Soliman e El-Matbouli (2008) demonstraram a aplicação da LAMP, justificando a viabilidade da técnica no diagnóstico rápido e barato.

5.3 FUNGOS

O uso de plantas e cereais como alimento na aquicultura é bem comum, porém essa ação pode transportar contaminantes como fungos para o sistema de cultivo aquícola (EMBABY *et al.*, 2015). Viegas *et al.* (2019), realizaram diagnóstico molecular por qPCR como etapa para montar um mapeamento da carga fúngica presente no tratamento alimentar utilizado no cultivo de ouriço do mar (*Paracentrotus lividus*) e pepino do mar (*Holothuria tubulosa*).

A Saprolegniose é uma doença causada por organismos do gênero *Saprolegnia*. Esse patógeno normalmente afeta animais aquáticos tanto marinhos quanto de água doce, podendo causar lesões superficiais na pele e brânquias (YANONG, 2003). A condução de diagnósticos por PCR utilizando como sequências alvo os espaçadores internos transcritos (Internal transcribed spacer - ITS) dos genes de RNA ribossomais (rRNA) são ferramentas úteis para a identificação desses organismos. Jaies *et al.* (2020) utilizaram *primers* para detectar a presença das regiões ITS₁ e ITS₂ do gene ribossomal da espécie *Saprolegnia parasitica* em amostras de tecido de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). A utilização de ITS como marcadores para *primers* em qPCR e qLAMP podem ser utilizadas para quantificar os níveis de presença de *Saprolegnia sp.* em uma amostra de água de sistemas de aquicultura (GHOSH, 2019). O uso de ITS₁e ITS₂ assim como o gene 5.8S rRNA também é aplicado para detectar presença de *Aphanomyces astaci* por PCR (REZINCIUC *et al.*, 2014).

O microsporídeo *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) é o causador da doença microsporidiose hepatopancreática (Hepatopancreatic microsporidiosis - HPM). Recentemente têm sido reportado crescente presença deste organismo em cultivos de camarões peneídeos (*Penaeus monodon* e *Penaeus vannamei*) (SRITUNYALUCKSANA *et al.*, 2014). Tang *et al.* (2015) desenvolveram um ensaio de PCR que possui como alvo a região do gene 18S rRNA de EHP, foi possível detectar a presença do parasita em amostras de tecido, fezes e água de cultivo. Foi desenvolvido uma qPCR utilizando SYBR Green I para detectar amostras contaminadas com EHP (LIU *et al.*, 2016). Foi possível realizar diagnóstico de EHP em *P. vannamei* desenvolvendo ensaio de qPCR possuindo como alvo subunidade ribossomal de DNA SSU (small subunit rDNA), utilizando TaqMan como sonda (LIU *et al.*, 2018). A detecção de EHP foi através da técnica qLAMP que é possível ser finalizada com eficácia em aproximadamente vinte minutos sem nenhum tipo de equipamento especial, apresentando grande potencial para análises em locais próximo à cultivos (MA *et al.*, 2019).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os custos para realização de diagnósticos moleculares mais convencionais como a PCR ainda são bem altos. A necessidade do uso de equipamentos sofisticados dificulta a acessibilidade da técnica, assim como o elevado preço dos reagentes necessários para a amplificação. Entretanto, conforme o tamanho do sistema de cultivo e o valor investido no negócio, pode ser justificável a aplicação dessas técnicas para o controle e mitigação de surtos de doenças com o propósito de diminuir os riscos de perdas por mortalidade. Mesmo que com preço elevado, a PCR apresenta eficiência muito mais elevada que os métodos convencionais de diagnóstico, os resultados ficam prontos muito mais rápido, além de garantir resultados muito mais confiáveis. As técnicas de diagnóstico molecular estão caminhando para alcançarem patamar mais simples e acessível, possibilitando o diagnóstico de patógenos em campo ser mais eficiente. O surgimento das técnicas isotérmicas como LAMP e RPA mudaram a ideia de alto custo para os diagnósticos moleculares. A capacidade de serem conduzidas sem a oscilação de temperatura removeu a necessidade do uso de termocicladores para a prática. Em particular, a RPA apresenta simplicidade ainda maior na sua aplicação, que é a capacidade de ser realizada em temperatura ambiente. Contudo, essas técnicas até então são muito novas, necessitando da definição de metodologias para diagnóstico de uma diversidade de organismos.

O desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico molecular de patógenos na aquicultura está em constante avanço. O aprimoramento das ferramentas existentes e o

desenvolvimento de novas técnicas estão proporcionando análises bem mais simples, rápidas, baratas e eficientes. Porém, a aplicação dessas técnicas ainda é majoritariamente presente na área da pesquisa e pouco aplicadas em campo. Mesmo com o aumento da simplicidade das ferramentas, em geral, ainda são populares muitos diagnósticos moleculares mais convencionais que necessitam de entendimento técnico sobre o assunto.

Como obstáculo, é necessário que se tenha conhecimento e experiência na área principalmente para realizar o desenvolvimento de *primers*, no preparo dos materiais e nas análises dos resultados, o que pode causar desinteresse na implementação dessas práticas nos setores aquícolas de menor porte. Porém, cada vez mais os métodos moleculares estão sendo capazes de serem realizados sem equipamentos sofisticados, com poucas etapas, mais rápidos e com resultados mais simples de observar. Foi mostrado que é possível o desenvolvimento de kits prontos, técnicas isotérmicas e colorimétricas para facilitar o processo de diagnóstico, dessa forma, o fomento para desenvolvimento e pesquisa nesse âmbito pode ser um grande aliado para a popularização dessa prática na aquicultura.

Atualmente, as ferramentas para diagnóstico molecular de patógenos na aquicultura apresentam ótima aplicabilidade no setor. As análises oferecem resultados muito mais rápidos, com especificidade e sensibilidade na detecção de organismos patogênicos. As bases de dados genéticos e softwares para desenvolvimento de ensaios que existem hoje são essenciais para realização das técnicas de amplificação. O nível tecnológico em que o mundo se encontra hoje é ideal para se trabalhar com metodologias moleculares devido a grande carga de dados e análises que são possíveis de serem realizadas.

Nos últimos anos, o número de publicações aplicando novas técnicas de diagnóstico molecular na aquicultura e a diversificação de estudos de diferentes patógenos, vem aumentando consideravelmente. Porém, o número de publicações resumindo e descrevendo essas técnicas e também a aplicação das mesmas em fazendas de cultivo, são baixos. Entretanto, o diagnóstico molecular de patógenos vem aos poucos ganhando seu espaço na aquicultura. O incentivo para adoção dessas técnicas no controle de doenças em cultivos e publicação dos resultados, principalmente econômicos, podem ajudar a estimular sua aplicação no setor.

7 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. *et al.* **Molecular biology of the cell**. 6. ed. New York: Garland Science, 2017. 1464 p.

- ARTIKA, I. M.; WIYATNO, A.; MA'ROEF, C. N. Pathogenic viruses: molecular detection and characterization. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 81, 104215, 2020.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish**. 6. ed. Dordrecht: Springer, 2016. 732 p.
- BANDEIRA, J. **Vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) em crustáceos e moluscos nativos no rio Paraíba – PB**. 2016. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.
- BARTKOVA, S. *et al.* Detection and quantification of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by real-time PCR. **Journal of Fish Diseases**, v. 40, n. 2, p. 231-241, 2017.
- BIRKBECK, T. H.; FEIST, S. W.; VERNER-JEFFREYS, D. W. *Francisella* infections in fish and shellfish. **Journal of Fish Diseases**, v. 34, n. 3, p. 173-187, 2011.
- BORRELL, N. *et al.* Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1671-1674, 1997.
- CANN, A. J. **Principles of molecular virology**. 6.ed. Cambridge: Academic Press. 2015. 318 p.
- CHANG, C. I. *et al.* Simultaneous detection of multiple fish pathogens using a naked-eye readable DNA microarray. **Sensors**, v. 12, n. 3, p. 2710-2728, 2012.
- CHAPELA, M. J. *et al.* Application of real-time PCR for early diagnosis of diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, and *Tenacibaculum maritimum* in turbot: a field study. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 30, n. 1, p. 76-89, 2018.
- CHESTER, N.; MARSHAK, D. R. Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 209, n. 2, p. 284-290, 1993.
- CRAW, P.; BALACHANDRAN, W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 14, p. 2469-2486, 2012.
- DELGHANDI, M. R.; EL-MATBOULI, M.; MENANTEAU-LEDOUBLE, S. *Renibacterium salmoninarum* - the causative agent of bacterial kidney disease in salmonid fish. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 1-19, 2020.
- DHAMA, K. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 2, p. 151-166, 2014.
- DONG, H. T. *et al.* Recovery of *Vibrio harveyi* from scale drop and muscle necrosis disease in farmed barramundi, *Lates calcarifer* in Vietnam. **Aquaculture**, v. 473, p. 89-96, 2017.

EMBABY, E. M. *et al.* Mycoflora and mycotoxin contaminated chicken and fish feeds. **Middle East Journal of Applied Sciences**, v. 5, n. 04, p. 1044-1054, 2015.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). **The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA): Sustainability in action**. Roma: Food and Agriculture Organization, 2020. 244 p.

FERNANDEZ-ALVAREZ, C.; GONZALEZ, S. F.; SANTOS, Y. Development of a SYBR green I real-time PCR assay for specific identification of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 10585-10595, 2016.

GHATAK, S.; AGARWAL, R. K.; BHILEGAONKAR, K. N. Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 550-554, 2007.

GHOSH, S. **Molecular detection and quantification of the fish pathogen *Saprolegnia* spp. using qPCR and loop mediated isothermal amplification**. 2019. 125 f. Dissertação (Pós Doutorado em Ciências Biológicas) - Bowling Green State University, Ohio, 2019.

JACQUET, S. *et al.* Viruses in aquatic ecosystems: important advancements of the last 20 years and prospects for the future in the field of microbial oceanography and limnology. **Advances in Oceanography and Limnology**, v. 1, n. 1, p. 97-141, 2010.

JAIES, I. *et al.* PCR based identification of *Saprolegnia parasitica* affecting *Rainbow trout* aquaculture in Kashmir region of Indian Himalayas. **Indian Journal of Animal Research**, v. 54, n. 9, p. 1149-1154, 2020.

JAMES, A.; MACDONALD, J. Recombinase polymerase amplification: emergence as a critical molecular technology for rapid, low resource diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 15, n. 11, p. 1475–1489, 2015.

KHUNTHONG, S. *et al.* Rapid and sensitive detection of shrimp yellow head virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. **Journal of Virological Methods**, v. 188, n. 1-2, p. 51-56, 2013.

LIMA, L. M. **Conceitos básicos de técnicas em biologia molecular**. 1. ed. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. 27 p.

LIU, Y. M. *et al.* Quantitative detection method of *Enterocytozoon hepatopenaei* using TaqMan probe real-time PCR. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 151, p. 191-196, 2018.

LIU, Z. *et al.* Development of real-time PCR assay for detecting microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the application in shrimp samples with different growth rates. **Progress in Fishery Sciences**, v. 37, n. 2, p.119-126, 2016.

MA, B. *et al.* Employing DNA binding dye to improve detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in real-time LAMP. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2019.

- MCCLEARY, S.; HENSHILWOOD, K. Novel quantitative TaqMan MGB real-time PCR for sensitive detection of *Vibrio aestuarianus* in *Crassostrea gigas*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 114, n. 3, p. 239-248, 2015.
- MCPHERSON, M. J.; QUIRKE, P.; TAYLOR, G. R. **PCR: a practical approach**. 1. ed. Oxford: Oxford University Press, 1991. 253 p.
- MINARDI, D. *et al.* Testing of a pond-side molecular diagnostic tool for the detection of white spot syndrome virus in shrimp aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, n. 1, p. 18-33, 2019.
- NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, p. 7-19, 2010.
- NOTOMI, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. 1-7, 2000.
- PAVAN, M. G.; MONTEIRO, F. A. Técnicas moleculares aplicadas à sistemática e ao controle vetorial. In: GALVÃO, C. **Vetores da doença de Chagas no Brasil**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. p. 241-260.
- PIEPENBURG, O. *et al.* DNA detection using recombination proteins. **PLoS Biology**, v. 4, n. 7, p. 1-7. 2006.
- PIERCE, L. R. *et al.* Accurate detection and quantification of the fish viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) with a two-color fluorometric real-time PCR assay. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. 1-12, 2013.
- PINHEIRO, A. C. A. S. *et al.* Development of a multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of the major viruses that affect rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International**, v. 24, p. 155-125, 2016.
- PRIDGEON, J. W.; KLESIUS, P. H. Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. **CAB Reviews**, v. 7, n. 48, p. 1-16, 2012.
- PUAH, S. M. *et al.* Development of a species-specific PCR-RFLP targeting rpoD gene fragment for discrimination of *Aeromonas* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 1271-1278, 2018.
- PURCELL, M. K. *et al.* Molecular testing of adult Pacific salmon and trout (*Oncorhynchus* spp.) for several RNA viruses demonstrates widespread distribution of piscine orthoreovirus in Alaska and Washington. **Journal of fish diseases**, v. 41, n. 2, p. 347-355, 2018.
- PURCELL, M. K. *et al.* Quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of aquatic animal pathogens in a diagnostic laboratory setting. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 23, n. 3, p. 148-161, 2011.

RAJENDRAN, V. *et al.* Collection, preservation and processing of shrimp samples for detection of pathogens by PCR. **Central Institute of Brackishwater Aquaculture**, v. 75, p. 32-39, 2016.

RAMSDEN, J. **Bioinformatics**: an introduction. 2. ed. London: Springer, 2009. 308 p.

REZINCIUC, S. *et al.* AFLP-PCR and RAPD-PCR evidences of the transmission of the pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) to wild populations of European crayfish from the invasive crayfish species, *Procambarus clarkii*. **Fungal Biology**, v. 118, n. 7, p. 612-620, 2014.

RYE, C. *et al.* **Biology**. 1. ed. Houston: OpenStax, 2013. 1425 p.

SALEH, M.; SOLIMAN, H.; EL-MATBOULI, M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 81, n. 2, p. 143-151, 2008.

SCHIKORSKI, D. *et al.* Development of TaqMan real-time PCR assays for monitoring *Vibrio harveyi* infection and a plasmid harbored by virulent strains in European abalone *Haliotis tuberculata* aquaculture. **Aquaculture**, v. 392-395, p. 106-112, 2013.

SHAKIBAIE, M. R. **Principle of basic molecular bacteriology**. 1. ed. Kerman: Kerman University of Medical Sciences, 2009. 122 p.

SIQUEIRA, T. V. Aquicultura: a nova fronteira para aumentar a produção mundial de alimentos de forma sustentável. **Boletim Regional, Urbano e Ambiental – IPEA**, v. 17, p. 53-60, 2017.

SNOW, M. *et al.* Detection of salmonid alphavirus RNA in wild marine fish: implications for the origins of salmon pancreas disease in aquaculture. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 91, n. 3, p.177-188, 2010.

_____. The contribution of molecular epidemiology to the understanding and control of viral diseases of salmonid aquaculture. **Veterinary Research**, v. 42, n. 56, p. 1-12, 2011.

SOUZA, M. T. Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose: In: AZEVEDO, M. O. *et al.* **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília: Universidade de Brasília, 2003. 211 p.

SRITUNYALUCKSANA, K. *et al.* **Urgent appeal to control spread of the shrimp microsporidian parasite *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)**. Thailandia: Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, 2014. Disponível em: <<https://enaca.org/?id=101&title=urgent-appeal-to-control-spread-of-the-shrimp-microsporidian-parasite-enterocytozoon-hepatopenaei-ehp>>. Acesso em 24 jun. 2021.

STENTIFORD, G. D. *et al.* New paradigms to help solve the global aquaculture disease crisis. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. 1-6, 2017.

SUEBSING, R.; PROMBUN, B.; KIATPATHOMCHAI, W. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) combined with colorimetric gold nanoparticle

(AuNP) probe assay for visual detection of *Penaeus vannamei* nodavirus (PvNV). **Letters in Applied Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 428-435, 2013.

TANG, K. F. J. *et al.* Development of in situ hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 130, p. 37-41, 2015.

TAVECHIO, W. L. G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335-341, 2009.

TEIGE, L. H. *et al.* Detection of specific Atlantic salmon antibodies against salmonid alphavirus using a bead-based immunoassay. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 106, p. 374-383, 2020.

THOMPSON, C. C. *et al.* Genomic taxonomy of vibrios. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2009.

TRAVERS, M. A. **Interaction de la bactérie *Vibrio harveyi* avec son hôte, l'ormeau *Haliotis tuberculata*: approches physiologiques, cellulaires et moléculaires**. 2008. 266 f. Tese (Doutorado em Ciências do Mar) – Escola de Doutorado de Ciências do Mar, Université de Bretagne Occidentale, Brest. 2008.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3-new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. 1-12, 2012.

VIEGAS, C. *et al.* Fungal diversity and mycotoxin distribution in echinoderm aquaculture. **Mycotoxin Research**, v. 35, n. 3, p. 253-260, 2019.

WAGENER, C. Molecular diagnostics. **Journal of Molecular Medicine**, v. 75, p. 728-744, 1997.

WIJSMAN, J. W. M. *et al.* Global production of marine bivalves. Trends and challenges. In: SMAAL, A. C. *et al.* **Goods and services of marine bivalves**. Cham: Springer, 2019. p. 7-26.

YANG, X. *et al.* A real-time recombinase polymerase amplification method for rapid detection of *Vibrio vulnificus* in seafood. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1-8 2020.

YANONG, R. P. E. Fungal diseases of fish. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 6, n. 2, p. 377-400, 2003.

YOO, S. M.; LEE, S. Y. Diagnosis of pathogens using DNA microarray. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 124-129, 2008.

YU, L. *et al.* Development of a triplex loop-mediated isothermal amplification method for rapid on-site detection of three *Vibrio* species associated with fish diseases. **Aquaculture**, v. 414, p. 267-273, 2013.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica**, 4. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2012. 415 p.

ZHOU, Q. J. *et al.* Development and evaluation of a real-time fluorogenic loop-mediated isothermal amplification assay integrated on a microfluidic disc chip (on-chip LAMP) for rapid and simultaneous detection of ten pathogenic bacteria in aquatic animals. **Journal of Microbiological Methods**, v. 104, p. 26-35, 2014.

ZHU, P. *et al.* Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by real-time recombinase polymerase amplification. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 2076-2084, 2018.

ZOU, Y.; MASON, M. G.; BOTELLA, J. R. Evaluation and improvement of isothermal amplification methods for point-of-need plant disease diagnostics. **PloS one**, v. 15, n. 6, p. 1-19, 2020.

Capítulo 9

Aplicações de técnicas envolvendo PCR no diagnóstico de doenças infecciosas em equinos



Ramila Cristiane Rodrigues¹
Ananda Pereira Aguilar²
Priscila de Oliveira Lorenzoni³
Helvécio Cardoso Corrêa Póvoa⁴
Tiago Antônio de Oliveira Mendes⁵
Adilson Vidal Costa⁶
Vagner Tebaldi de Queiroz⁷

¹ Universidade Federal de Viçosa, e-mail: ramilarodrigues@yahoo.com.br

² Universidade Federal de Viçosa, e-mail: anandabqi@hotmail.com

³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: priscilalorenzoni@gmail.com

⁴ Universidade Federal Fluminense, e-mail: hpvoa@id.uff.br

⁵ Universidade Federal de Viçosa, e-mail: tiagoamendes@ufv.br

⁶ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: avcosta@hotmail.com

⁷ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: vagner.queiroz@ufes.br

1 INTRODUÇÃO

As infecções em equinos podem apresentar como agentes etiológicos: vírus, fungos, bactérias e protozoários. Considerando que as doenças ocasionadas por esses diferentes micro-organismos podem variar quanto a sua virulência e patogenicidade, o diagnóstico precoce possibilita o início do tratamento e o aumento das chances do sucesso terapêutico. Além disso, o diagnóstico precoce evita a disseminação ampla das doenças, incluindo aquelas provocadas por micro-organismos com maior potencial de virulência e de notificação obrigatória, como as zoonoses (OIE, 2021; RAJAPAKSHA *et al.*, 2019).

As análises laboratoriais associadas aos exames clínicos auxiliam o médico veterinário no diagnóstico precoce das doenças supracitadas. Entre as técnicas de diagnóstico microbiológico, as análises laboratoriais envolvendo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) possibilitam detecção e quantificação altamente sensível, específica e rápida de genomas microbianos. Entretanto, para a obtenção do diagnóstico correto é importante considerar que os resultados obtidos a partir das técnicas envolvendo PCR podem apresentar variações em função das diferentes etapas da análise, entre elas, o preparo e o armazenamento da amostra (BUENO *et al.*, 2020; ZHUSSUPOVA, 2016).

Sendo assim, torna-se fundamental o estabelecimento de procedimentos operacionais padrão para a realização das análises laboratoriais visando minimizar erros durante o processo. Nos Laboratórios Clínicos de Diagnóstico Veterinário são recomendadas a execução das seguintes etapas: 1) fase pré-analítica - precede a análise laboratorial e compreende a requisição do exame, o preparo do animal, a obtenção da amostra, sua conservação e transporte ao laboratório; 2) fase analítica que consiste na etapa técnica do preparo e processamento da amostra e 3) fase pós-analítica que consiste na elaboração e emissão do laudo técnico que será entregue ao médico-veterinário para auxiliar na interpretação dos dados clínicos do animal (BRASIL, 2020).

Neste capítulo será abordado o uso da PCR clássica, bem como os métodos mais modernos da técnica e suas limitações no diagnóstico de doenças provocadas por diferentes agentes etiológicos em equídeos.

2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) foi desenvolvida pelo bioquímico Kary Banks Mullis em 1983, obtendo o reconhecimento ao

ganhar o prêmio Nobel de Química em 1993. A técnica consiste na síntese enzimática *in vitro* de cópias de fragmentos específicos de ácidos nucleicos, de forma logarítmica e controlada, a fim de amplificar o DNA alvo para níveis detectáveis. Por meio de etapas de variação de temperatura, ocorre uma reação em cadeia, na qual uma molécula de DNA é usada para produzir duas cópias, em seguida quatro cópias, depois oito e, assim, sucessivamente (Figura 1) (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

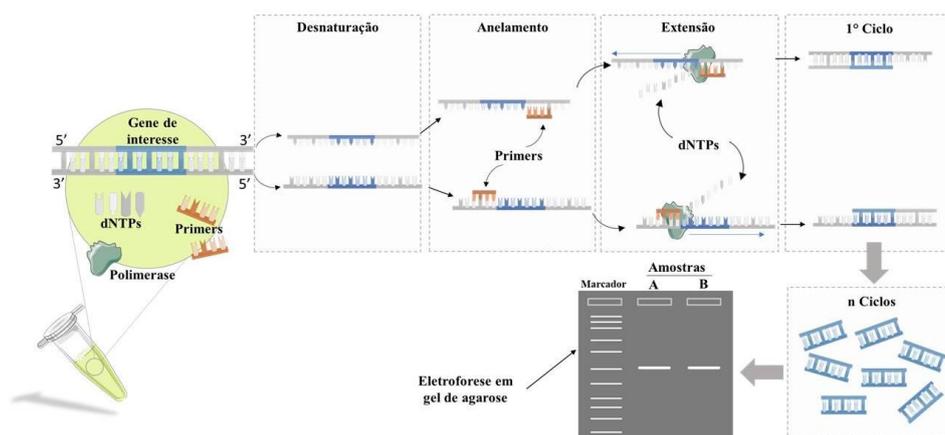


Figura 1 – Etapas da PCR: desnaturação, anelamento e extensão de amostras de DNA presentes na reação, resultando em múltiplas cópias de regiões específicas. A análise do produto amplificado é realizada através de eletroforese em gel de agarose.

Fonte: Os autores.

A realização da PCR requer: 1) DNA previamente extraído, que contém a amostra de DNA alvo a ser amplificado; 2) *Primers* - sequência de iniciadores específicos utilizado, em pares, para hibridizar com o DNA da amostra e definir a região do DNA que será amplificada; 3) Enzima Taq polimerase ou outra DNA-polimerase utilizada na polimerização de novas cadeias de DNA; 4) Desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) a partir dos quais a DNA polimerase sintetiza uma nova fita de DNA; 5) Solução tampão que assegura condições adequadas para a atividade e estabilidade enzimática; 6) Cátions bivalentes, tais como íons de magnésio ou manganês, utilizados como cofator para a Taq DNA polimerase; 7) Cátions monovalentes, sendo tipicamente usado íons de potássio (HAAS; TORRES, 2016; ZHUSSUPOVA, 2016).

Tipicamente, a PCR consiste de uma série de 20-40 variações repetidas de temperaturas, chamadas ciclos, com cada ciclo comumente consistindo de 2-3 estágios de temperatura distintos. As temperaturas usadas e a duração em cada ciclo dependem de parâmetros como a

enzima usada para a síntese de DNA, a concentração de íons divalentes e dNTPs na reação e da temperatura de anelamento (HAAS; TORRES, 2016; ZHUSSUPOVA, 2016).

O processo *in vitro* consiste nas seguintes etapas:

- **Etapa de inicialização** (apenas necessária para polimerases de DNA que requerem ativação por calor): esta etapa consiste em aquecer o meio reacional à temperatura de 94-96 °C (ou 98 °C, se forem utilizadas polimerases extremamente termostáticas) por 1-9 minutos (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

- **Etapa de desnaturação**: consiste em aquecer a reação a 94-98 °C por 20-30 segundos, resultando na separação, ou desnaturação, das fitas de DNA. Isso produz um molde de fita simples para a próxima etapa (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

- **Etapa de anelamento**: a temperatura da reação é reduzida para 50-65 °C durante 20-40 segundos, permitindo o anelamento dos *primers* às suas sequências complementares no DNA molde de fita simples. A temperatura de anelamento usada na PCR depende do comprimento e composição (conteúdo de citosina/guanina) dos *primers* (HAAS; TORRES, 2016; WARFORD *et al.*, 1988), sendo recomendado que a temperatura de anelamento seja 1 a 5 °C abaixo do valor de T_m (*melting temperature*). T_m é a temperatura na qual 50% das moléculas do conjunto *primer*/DNA estão separadas e as outras 50% ainda estão hibridizadas (BAUMFORTH *et al.*, 1999; HAAS; TORRES, 2016). O uso de temperatura de anelamento muito baixa resulta na amplificação de fragmentos inespecíficos, enquanto que temperatura de anelamento muito acima da T_m , pode impedir o anelamento dos *primers*, resultando em pouco ou nenhum produto amplificado (BAUMFORTH *et al.*, 1999).

- **Etapa de extensão/ alongamento**: a temperatura neste passo depende da DNA polimerase utilizada; embora a temperatura de 72 °C seja comumente usada. Nesta etapa, a DNA polimerase sintetiza uma nova fita de DNA complementar à fita molde de DNA, adicionando dNTPs que são complementares a fita molde no sentido 5' a 3'. O tempo de extensão e alongamento depende da DNA polimerase usada e do comprimento do fragmento de DNA a ser amplificado (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

As etapas de desnaturação, anelamento e alongamento constituem um único ciclo. A repetição dessas etapas, por cerca de 20 a 40 ciclos, permite a amplificação de milhares de segmentos específicos de DNA (PASSAGLIA; ZAHA, 2001). A fórmula usada para calcular o número de cópias de DNA formado após um determinado número de ciclos é 2^n , onde n é o número de ciclos. A cada ciclo, a quantidade de fragmentos de DNA na reação dobra (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

- **Alongamento final:** esta etapa é normalmente realizada à temperatura de 70-74 °C durante 5-15 minutos após o último ciclo de PCR, para garantir que todo o DNA de fita simples remanescente seja completamente alongado (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

- **Resfriamento (etapa final):** consiste em resfriar a reação a 4–15 °C por tempo indeterminado, e pode ser empregado para o armazenamento a curto prazo dos produtos de PCR (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Para verificar se a PCR gerou o fragmento de DNA esperado, o produto pode ser analisado por meio de eletroforese em gel de agarose. A eletroforese permite a separação de fragmentos de DNA de acordo com seu tamanho por meio de uma matriz de gel. Moléculas menores se movem mais rápido quando comparado às moléculas maiores, devido sua facilidade de migrarem através dos poros do gel. O tamanho do produto de PCR é determinado por comparação com um marcador de peso molecular, que são fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos e comercialmente disponíveis (MADDOCKS; JENKINS, 2017).

2.1 PCR MULTIPLEX

A PCR multiplex consiste em uma PCR em que dois ou mais alvos são detectados na mesma reação, sendo possível avaliar a expressão de vários genes ao mesmo tempo ou genes de origens múltiplas na mesma amostra (Figura 2).

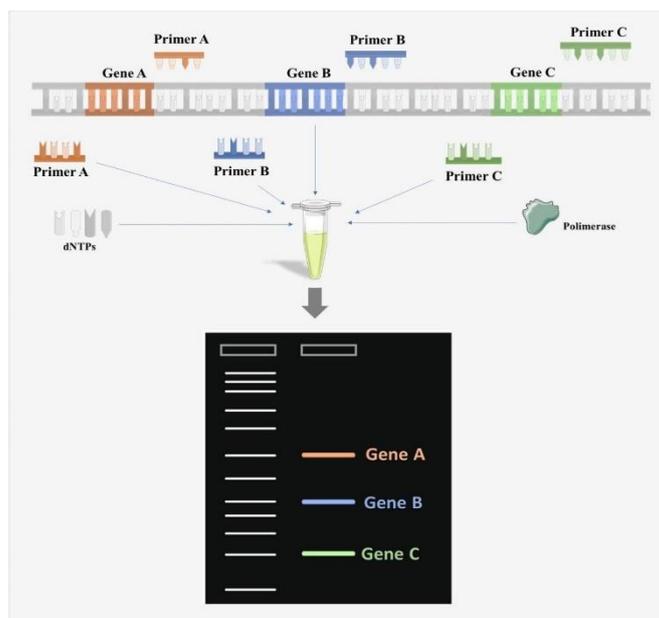


Figura 2 – Visão geral do sistema de PCR multiplex.

Fonte: Os autores.

Nesse caso, dois ou mais pares de *primers* são usados em uma única reação, permitindo amplificação de vários alvos de DNA. Esta abordagem possibilita a utilização de menor quantidade de DNA molde para o diagnóstico o que, contribui para a redução do tempo de análise e, conseqüentemente, para a diminuição de custos (SINT; RASO; TRAUGOTT, 2012).

Por outro lado, as condições de reação para a utilização de dois ou mais conjuntos de *primers* em uma mesma reação deve ser otimizado para minimizar as interações entre *primers* e falsos alvos de DNA. Além disso, como múltiplos alvos são amplificados num único tubo simultaneamente, é importante que os *primers* de um alvo não interajam com outros alvos ou *primers*. Caso ocorra interações, a amplificação poderá ser afetada (LEE; SHIN; ZHANG, 2007; PESTANA *et al.*, 2010).

O sistema de PCR multiplex tem sido usado como um método valioso para diagnóstico e identificação de patógenos tais como de bactérias, fungos e vírus de interesse em veterinária, fornecendo a capacidade de detectar mais de um agente infeccioso em um único ensaio (PESTANA *et al.*, 2010). Como vários alvos são usados para a identificação, a confiança dos resultados é maior quando comparado aos ensaios de PCR convencional (SINT; RASO; TRAUGOTT, 2012). Métodos que produzem resultados em uma única reação são altamente propensos a resultados falsos negativos, que são menos prováveis de ocorrer em PCR multiplex com várias regiões-alvo para cada patógeno (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

2.2 PCR EM TEMPO REAL

A PCR em tempo real surgiu no início da década de 1990 com o propósito de monitorar o progresso de amplificação de fragmentos de DNA em tempo real e sem a necessidade de etapas pós amplificação como a corrida em gel de agarose (VALASEK; REPA, 2005). Por ser uma técnica mais sensível, esta possibilita a detecção de ácidos nucleicos em níveis bem inferiores aos detectados pela PCR convencional (RAJAPAKSHA, 2019; VALASEK; REPA, 2005).

O instrumento utilizado para o desenvolvimento da PCR em tempo real (qPCR) é composto por um termociclador acoplado a uma fonte de luz de excitação (lâmpada, laser ou LED), sistema de detecção de fluorescência e um *software* que registra os dados de fluorescência construindo uma curva de amplificação de DNA (NAVARRO *et al.*, 2015). A intensidade de fluorescência é diretamente proporcional a quantidade de produto amplificado (RAJAPAKSHA, 2019) e refere-se à quantidade de molécula de DNA dupla fita em determinado momento (KRALIK; RICCHI, 2017).

O gráfico de amplificação da PCR em tempo real apresenta uma curva sigmoidal, composta por uma fase de linha de base, fase exponencial e o platô (QUAN; SAUZADE; BROUZES, 2018) (Figura 3A). O *software* acoplado ao instrumento gera uma linha na fase exponencial de amplificação conhecida como *threshold* e o valor de Ct, utilizado na análise dos dados, corresponde ao número de ciclos que a amostra foi submetida até atingir essa linha. Quanto maior a quantidade de alvo de DNA como material inicial, mais rápido o sinal de fluorescência aparece, produzindo um menor valor Ct (WONG; MEDRANO, 2005).

Os fragmentos de DNA amplificados podem ser visualizados por meio de corantes fluorescentes, não específicos e intercalantes de DNA dupla fita (dsDNA), como SYBR green I ou por meio de sondas oligonucleotídicas marcadas com fluorescência como sonda TaqMan (KRALIK; RICCHI, 2017; NAVARRO *et al.*, 2015). Essas duas estratégias são utilizadas para detecção de patógenos, porém a baseada em sondas é mais prevalente por ser mais específica e por ter menor probabilidade de detectar produtos não específicos (KRALIK; RICCHI, 2017). Entretanto, os corantes intercalantes são bem mais baratos do que a tecnologia baseada em sondas e podem ser utilizados em ensaios que avaliam diferentes genes (WONG; MEDRANO, 2005).

2.3 SYBR GREEN

Existem diferentes corantes fluorescentes intercalantes de DNA, porém o SYBR green I é mais utilizado nas análises de PCR em tempo real (NAVARRO *et al.*, 2015). SYBR green I liga-se ao dsDNA e o complexo DNA-corante absorve no comprimento de onda máximo de 497 nm (luz azul) e emite no comprimento de onda máximo de 520 nm (luz verde) (NAVARRO *et al.*, 2015; WILHELM; PINGOUD, 2003). A emissão de fluorescência é 1.000 vezes maior quando corante está presente no complexo do que quando livre em solução (VALASEK; REPA, 2005). Portanto, quanto maior a quantidade de dsDNA presente no tubo de reação, maior a quantidade de ligação ao DNA e maior o sinal fluorescente (VALASEK; REPA, 2005).

Como o sistema de detecção através do SYBER GREEN I permite a ligação desse corante fluorescente a qualquer molécula de fita dupla, isso faz com que esse agente intercalante possa detectar tanto alvos específicos como não específicos (NAVARRO *et al.*, 2015). Assim faz necessário o desenvolvimento da curva de dissociação (também conhecida como curva de *melting*) logo após a amplificação do DNA. Nesse processo as moléculas passam por aumento de temperatura (por exemplo de 60 a 95 graus) e a emissão de fluorescência é monitorada durante essa análise (NAVARRO *et al.*, 2015). Quando as moléculas atingem a temperatura de

melting (T_m) metade dos produtos do PCR encontram-se unidos e a outra metade dissociada, depois desse ponto o sinal de fluorescência decai decorrente da dissociação do corante. Esse ponto de *melting* (T_m) é dependente do tamanho do produto e/ou composição de nucleotídeos, apresentam picos distintos no gráfico da derivada de fluorescência versus a temperatura de acordo com cada produto de amplificação (NAVARRO *et al.*, 2015; VALASEK; REPA, 2005). Por meio da curva de *melting* pode-se visualizar se tem apenas um produto de amplificação através da observação de apenas um pico na curva de dissociação (Figura 3B). Se tiver presente outros produtos de amplificação não específicos ou dímeros de primers verifica-se a presença de dois ou mais picos, que geralmente aparecem antes do pico do produto específico devido a desnaturação ocorrer em temperaturas mais baixas (NAVARRO *et al.*, 2015; VALASEK; REPA, 2005).

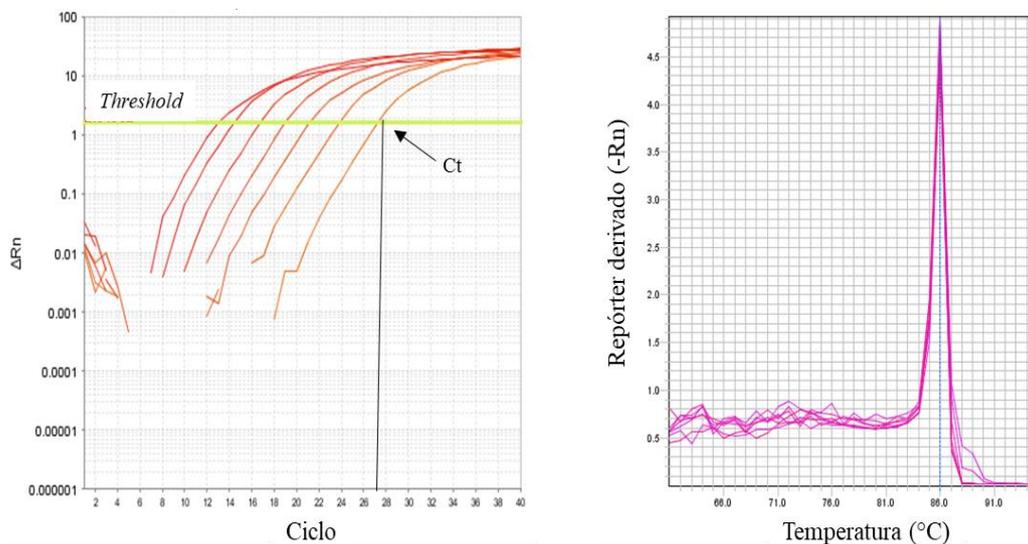


Figura 3 – Gráfico de amplificação (A). Curva de dissociação ou curva de *melting* (B).
Fonte: Os autores.

2.4 TAQMAN

A sonda de hidrólise conhecida como TaqMan é complementar a sequência alvo, na região 5' e possui um fluoróforo doador (repórter) e na região 3' um fluoróforo receptor, também conhecido como *quencher* (WILHELM; PINGOUD, 2003). Quando o *quencher* está próximo do repórter, ligados por um mesmo oligonucleotídeo curto, essa molécula absorve o sinal de fluorescência do repórter (VALASEK; REPA, 2005). A Figura 4 representa o processo que ocorre durante a extensão, onde a enzima DNA polimerase (atividade 5' -3' exonuclease) degrada a sonda e separa o repórter do inibidor, permitindo que o sinal de fluorescência seja

emitido, e esse processo é repetido a cada ciclo (NAVARRO *et al.*, 2015; VALASEK; REPA, 2005). Dentre os fluoróforos doadores citam-se o FAM, VIC, NED e fluoróforos *quencher*, TAMRA, DABCYL e BHQ (VALASEK; REPA, 2005; WILHELM; PINGOUD, 2003).

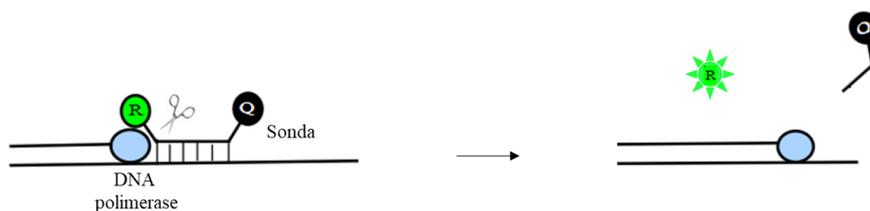


Figura 4 – A enzima DNA polimerase hidrolisa a sonda TaqMan durante a amplificação da sequência alvo, separando o *quencher* (Q) do repórter (R) e permitindo a medida do sinal de fluorescência.

Fonte: Os autores.

3 APLICAÇÕES DA PCR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS EM EQUÍDEOS

Na Tabela 1 encontram-se os agentes etiológicos, as amostras clínicas e as técnicas de detecção baseadas em PCR que foram utilizadas, bem como a eficiência do diagnóstico para diferentes doenças infecciosas em equinos. A variação observada para a eficiência do diagnóstico pode estar relacionada diretamente a amostra clínica, às características genéticas dos agentes etiológicos ou mesmo a limitação da técnica utilizada, assunto também abordado neste tópico.

Tabela 1 - Agentes etiológicos, amostras clínicas, técnicas de detecção envolvendo PCR bem como a eficiência do diagnóstico para diferentes doenças infecciosas em equídeos (continua).

Doença/agente etiológico	Amostra clínica	Técnica de detecção	Eficiência do diagnóstico	Referência
Adenite equina <i>Streptococcus equi</i>	Secreção nasal	RT-PCR	100%	Anzai, Hobo e Niwa (2006)
		RT-PCR	78,1%	Gomes <i>et al.</i> (2019)
	Amostras de casos clínicos suspeitos	PCR em tempo real	93,9%	Webb <i>et al.</i> (2013)
	Amostra de esfregaço clínico	PCR em tempo real multiplex	95%	Cordoni <i>et al.</i> (2015)

Tabela 1 - Agentes etiológicos, amostras clínicas, técnicas de detecção envolvendo PCR bem como a eficiência do diagnóstico para diferentes doenças infecciosas em equídeos (continua).

Doença/agente etiológico	Amostra clínica	Técnica de detecção	Eficiência do diagnóstico	Referência
Anemia infecciosa equina Vírus da anemia infecciosa equina	Sangue periférico, fragmentos de baço, pulmão, rim e fígado	Nested PCR	100%	Bueno <i>et al.</i> (2020)
	Células mononucleares de sangue periférico	Nested PCR	83-93%	Romo-Sáenz <i>et al.</i> (2021)
	Células mononucleares do sangue periférico	Nested PCR	70%	Santos <i>et al.</i> (2011)
	Sangue periférico	Nested PCR	72%	Nagarajan e Simard (2001)
	Células de sangue periférico	Nested PCR	100%	Dong <i>et al.</i> (2012)
	Amostra de tecido, plasma	PCR em tempo real	-	Quinlivan, Cook e Cullinane (2007)
Arterite viral Vírus da arterite	Sêmen	qRT-PCR	65%	Lazić <i>et al.</i> (2017)
	Plasma seminal e secreções nasais	Taqman qRT-PCR	100%	Balasuriya <i>et al.</i> (2002)
	Sêmen	RT-PCR	100%	St-Laurent, Morin e Archambault (1994)
	Sêmen	qRT-PCR	31,7%	Socha, Larska e Rola (2020)
	Sêmen Fluido de cultura de tecido	PCR em tempo real – TaqMan	93,4% e 42,6% (sêmen) 100% e 95,2% (Fluido de cultura de tecido)	Lu <i>et al.</i> (2008)

Tabela 1 - Agentes etiológicos, amostras clínicas, técnicas de detecção envolvendo PCR bem como a eficiência do diagnóstico para diferentes doenças infecciosas em equídeos (continua).

Doença/agente etiológico	Amostra clínica	Técnica de detecção	Eficiência do diagnóstico	Referência
Endometrite Variados (fungos, bactérias, protozoários)	Amostras de esfregaço genital	qRT-PCR	<i>Taylorella equigenitalis</i> 97%; <i>T. asinigenitalis</i> 91%; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 79%; <i>Klebsiella pneumoniae</i> 82,5%	Léon <i>et al.</i> (2020)
Endometrite Variados (fungos, bactérias, protozoários)	Secreção uterina, tecido endometrial	Nested PCR	100%	Nervo <i>et al.</i> (2019)
	Amostra de esfregaço genital	PCR em tempo real Taqman	100%	Ousey <i>et al.</i> (2009)
Influenza Vírus da influenza A	Secreção respiratória	RT-PCR	100%	Oxburgh e Hagström (1999)
	-	PCR em tempo real –Sybr green I	-	Acevedo <i>et al.</i> (2018)
	Soro sanguíneo	RT-PCR	100%	Falcão, Silva e Mota (2019)
Mormo <i>Burkholderia mallei</i>	Cavalo/ égua doente com mormo	PCR Multiplex	100%	Lee, Wang e Yap (2005)
	Cavalo/ égua doente com mormo	PCR Multiplex	99% 98,7%	Janse <i>et al.</i> (2013)
	Amostra de tecido	PCR em tempo real	Alta eficiência	Fonseca Júnior <i>et al.</i> (2021)
Piroplasmose <i>Theileria equi</i> e <i>Babesia caballi</i>	Soro sanguíneo	Taqman qRT-PCR	31,4%	Jaffer <i>et al.</i> (2010)
	Sangue total e soro sanguíneo	qRT-PCR	90,5% 7,9%	Lobanov <i>et al.</i> (2018)

Tabela 1 - Agentes etiológicos, amostras clínicas, técnicas de detecção envolvendo PCR bem como a eficiência do diagnóstico para diferentes doenças infecciosas em equídeos (conclusão).

Doença/agente etiológico	Amostra clínica	Técnica de detecção	Eficiência do diagnóstico	Referência
Piroplasmose <i>Theileria equi</i> e <i>Babesia caballi</i>	Sangue	PCR em tempo real Taqman	78% e 80%	Bhoora <i>et al.</i> (2010)
		PCR em tempo real multiplex Taqman	42,9%	Canino <i>et al.</i> (2019)
		PCR em tempo real Taqman	100%	Kim <i>et al.</i> (2008)
Pitiose <i>Pythium insidiosum</i>	Amostra de tecido lesionado	Nested PCR	100%	Botton <i>et al.</i> (2011)
		RT-PCR	100%	Tartor <i>et al.</i> (2020)
		PCR Multiplex	100%	

Fonte: Os autores.

3.1 VÍRUS

A anemia infecciosa equina (*Equine infectious anemia* - EIA), é uma doença causada pelo vírus da anemia infecciosa equina (*Equine infectious anemia virus* - EIAV) a qual sua patogênese, bem como a resposta imunológica contra o vírus, não é totalmente compreendida (BUENO *et al.*, 2020). Estes autores analisaram tecidos do baço, fígado, pulmões e rins de equídeos EIAV-positivos, armazenados em solução de RNAlater ou de formalina a 10%. Após a extração do material genético das diferentes amostras, observou-se que os produtos de PCR foram detectados apenas a partir dos tecidos armazenados em solução de RNAlater. A solução de formalina possui o formaldeído como seu principal constituinte. Este composto, geralmente induz processos de reticulação em DNA, RNA e proteínas, além de núcleos ácidos tenderem a ser mais fragmentados quando uma solução fixadora não tamponada é utilizada, o que explica a detecção ineficiente de EIAV nos tecidos armazenados por este método. Capomaccio *et al.* (2012) ressalta outro ponto importante no uso de métodos moleculares como a PCR e hibridização *in situ*. Segundo os autores, a limitação por falta de conhecimento sobre a variabilidade genética do vírus, o que aparentemente é significativo entre diferentes regiões geográficas, pode levar a resultados errôneos.

Lazić *et al.* (2017) utilizaram a PCR para investigar a circulação e a caracterização molecular do vírus da arterite equina (*Equine arteritis virus*- EAV) isolado da população de cavalos na Sérvia. Amostras de sêmen foram coletados usando uma vagina artificial sendo que as amostras de sêmen positivas para a PCR foram submetidas ao sequenciamento. Para a PCR, o RNA foi extraído do sêmen e analisado por RT-qPCR visando um porção do gene da nucleoproteína (N) do EAV e o RNA de amostras positivas foi transcrito em cDNA. Entretanto, algumas amostras de sêmen com sorologia positiva para EAV não puderam ser extraídas e amplificadas, provavelmente, devido ao atraso entre a data de coleta e a data de congelamento. Os autores observaram que: 1) a técnica da PCR pode ser utilizada para detecção de patógenos transmissíveis por meio do sêmen de animais mantidos para fins de inseminação artificial; 2) machos podem transmitir diretamente o vírus para éguas durante o acasalamento e 3) éguas cobertas são susceptíveis a transmitir o vírus a outros cavalos no estábulo pela via respiratória após o contato direto.

O vírus da influenza A equina é responsável por uma doença respiratória altamente contagiosa em cavalos – a influenza equina. Segundo Acevedo *et al.* (2018), os ensaios da transcriptase reversa acoplado a reação em cadeia da polimerase (*reverse transcriptase polymerase chain reaction* - RT-PCR) e RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) vêm sendo amplamente utilizados como alternativa confiável ao isolamento do vírus para o diagnóstico da influenza equina. Como uma vantagem significativa destas técnicas, tanto a RT-PCR quanto a qRT-PCR possibilitam a amplificação do material genético em região específica para o vírus da influenza equina. O principal desafio em casos de infecção do trato respiratório é determinar a natureza contagiosa da doença, a fim de controlar adequadamente o animal afetado e reduzir o risco de exposição a outros cavalos. Isso requer a disponibilidade de testes de diagnóstico rápidos e confiáveis. A tecnologia em tempo real fornece detecção e quantificação altamente sensível, específica e rápida de genomas virais e pode ser realizada com baixo risco de contaminação a um custo razoável.

3.2 BACTÉRIAS

Mormo é uma doença infectocontagiosa incurável provocada pela *Burkholderia mallei*. Essa bactéria é responsável por lesões respiratórias, linfáticas e cutâneas, principalmente, em equídeos. A transmissão pode ocorrer por contato direto com animais infectados, aerossóis ou secreções de animais doentes. O diagnóstico é realizado por exames clínicos e testes laboratoriais, como a PCR, que podem ser utilizados mediante autorização do Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Resultados positivos na PCR são incontestáveis, pois o DNA *B. mallei* está presente na amostra analisada, comprovando a presença da bactéria. Entretanto, resultados negativos não são confirmatórios, pois nem sempre existe DNA em quantidade suficiente para detecção na amostra analisada. Desta forma, o monitoramento dos fatores de riscos associados, da presença da doença na região e dos animais são medidas essenciais para o controle e erradicação dessa doença (FALCÃO; SILVA; MOTA, 2019).

3.3 PROTOZOÁRIO

A piroplasmose equina é uma doença provocada pelos hemoprotozoários *Theileria equi* e *Babesia caballi* transmitidas por carrapatos presentes, principalmente, em áreas tropicais e subtropicais da África, América e Ásia (CANINO *et al.*, 2019). Jaffer *et al.* (2010) realizaram um estudo utilizando a qPCR e a pesquisa de anticorpos, por testes sorológicos convencionais, para o diagnóstico de piroplasmose equina em amostras sorológicas de cavalos infectados. Os resultados da qPCR foram positivos para a maioria dos animais que apresentaram anticorpos nos testes sorológicos convencionais. Entretanto, um pequeno percentual de animais foi negativo na qPCR e positivo nos testes sorológicos para detecção de anticorpos. Isto pode ocorrer devido a presença de anticorpos mesmo após a eliminação dos protozoários. Por outro lado, testes de qPCR foram positivos para animais os quais os testes sorológicos de pesquisa de anticorpos foram negativos, demonstrando que os anticorpos podem ainda não ter se desenvolvido, indicando uma infecção recente.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da PCR no diagnóstico das infecções de etiologia microbiana representa uma alternativa confiável às técnicas convencionais. A detecção e quantificação altamente sensível, específica e rápida de genomas microbianos permitem um diagnóstico precoce e possibilita a adoção de medidas profiláticas e terapêuticas que refletem na saúde animal e na economia. Entretanto, deve-se levar em consideração as limitações das técnicas quanto a obtenção, conservação e transporte das amostras, a quantidade de material genético e a padronização dos protocolos. Outros pontos relevantes são as limitações associadas às diferentes cepas e a variabilidade genética natural ou provocada por mutações no genoma do micro-organismo.

Desta forma o uso da PCR no diagnóstico é uma estratégia interessante quando associado aos dados clínicos do animal, ao estudo epidemiológico da doença e aos fatores de riscos associados a presença da doença na região.

5 REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, A. M. *et al.* Standarization of a SYBR Green-I based real time RT-PCR assay for the detection of equine influenza virus. **Revista de Salud Animal**, v. 40, n. 3, p. 1-7, 2018.
- ANZAI, T.; HOBO, S.; NIWA, H. Development of a diagnostic shuttle PCR test targeting the *Streptococcus equi* SeM gene. **Journal of Equine Science**, v. 17, n. 4, p. 101-104, 2006.
- BALASURIYA, U. B. *et al.* Detection of equine arteritis virus by real-time TaqMan® reverse transcription-PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v. 101, n. 1, p. 21-28, 2002.
- BAUMFORTH, K. R. *et al.* Demystified ... the polymerase chain reaction. **Molecular Pathology**, v. 52, n. 1, p. 1-10, 1999.
- BUENO, B. L. *et al.* Molecular detection, histopathological analysis, and immunohistochemical characterization of equine infectious anemia virus in naturally infected equids. **Archives of Virology**, v. 165, n. 6, p. 1333-1342, 2020.
- BHOORA, R. *et al.* Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 3-4, p. 201-211, 2010.
- BOTTON, S. A. *et al.* Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. **Current Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1225-1229, 2011.
- CANINO, E. *et al.* Serological, molecular and hematological diagnosis in horses with clinical suspicion of equine piroplasmosis: pooling strengths. **Veterinary Parasitology**, v. 275, n. 5, p. 1089-1128, 2019.
- CAPOMACCIO, S. *et al.* Detection, molecular characterization and phylogenetic analysis of full-length equine infectious anemia (EIAV) gag genes isolated from Shackleford Banks wild horses. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 3-4, p. 320-332, 2012.
- BRASIL. Resolução nº 1.374, de 4 de dezembro de 2020. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 4 dez. 2020. Seção 1, p. 174.
- CORDONI, G. *et al.* Rapid diagnosis of strangles (*Streptococcus equi* subspecies *equi*) using PCR. **Research in Veterinary Science**, v. 102, n. 1., p. 162-166, 2015.

- DONG, J. B. *et al.* Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. **Archives of Virology**, v. 157, n. 11, p. 2105-2111, 2012.
- FALCÃO, M. V. D.; SILVA, J. G.; MOTA, R. A. **Mormo: perguntas e respostas**. 1. ed. Recife: Editora da Universidade Federal de Pernambuco, 2019. 33 p.
- FONSECA JÚNIOR, A. A. *et al.* Validation of three qPCR for the detection of *Burkholderia mallei* in equine tissue samples. **Archives of Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 1-7, 2021.
- GOMES, Y. A. *et al.* Microbiological and molecular evaluation of *Streptococcus equi* subspecies *equi* and risk factors associated to equine adenitis in rural properties of Rio Branco Micro-Region, Acre, Brazil. **Biota Amazônia**, v. 9, n. 3, p. 61-63, 2019.
- HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 14, n. 26, p. 41-48, 2016.
- JAFFER, O. *et al.* A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmiasis. **Parasitology Research**, v. 106, n. 3, p. 709-713, 2010.
- JANSE, I. *et al.* Multiplex qPCR for reliable detection and differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 34-42 2013.
- KIM, C. *et al.* Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 2-4, p. 158-163, 2008.
- KRALIK, P.; RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 108, p. 97-108, 2017.
- LAZIĆ, S. *et al.* Serological evidence of equine arteritis virus infection and phylogenetic analysis of viral isolates in semen of stallions from Serbia. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2017.
- LEE, I-H.; SHIN, S. Y.; ZHANG, B. T. Multiplex PCR assay design by hybrid multiobjective evolutionary algorithm. In: OBAYASHI, S. *et al.* **Evolutionary Multi-Criterion Optimization**. Berlin: Springer, 2007. p. 376-385.
- LEE, M-A.; WANG, D.; YAP, E. H. Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 413-417, 2005.
- LÉON, A. *et al.* Validation of an easy handling sample preparation and triplex real time PCR for rapid detection of *T. equigenitalis* and other organisms associated with endometritis in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 94, n. 1, p. 1032-1041, 2020.
- LOBANOV, V. A. *et al.* Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the diagnosis of equine piroplasmiasis. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2018.

LU, Z. *et al.* Comparison of two real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for the detection of *Equine arteritis virus* nucleic acid in equine semen and tissue culture fluid. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 2, p. 147-155, 2008.

MADDOCKS, S.; JENKINS, R. **Understanding PCR: a practical bench-top guide**. 1 ed. Cambridge: Academic Press, 2017. 98 p.

NAGARAJAN, M. M.; SIMARD, C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 94, n. 1-2, p. 97-109, 2001.

NAVARRO, E. *et al.* Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, n. 5, p. 231-250, 2015.

NERVO, T. *et al.* Chronic endometritis in subfertile mares with presence of chlamydial DNA. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 73, n. 8, p. 91-94, 2019.

OIE (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL). **Enfermidades da lista da OIE**. 2021. Disponível em: <<https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Glanders/>>. Acesso em: 04 jul. 2021.

OLIVEIRA, M. C. de S. *et al.* Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. In: **Embrapa Pecuária Sudeste-Livro científico (ALICE)**. São Carlos- SP: Embrapa Sudeste, 2007. p. 1 – 29.

OUSEY, J. C. *et al.* An investigation into the suitability of a commercial real-time PCR assay to screen for *Taylorella equigenitalis* in routine prebreeding equine genital swabs. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 9, p. 878-882, 2009.

OXBURGH, L.; HAGSTRÖM, Å. A. PCR based method for the identification of equine influenza virus from clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 161-174, 1999.

PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. Técnicas de DNA recombinante. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 307-331.

PESTANA, E. A. *et al.* **Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics - real-time PCR applications**. Dordrecht: Springer, 2010. 310 p.

QUAN, P. L.; SAUZADE, M.; BROUZES, E. dPCR: a technology review. **Sensors**, v. 18, n. 4, p. 1-27, 2018.

QUINLIVAN, M.; COOK, R. F.; CULLINANE, A. Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anaemia virus based on sequence determination of the gag gene. **Veterinary Record**, v. 160, n. 18, p. 611-618, 2007.

RAJAPAKSHA, P. *et al.* A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. **Analyst**, v. 144, n. 2, p. 396-411, 2019.

ROMO-SÁENZ, C. I. *et al.* Molecular detection of equine infectious anemia virus in clinically normal, seronegative horses in an endemic area of Mexico. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 33, n. 4, p. 758-761, 2021.

SANTOS, E. M. *et al.* Evaluation of nested PCR compared with AGID and ELISA serological tests for equine infectious anemia diagnosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 296-301, 2011.

SINT, D.; RASO, L.; TRAUGOTT, M. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 3, n. 5, p. 898-905, 2012.

SOCHA, W.; LARSKA, M.; ROLA, J. Molecular investigation of allelic variants of EqCXCL16 gene in equine arteritis virus infected stallions of selected horse breeds in Poland. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, p. 1-4, 2020.

ST-LAURENT, G.; MORIN, G.; ARCHAMBAULT, D. Detection of equine arteritis virus following amplification of structural and nonstructural viral genes by reverse transcription-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 658-665, 1994.

TARTOR, Y. H. *et al.* Equine pythiosis in Egypt: clinicopathological findings, detection, identification and genotyping of *Pythium insidiosum*. **Veterinary Dermatology**, v. 31, n. 4, p. 291-298, 2020.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

WARFORD, A. *et al.* Southern blot analysis of DNA extracted from formal saline fixed and paraffin wax embedded tissue. **The Journal of Pathology**, v. 154, p. 313-320, 1988.

WEBB, K. *et al.* Detection of *Streptococcus equi* subspecies *equi* using a triplex qPCR assay. **The Veterinary Journal**, v. 195, n. 3, p. 300-304, 2013.

WILHELM, J.; PINGOUD, A. Real-time polymerase chain reaction. **ChemBioChem**, v. 4, n. 11 p. 1120-1128, 2003.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v. 39, n. 1, p. 1-11, 2005.

ZHUSSUPOVA, A. I. **PCR – diagnostics: educational manual**. Almaty: Qazaq University, 2016. 128 p.

Capítulo 10

Atualizações no diagnóstico da leishmaniose canina



Wanderson Lopes Andrade¹
Poliana Laviola Pedrosa²
Ana Flávia Ferreira Selva³
Marcos Santos Zanini⁴

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: wanderson.andrade@hotmail.com.br

² Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: poliana_laviola@hotmail.com

³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: aflavia44@hotmail.com

⁴ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: marcos.zanini@ufes.br

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico de leishmaniose clássica tem sido pautado no isolamento, visualização e cultura do parasito a partir de material biológico de um hospedeiro suspeito de infecção. Quando positivo, é indiscutível e independente da presença de sintomatologia clínica, classificando o hospedeiro como potencial reservatório ou hospedeiro final do parasito. Entretanto, nas diferentes apresentações clínicas da leishmaniose (viscerais e cutâneas) causada por diversas espécies do gênero *Leishmania*, a ausência de isolamento, visualização e cultura do parasito por motivos diversos, não exclui a presença do parasito no hospedeiro. Haja visto que, particularmente nas apresentações clínicas crônicas ou assintomáticas da leishmaniose, tanto para a forma visceral como cutânea de hospedeiros responsivos imunologicamente, principalmente via imunidade celular, a quantidade de parasitos presentes pode ser mínima e estar confinado a um determinado órgão inacessível enquanto hospedeiro vivo (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017; BRASIL 2019a).

Em casos em que não se exclui a presença do parasito, as técnicas convencionais que identificam a presença do mesmo podem falhar ou são passíveis de induzir a resultados falso negativos. Para estes quadros de grande valia as técnicas de identificação para quantidades mínimas de ácidos nucleicos do parasito ou mesmo avaliação por respostas sorológicas específicas, como é preconizado pelo recente Guia de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, que é utilizado como referência principal para este estudo (BRASIL, 2019a).

Certamente, as técnicas moleculares e sorológicas também podem induzir a erros de diagnóstico quando não contextualizadas no quadro clínico do paciente e geralmente devem ser interpretadas considerando mais de uma técnica laboratorial. Assim, deve-se considerar que não basta simplesmente solicitar exames laboratoriais, por mais específicos que sejam, devendo-se sempre contextualizar o resultado com o quadro clínico do paciente. Então, tendo em vista as considerações acima, a seguir serão apresentadas informações gerais sobre a leishmaniose, seguido da descrição de modalidades tradicionais de diagnóstico assim como algumas técnicas mais específicas e elaboradas, acompanhadas de algumas considerações sobre lacunas destas técnicas.

2 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças infecciosas com transmissão vetorial de caráter zoonótico causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* sp. pertencente à família

Trypanosomidae (AGUIAR; MEDEIROS, 2003). Sua distribuição é global e endêmica em mais de 98 países, sendo o maior número de casos reportados nos continentes Africano, Asiático e Americano. Na América latina, 18 países relatam casos das leishmanioses, sendo o Brasil o país que mais reporta. As manifestações da enfermidade variam em função de sua forma clínica, sendo: leishmaniose visceral (LV) e, leishmaniose cutânea (LC) mais frequente (OPAS, 2019a,b; WHO, 2010).

Os protozoários do gênero *Leishmania* sp. apresentam duas formas distintas. No inseto vetor encontra-se a forma promastigota. Esta forma, mede entre 20 a 30 μm , é extracelular, fusiforme e possui, na sua região anterior, um flagelo. Nos hospedeiros, encontra-se a forma amastigota dentro de macrófagos ou órgãos. Nessa forma, mede de 2 a 5 μm , é intracelular, ovoides e o flagelo é rudimentar. Sua multiplicação ocorre em células do sistema mononuclear fagocitário, em especial, nos macrófagos (OPAS, 2019a,b). Nas Américas, a espécie relatada como causadora da leishmaniose visceral é: *Leishmania (Leishmania) chagasi* (BRASIL, 2014). Enquanto a leishmaniose cutânea são sete espécies causadoras no Brasil, sendo as principais: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; *Leishmania (Viannia) guyanensis*; *Leishmania (Viannia) braziliensis*, esta última é predominante na região sudeste do Brasil (BRASIL, 2019a).

Para perpetuar o ciclo biológico tradicional, necessitam da picada do vetor da família Psychodidae durante o repasto sanguíneo em hospedeiro suscetível (AGUIAR; MEDEIROS, 2003). Os flebotomíneos são insetos da ordem Díptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, são conhecidos popularmente, no Brasil, como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros. Dois gêneros apresentam importância para a transmissão: o gênero *Phlebotomus* e o gênero *Lutzomyia*, sendo este o transmissor na América Latina (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; MONTANHA *et al.*, 2013; OPAS, 2019b).

A sobrevivência do protozoário está estritamente ligada à distribuição de seu vetor que, por sua vez, sofre influência de fatores geográficos e climáticos (RANGEL; LAISON, 2003). Não são conhecidos todos os fatores de interferência na distribuição, mas é sabido que altitudes de até 800 m acima do nível do mar, favorecem a transmissão do protozoário pelos respectivos vetores. Os flebotomíneos são encontrados em ambiente silvestre assim como região peridomiciliar, domiciliar e em diversas temperaturas, possuindo atividade crepuscular noturna (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; BRASIL, 2019a).

Os insetos envolvidos na transmissão da forma cutânea de leishmaniose, também denominada tegumentar, no Brasil são da ordem Díptera, família Psicodidae, Subfamília Phlebotominae e gênero *Lutzomyia*, sendo as principais espécies de vetores para a LC são: *L.*

intermedia, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. wellcomei*, *L. flaviscutellata*, enquanto os transmissores da forma visceral para região sudeste e centro oeste do Brasil são *L. longipalpis* e *L. cruzi* (BRASIL, 2019a).

As leishmanioses foram descritas em diversos animais domésticos e silvestres. Em animais silvestres, é possível que parasite roedores, marsupiais, edentados e canídeos selvagens, enquanto os hospedeiros domésticos, são os canídeos, felídeos e equídeos. Em casos de LC, os animais domésticos relatos não se conhece o real papel deles no ciclo da doença, mas trabalhos evidenciam associação entre cães infectados e o surgimento de novos casos de LC em humanos (BRASIL, 2019a). No entanto, para a LV, o cão apresenta formas clínicas sistêmicas e comporta-se como reservatório deste parasito para infecção de vetores e posterior transmissão ao homem (BRASIL, 2019a; FREITAS *et al.*, 2009).

Animais que cursam com a leishmaniose cutânea apresentam, inicialmente, lesão eritemato-papulosa no local da picada, onde ocorre a multiplicação do protozoário no interior dos macrófagos. Posteriormente forma-se um nódulo que evolui para a formação de úlcera, a lesão apresenta formato arredondado, com bordas elevadas e infiltradas, podendo ser única ou múltipla, dependendo do número de picadas, o parasitismo ocorre preferencialmente em mucosas das vias aerodigestivas superiores (SILVA; WINK, 2018). Outros sinais são também observados, como: descamação epidérmica excessiva, com espessamento, despigmentação e rachaduras do focinho e coxins, pelagens seca e quebradiça, perda de pelos e podem ser observados nódulos intradérmicos (BRASIL, 2017; SILVA; WINK, 2018). As lesões são ulcerativas, únicas ou múltiplas (mais raramente) e estão localizadas em orelha, focinho ou bolsa escrotal, desta forma podendo incluir como diagnóstico diferencial: neoplasia, piodermite e fungo, principalmente a esporotricose por também ser uma zoonose e cursar com lesões análogas a LC (BRASIL, 2017).

Na LV, por se tratar de doença sistêmica e crônica, os sinais clínicos variam de acordo com a resposta imunológica do animal, inicialmente, os parasitos estão presentes no local da picada, logo após ocorre a infecção de vísceras e eventualmente tornam-se distribuídos através da derme (BRASIL, 2014; SILVA, 2007). Os principais sinais clínicos nos cães são: caquexia, hipergamaglobulinemia, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia e linfadenopatia, podendo ocorrer outros sintomas como a onicogribose, alopecia, dermatites, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas, vômito e hiperqueratose (BRASIL, 2014). Na fase final o animal pode apresentar paresia de membros posteriores, caquexia, inanição, nefrites e morte (BRASIL, 2014; SILVA, 2007). Achados laboratoriais indicativos de

cursarem a doença são: hipergamaglobulinemia, hepatomegalia, anemia e linfadenopatia (BRASIL, 2019a; SILVA, 2007).

Inicialmente, a leishmaniose era associada a uma doença enzoótica de animais silvestres e, acidentalmente, em humanos que se adentravam nas florestas, no decorrer dos anos, passou a ser uma doença encontrada em zonas rurais e periurbanas (FALQUETO *et al.*, 1991). A partir de 2003, a LC foi encontrada com casos confirmados da doença em todos as unidades da federação, sendo considerada uma doença emergente, com seu aumento associado ao desmatamento, exploração dos recursos naturais, expansão agrícola e migração de populações. Além de afetar todos os estados da federação, a LC é amplamente distribuída no estado do Espírito Santo, principalmente em zonas rurais, enquanto a LV é atualmente restrita a municípios da região noroeste como Pancas e municípios vizinhos (FALQUETO *et al.*, 1991; FALQUETO *et al.*, 2003; RANGEL; LAINSON, 2003).

Em animais que cursam com a LV, o Ministério da Saúde recomenda a eutanásia como forma de controle, enquanto em animais com LC não é recomendado essa forma de controle, sendo a eutanásia recomendada apenas quando o animal está em sofrimento (BRASIL, 2019a).

3 DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE POR TÉCNICAS PRECONIZADAS PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS)

O Ministério da Saúde em função da rapidez e eficiência de resultados, preconiza individualmente ou associadas na rotina de diagnóstico das leishmanioses (animal e humana) basicamente quatro técnicas; visualização do parasito de material biológico do paciente (biopsias, punções e raspados) por técnicas citológicas ou histológicas, reação de imunofluorescência indireta (RIFI), testes imunoenzimáticos indiretos e testes imunocromatográficos. Deve-se considerar que as técnicas de genotipagem como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Real Time PCR são secundárias em função do custo, coleta diferenciada de material e tempo necessário para a realização (BRASIL, 2019a).

3.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

O MS prioriza o diagnóstico direto parasitológico e secundariamente os imunológicos, RIFI, testes rápidos imunocromatográficos e imunoenzimáticos (ELISA). Especialmente para cães recomenda os imunocromatográficos para triagem e ELISA como confirmatório (BRASIL, 2019a)

3.1.1 Diagnóstico parasitológico

Em testes parasitológicos, é possível a visualização do parasita em lâmina na forma amastigota por meio da realização da punção de órgãos que as leishmanioses têm tropismo, como medula óssea, baço, pele, fígado e linfonodos. É considerada técnica ouro de diagnóstico, pois uma vez positiva é indiscutível, sendo possível visualizar a forma amastigota do parasito neste exame após efetuar coloração do tecido com os corantes Leishman, Giemsa ou Panótico (GONTIJO; MELO, 2004).

A especificidade do teste pode alcançar os 100%, mas sua sensibilidade varia muito, por volta de até 80%, dependendo da distribuição homogênea do protozoário pelo tecido, do material coletado e o tempo de observação da lâmina (GONTIJO; MELO, 2004). Os testes que são realizados com punção de baço, por exemplo, apresentam sensibilidade elevada, chegando aos 98%. Contudo a técnica nesse tecido apresenta um elevado risco para o animal, enquanto na biópsia de medula óssea, a sensibilidade varia entre 60 e 85% (GONTIJO; MELO, 2004; SUNDAR; RAI, 2002).

Uma outra aplicação para os testes parasitológicos seria a inoculação do aspirado em animais de laboratório, para observar o desenvolvimento da doença e a cultura *in vitro* dos fragmentos obtidos pela punção. Esses métodos apresentam a não aplicabilidade no dia a dia devido sua demora no diagnóstico, levando à espera do paciente que, muitas vezes, não pode ocorrer. Apesar dos bons resultados, as punções não são de aplicação na rotina da vigilância sanitária visto demandar tempo, mão de obra especializada e ainda é um método extremamente invasivo (GONTIJO; MELO, 2004; SUNDAR; RAI, 2002).

3.1.2 Imunofluorescência indireta (RIFI)

Método desenvolvido em 1960 que utiliza o parasito íntegro como antígeno, sendo utilizado em grande escala ultimamente. Porém, atualmente, não é a técnica de primeira escolha para o diagnóstico de cães, utilizada somente para triagens, caracterizada como uma técnica semiquantitativa e sua sensibilidade oscila de 83% a 100% e especificidade em 80% (DUXBURY; SADUN, 1964; HARITH *et al.*, 1987). Os animais considerados soros reagentes apresentam título igual ou superior ao ponto de corte e os resultados são expressos em diluição considerando-se como positivas as amostras reagentes a partir da diluição de 1:80. Nos títulos iguais a 1:40, com clínica sugestiva de LV, recomenda-se a solicitação de nova amostra em 30

dias ou teste complementar (ALMEIDA *et al.*, 2005; DUXBURY; SADUN, 1964; HARITH *et al.*, 1987).

O teste clássico é constituído de uma lâmina de vidro onde estão dissecadas e ligadas *Leishmania* sp. integras que são então banhadas pelas diluições do soro do cão suspeito que terá anticorpos anti *Leishmania* sp. formando o complexo antígeno-anticorpo (Ag+Ac). Logo adiciona-se um conjugado composto de anticorpos anti imunoglobulina G canina geralmente marcado com isotiocianato de fluoresceína que irá ligar ao Ac canino do complexo Ag+Ac (DUXBURY; SADUN, 1964). Segue com uma lavagem da lâmina para retirar o excesso de conjugado e visualiza-se ao microscópio de imunofluorescência. Para avaliar a presença de pontos fluorescentes que indicam a presença da ligação *Leishmania* spp. + Anticorpo do cão suspeito + Anticorpo anti anticorpo canino fluorescente (ALMEIDA *et al.*, 2005; DUXBURY; SADUN, 1964; HARITH *et al.*, 1987).

Este teste tem especificidade discutível, pois pode apresentar reações cruzadas com anticorpos contra *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Trypanosoma cruzi* nas diluições menores, podendo induzir ao errôneo diagnóstico de *Leishmania chagasi infantum*, podendo condenar o cão a eutanásia (ALMEIDA *et al.*, 2005; DUXBURY; SADUN, 1964; HARITH *et al.*, 1987).

3.1.3 Testes imunoenzimáticos indiretos (ELISAI)

Esta técnica possui diferentes modalidades de execução (ELISA sandwich, ELISA competitivo, ELISA direto...), mas possuem em comum o método de revelação da formação do complexo antígeno + anticorpo pelo uso de uma enzima ligada ao anticorpo secundário (anti anticorpo) que reage ao cromógeno adicionado ao final da reação (ALMEIDA *et al.*, 2019).

Para ilustrar a técnica de ELISAI, a seguir descreve-se o protocolo segundo Almeida *et al.* (2019), antígenos solúveis de protozoários lisados (*L. chagasi*, *L. braziliensis*) são fixados em poços de placa de poliestireno por 12 horas a 4°C. Após a etapa de fixação é feito o bloqueio dos espaços livres no fundo dos poços com soro fetal bovino (SFB), em seguida é adicionado os soros caninos diluído aos poços contendo o antígeno solúvel de *Leishmania* sp.

Segue com adição aos poços de uma anti-IgG de cão conjugada à peroxidase, após a incubação e lavagem para retirar excesso de reagentes é feita a revelação com solução de peróxido de hidrogênio e orto-fenilenodiamina que identifica colorimetricamente a reação enzimática entre a peroxidase e o substrato (peróxido de hidrogênio). A reação é então interrompida com solução de ácido sulfúrico adicionada a cada poço sendo a placa lida

imediatamente em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490nm (ALMEIDA *et al.*, 2019). A determinação da reatividade baseia-se em leituras superiores ao ponto de corte (*cut off*) calculado como a média da densidade ótica dos soros de 3 cães negativos (controles negativos) mais duas vezes o desvio-padrão da densidade ótica desses soros (ALMEIDA *et al.*, 2019).

O ELISAI tem sido utilizado pelo MS como teste confirmatório para os testes rápidos de triagem imunocromatográficos (BRASIL, 2019a). Apesar de largamente utilizado o teste ELISAI é passível de apresentar reações cruzadas com anticorpos das várias espécies de *Leishmania* além de *Trypanosoma cruzi* (64%) e *Ehrlichia canis* (7,7%) (ZANETTE *et al.*, 2014).

O surgimento do teste de ELISA em 1970, fez com que outros métodos caíssem em desuso, como a reação de fixação de complemento, devido sua facilidade de execução, utilização em uma grande população e a possibilidade de utilização com diferentes antígenos (brutos, sintéticos ou recombinantes) (GRIMALDI JUNIOR; TESH, 1993; MAIA; CAMPINO, 2008).

A utilização do teste está atrelada ao tipo utilizado de antígeno e o estado clínico do animal testado, estudos utilizando o antígeno recombinante A2 com soros de animais sintomáticos, apresenta bons resultados e o acontecimento de reação cruzada insignificante. Enquanto o antígeno rK39 apresenta divergência entre cães assintomáticos e sintomáticos sendo de 58% e 96,7%, respectivamente (CARVALHO *et al.*, 2002; METTLER *et al.*, 2005).

3.1.4 Testes rápidos: imunoenaios cromatográficos

Existem variadas apresentações comerciais desta modalidade de teste rápido tanto para diagnóstico da LV humana (DiaMed IT-LEISH®, Kalazar Detect®, OnSite®) como para LV canina (TR DPP®, SNAP 4Dx Plus Test/Alere®, Leishmaniose Ac Test Kit®) (OPAS, 2019b).

Os mecanismos de testes rápidos basicamente são quatro: imunocromatografia de fluxo lateral; imunocromatografia de dupla migração (duplo percurso-DPP); dispositivos de imunocaptação; fase sólida, conforme a Figura 1 (BRASIL, 2019b). Os testes rápidos podem ser realizados com amostras de sangue, soro, plasma ou fluido supra gengival e são aplicados para pesquisar antígenos ou anticorpos contra os agentes infecciosos, para pesquisa de anticorpos, haverá antígenos (usualmente proteínas sintéticas) imobilizados, na membrana de nitrocelulose, para a captura dos anticorpos presentes na amostra, enquanto para a pesquisa

de antígenos, haverá anticorpos imobilizados na membrana de celulose para a captura dos antígenos presentes na amostra (BRASIL, 2019b).

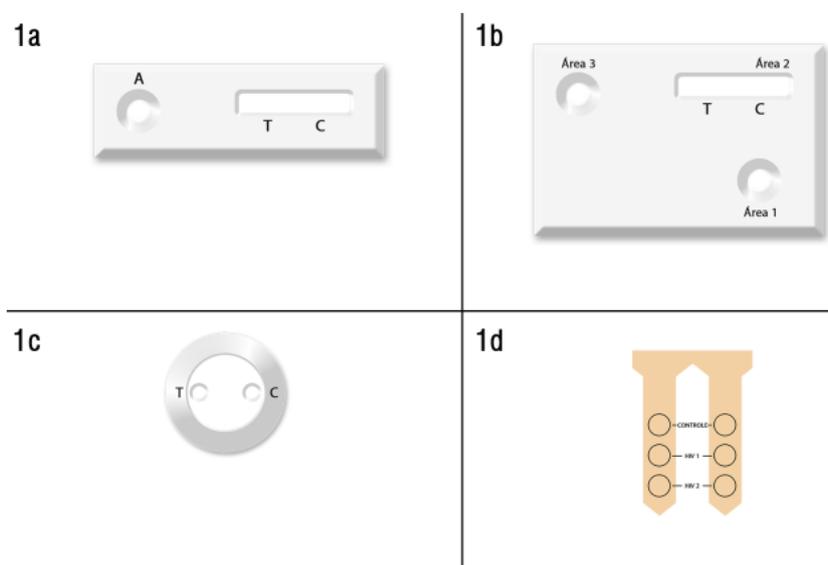


Figura 1 – Exemplos de testes rápidos: 1a - imunocromatografia de fluxo lateral; 1b – imunocromatografia de dupla migração (DPP); 1c – imunoconcentração; 1d – fase sólida.
Fonte: BRASIL, 2019b.

Em sua grande maioria os kits rápidos de diagnóstico imunocromatográfico avaliam a presença de anticorpos e não a presença do parasito, como exemplo de amplo uso desta técnica pode-se citar o diagnóstico rápido imunocromatográfico tipo Dual-Path Platform baseado em proteínas recombinantes (K26/K39) utilizado pelo Ministério da Saúde e laboratórios comerciais para diagnóstico de *L. infantum chagasi* (GRIMALDI JUNIOR *et al.*, 2012). Estes testes possuem alta especificidade, mas relativa sensibilidade pois não detecta cães assintomáticos e deve ser confirmado pela técnica de ELISA indireta (GRIMALDI JUNIOR *et al.*, 2012).

3.2 LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Para o diagnóstico da leishmaniose cutânea humana o MS considera válidos os testes parasitológicos, imunológicos como a intradermorreação de Montenegro (IDRM) e a sorologia por imunofluorescência (RIFI) ou ensaio imunoenzimático (ELISA) e a técnica molecular de reação em cadeia da polimerase, entretanto, para os cães suspeitos de leishmaniose tegumentar são aplicados basicamente os testes parasitológicos e PCR (BRASIL, 2019a).

O diagnóstico de LC abrange perspectivas epidemiológicas, clínicas e laboratoriais, a doença produz uma ampla gama de lesões, que incluem úlceras cutâneas múltiplas ou únicas que atingem a pele e até mucosas, para realizar o diagnóstico clínico, faz-se necessário associação dos aspectos epidemiológicos e, muitas vezes, estes com exames laboratoriais eficazes, para assim se obter a confirmação da enfermidade (ANDRADE *et al.*, 2005; GONTIJO; CARVALHO, 2003). A doença apresenta caráter variante em suas apresentações clínicas e a avaliação das lesões de pele nem sempre é simples ou conclusiva, principalmente por cursar de maneiras semelhantes com outras doenças, estando entre os diagnósticos diferenciais de LC em animais domésticos como: neoplasias, piodermatites, micoses, pênfigo foliáceo, lúpus eritematoso sistêmico, dermatoses responsivas ao zinco, eritema necrolítico migratório, adenite sebácea e o linfoma, se fazendo necessário lançar mão de diagnósticos laboratoriais. Quanto mais inicial é o diagnóstico, mais evita-se complicações provindas da cronicidade que o animal pode vir a apresentar (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

O diagnóstico pode ser realizado por meio de diferentes técnicas parasitológicas de pesquisa direta e indireta, como: pesquisa direta por aposição de tecido em lâmina, cultura em meio específico e inoculação em hamster, além de exame histopatológico e reação em cadeia de polimerase (PCR), métodos indiretos como Intradermoreação de Montenegro (IDRM) e imunofluorescência indireta são exames imunológicos que ajudam na definição diagnóstica (ANDRADE *et al.*, 2005).

3.2.1 Testes parasitológicos

3.2.1.1 Demonstração direta do parasita

Realizado por meio da pesquisa direta das formas amastigotas em material obtido da lesão por escarificação, aspiração, ou biópsia da borda, sendo posteriormente, utilizado a coloração de Giemsa ou Leishman para visualização em microscópio óptico (GONTIJO *et al.*, 2011). Por ser um exame de fácil e rápida realização é de escolha na rotina diagnóstica laboratorial, a microscopia direta do esfregaço ou impressão possui sensibilidade variável em torno de 100% nos dois primeiros meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses, sendo assim sua sensibilidade varia com o tempo por haver escassez de parasitas nas lesões ao longo do tempo de evolução (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Para alguns autores esse método não constitui o processo ideal para diagnóstico de leishmaniose tegumentar visto

ao baixo número de parasitas presentes nas lesões, exigir mão de obra bem treinada e ao fato da não identificação da espécie do parasita (ANDRADE *et al.*, 2005).

3.2.1.2 Isolamento de cultura in vitro

Os fragmentos obtidos da lesão cutânea por procedimento de biópsia da borda da úlcera devem ser inoculados em meios de cultivo, sendo o meio mais empregado para isolamento o ágar-sangue de Novy e McNeal e Nicolle – NNN (ANDRADE *et al.*, 2005). O parasita cresce bem em meios de cultura a temperatura ambiente (23-26°C) e essa técnica possibilita a posterior identificação da espécie, como pontos negativos estão a necessidade de condições laboratoriais específicas devido a frequente contaminação do material coletado e pessoas treinadas para a execução, tornando inadequada sua utilização para inquéritos epidemiológicos em larga escala (CRMV-PR, 2015).

3.2.1.3 Inoculação em animais de laboratório

Utilizado em humanos e animais, o teste consiste na inoculação de uma suspensão homogeneizada do material de biópsia em solução salina estéril no hamster *Mesocricetus auratus*. Devido a necessidade de laboratórios específicos, adequados e o longo tempo de evolução da lesão no modelo animal (2 a 9 meses em média), essa técnica é mais utilizada em pesquisas do que em diagnósticos de rotina, o exame apresenta ampla variação de acordo com a espécie de *Leishmania* cultivada (ANDRADE *et al.*, 2005).

3.2.1.4 Exames histopatológicos

Sendo importante para o diagnóstico diferencial de outras enfermidades que apresentam lesões semelhantes a leishmaniose, o exame histopatológico consiste na avaliação de cortes histológicos de pele e/ou mucosas dos pacientes, sendo processados e corados por técnicas específicas. Quando encontrado, o parasita se encontra em vacúolos intracitoplasmáticos dos macrófagos, nos espaços intercelulares, ou isolados. De forma geral a LC se apresenta como uma dermatite granulomatosa difusa ulcerada com presença de infiltrado inflamatório polimorfo, com predominância de macrófagos, linfócitos e neutrófilos, reação inflamatória granulomatosa na derme profunda, às vezes acompanhada de necrose, além de padrões de

recuperação do tecido por formação de fibrose cicatricial (NASCIMENTO; CARVALHO; ROCHA, 2019).

Além do padrão descrito, é possível a diferenciação de cinco padrões histopatológicos para LC, sendo eles: reação exsudativa celular, reação exsudativa e necrótica, reação exsudativa e granulomatosa e reação exsudativa e tuberculoide, o padrão de reação exsudativa celular constitui o quadro inicial e final da lesão, com os demais padrões aparecendo interpostos durante a evolução da doença (NASCIMENTO; CARVALHO; ROCHA, 2019).

Em decorrência dessa grande variedade de lesões, para os diagnósticos histopatológicos devem ser levadas em consideração doenças que apresentam afecções semelhantes, dentre elas estão: neoplasias, piodermatites, micoses, pênfigo foliáceo, lúpus eritematoso sistêmico, dermatoses responsivas ao zinco, eritema necrolítico migratório, adenite sebácea e o linfoma. Entre as micoses, a esporotricose é diferencial importante, pois além de ser tratar de zoonose, apresentam lesões muito semelhantes às de LC (DUARTE; ROCHAEL, 2016).

É importante ressaltar que o diagnóstico final de LC somente é feito com o encontro do parasita no tecido, caso contrário as alterações histopatológicas são, no máximo, sugestivas do diagnóstico, devendo-se utilizar de outros exames laboratoriais para confirmação (NASCIMENTO; CARVALHO; ROCHA, 2019).

3.2.1.5 Reação em cadeia da polimerase – PCR

Particularmente útil no caso da LT em decorrência da necessidade da confirmação da espécie parasitológica diante da possibilidade de tratamento, a Reação em Cadeia da Polimerase busca a amplificação do DNA do parasita (HEUSSER JÚNIOR *et al.*, 2010). Apresentando 100% de especificidade, é capaz de detectar quantidades tão pequenas quanto 1 fentograma (1 fentograma = 10⁻¹⁵g) do DNA de uma *Leishmania* sp., o equivalente a 1/10 do parasita, sendo para isso necessário a utilização de primers e marcadores específicos para cada espécie do protozoário. Apesar da grande eficácia na detecção do protozoário, suas exigências técnicas e custo relativamente alto dificultam sua realização em rotinas laboratoriais (HEUSSER JÚNIOR *et al.*, 2010).

Começaram a ser desenvolvidas, após os anos de 1980 técnicas para detecção do protozoário sem a necessidade de seu isolamento em cultura, essa técnica consiste na ampliação de uma sequência conhecida de oligonucleotídeos do protozoário e é conhecido com a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O teste pode ser realizado em amostras de medula óssea, linfonodos, sangue, urina e biópsia de pele, tornando assim um método menos invasivo

(BOZZA *et al.*, 1995; DEGRAVE *et al.*, 1994; GONTIJO; MELO, 2004; JACKSON *et al.*, 1986).

A sensibilidade da PCR sobre variação de acordo com a amostra e o indicador que serão utilizados. A coleta do material onde contenha o parasito é crucial, pois o sangue periférico em alguns animais infectados não apresenta o parasito necessitando coleta na medula óssea ou baço (FISA *et al.*, 2001; MAIA; CAMPINO 2008). Também o fato de serem detectados e/ou amplificados fragmentos de ácidos nucleicos do parasito, não significa que este seja viável, multiplicando e causando enfermidade. Exemplo clássico disto são as biopsias de lesões cicatrizadas de leishmaniose cutânea em que técnicas moleculares facilmente identificam e amplificam fragmentos do ácido nucléico de parasitas mortos (FERRER *et al.*, 1988; FISA *et al.*, 2001; MAIA; CAMPINO 2008; SANTOS *et al.*, 2010).

Em amostras obtidas através da punção venosa, por exemplo, apresenta menor sensibilidade quando comparada com amostras de tecido. Enquanto a sensibilidade nos tecidos pode sofrer variação devido a não distribuição homogênea do parasito, seja devido ao tropismo ou pela resposta imune local. O tecido cutâneo, dentro dos tecidos observados, apresenta distribuição mais homogênea e é de fácil obtenção de amostras, devido a isso, ele vem sendo amplamente utilizado para este método de diagnóstico (FERRER *et al.*, 1988; FISA *et al.*, 2001; MAIA; CAMPINO 2008; SANTOS *et al.*, 2010).

Uma variação e avanço na PCR convencional é o PCR em tempo real, não permitindo somente diagnosticar o caso positivo, mas também a quantificação da carga parasitária do paciente (HEID *et al.*, 1996; MAIA; CAMPINO, 2008). Métodos não invasivos vêm sendo buscados e testados frequentemente por pesquisadores, a fim de encontrar testes mais fáceis de realização e que sejam menos traumáticos e mais aceitáveis para tutor e paciente. Um desses métodos é a utilização de esfoliação do epitélio da conjuntiva para posterior teste em PCR, os testes realizados com esse método, mostraram sensibilidade variando de 67% até 97% (FERREIRA *et al.*, 2012; LEITE *et al.*, 2010; TODOLÍ *et al.*, 2009).

3.2.2 Testes sorológicos

Testes sorológicos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ELISA são usados para detecção da presença de anticorpos anti *Leishmania* no soro do paciente humano com LC. O teste RIFI é uma técnica sensível, porém é possível se ter reações cruzadas especialmente com o *Trypanosoma cruzi* e com *L. chagasi*, agente da leishmaniose visceral não tendo aplicação de rotina em estudo para cães na LC (ANDRADE *et al.*, 2005). Além disso, os

testes sorológicos e especialmente a Intradermoreação de Montenegro apresentam reação cruzada com anticorpos para esporotricose (ZANETTI *et al.*, 2019). Tem sido avaliadas proteínas recombinantes em estudos da validação de técnicas sorológicas para LC (BIVONA *et al.*, 2019). Até mesmo associada ao uso da técnica inovadora denominada *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) de acordo com Silva e Wink (2018), mas ainda em caráter de pesquisa e sem consolidação de resultados, assim para diagnóstico em rotina de LC, especialmente em cães, as técnicas parasitológicas já citadas são de primeira escolha.

3.2.3 Teste de intradermoreação de Montenegro - IDRM

A técnica baseia-se na inoculação de antígenos de *Leishmania* na forma promastigota preparado em culturas *in vitro* por via intradérmica, após 48 a 72 horas, realiza-se a leitura do diâmetro da pápula formada, sendo considerado positivo quando o diâmetro for igual ou superior a 5mm, indicando reação de hipersensibilidade tardia (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A LC apresenta em seu curso uma resposta imune celular, sendo descrita como fundamental para o processo de cura, pois coincide com os primeiros sinais de regressão da doença e com a queda da parasitemia (REIS *et al.*, 2008). A resposta imune celular é responsável pela hipersensibilidade tardia detectada no teste IDRM. A imunidade humoral tem papel ainda não muito bem esclarecido, sendo baixos os níveis de anticorpos no soro do animal, enquanto em humanos, esse teste tem valor no diagnóstico, classificação das formas clínicas, acompanhamento do tratamento e detecção precoce de recidivas, sendo utilizadas como critério de cura (REIS *et al.*, 2008).

Em animais, esse teste pode apresentar inconsistências, em estudo realizados em cães, foi-se comparada a reação intradérmica de dois tipos de antígenos de *Leishmania* (LeishvacinP e o PIO.OOOG), a fim de se estudar a reação imunológica intradérmica provocada pelo teste IDRM. Os resultados obtidos demonstraram que antígenos empregados no diagnóstico humano não conseguiram produzir, em cães doentes, reações cutâneas consistentes ou falharam em determiná-las, havendo diferença nas reações frente aos dois antígenos estudados (TAFURI *et al.*, 1993).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a leishmaniose é uma doença de grande importância zoonótica, e sua incidência tem sido crescente em áreas urbanas e periurbanas, sendo os cães considerados importantes reservatórios da doença para o homem. Nesse contexto, um diagnóstico confiável nesses animais desempenha um papel fundamental no controle da doença. Entretanto, um teste diagnóstico ideal deve ser de fácil execução, de baixo custo e apresentar sensibilidade e especificidade elevadas, condições estas que ainda não foram preenchidas pelos testes até o momento disponíveis. Diante ao exposto, apesar de muitos avanços nessa área, continua a necessidade de aprofundamento acerca do tema.

5 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 207-255.
- ALMEIDA, M. A. O. *et al.* Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 3-4, p. 227-232, 2005.
- ALMEIDA, Y. V. *et al.* Avaliação sorológica de cães vacinados com vacinas comerciais contra leishmaniose visceral no município de Íluna – ES após um ano de vacinação. **PUBVET**, v. 13, n. 6, a. 352, p. 1-5, 2019.
- ANDRADE, B. B. *et al.* Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar: fatos, falácias e perspectivas. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 74, n. 1, p. 75-82, 2005.
- BIVONA, A. E. *et al.* Recombinant cysteine proteinase B from *Leishmania braziliensis* and its domains: promising antigens for serodiagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 1-19, 2019.
- BOZZA, M. *et al.* Characterization of 'Old World' *Leishmania* species using amplified minicircle variable regions as molecular probes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n.3, p. 333-334, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Coordenação-Geral de desenvolvimento da epidemiologia em serviços. **Guia de vigilância em saúde**: volume único. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019a. 741 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância das doenças transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p.

BRASIL, Ministério da Saúde, SUS. **Diagnóstico do HIV – Aula 6. Testes Rápidos**, 2019b. Disponível em: <https://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/22168/mod_resource/content/2/HIV%20-%20Manual%20Aula%206%20%281%29.pdf>. Acesso em: 29 jul. 2020.

CARVALHO, F. A. A. *et al.* Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, n. 4, p. 289-295, 2002.

CRMV-PR (CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, PARANÁ). **Manual técnico de leishmanioses caninas**. Paraná: CRMV-PR, 2015. 43p.

DEGRAVE, W. *et al.* Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*: a mini review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463-469, 1994.

DUARTE, M. L.; ROCHAEL, M. C. Perfil histopatológico e imuno-histoquímico da leishmaniose tegumentar americana com ênfase nos dendrócitos dérmicos FXIIIa+. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 6, p. 541-548, 2006.

DUXBURY, R. E.; SADUN, E. H. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 13, n. 4, p. 525-529, 1964.

FALQUETO, A. *et al.* Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1003-1010, 2003.

FALQUETO, A. *et al.* Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 4, p. 499-500, 1991.

FERRER, L. *et al.* Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. **Research in Veterinary Science**, v. 44, n. 2, p. 194-196, 1988.

FERREIRA, S. de A. *et al.* Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. 1-9, 2012.

FISA, R. *et al.* Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 105-111, 2001.

FREITAS, A. P. T. B. *et al.* Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 383-389, 2009.

GONTIJO, B. B. *et al.* Esporotricose e leishmaniose tegumentar em cães e gatos: semelhanças e diferenças. **Pubvet**, v. 5, n. 38, p. 1245-1250, 2011.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. de. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRIMALDI JUNIOR, G. *et al.* Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54-59, 2012.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

HARITH, A. E. *et al.* Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 4, p. 603-606, 1987.

HEID, C. A. *et al.* Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HEUSSER JÚNIOR, A. *et al.* Leishmaniose tegumentar canina no município de Balneário Camboriú, Estado de Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 713-718, 2010.

JACKSON, P. R. *et al.* Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. **Veterinary Parasitology**, v. 20, n. 1-3, p. 195-215, 1986.

LEITE, R. S. *et al.* PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 201-206, 2010.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274-287, 2008.

METTLER, M. *et al.* Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.

MONTANHA, F. P. *et al.* Leishmaniose canina – relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 20, p. 1-6, 2013.

NASCIMENTO, J. J. do; CARVALHO, P. L. B. de; ROCHA, F. J. S. Diagnóstico histopatológico diferencial entre hanseníase e leishmaniose tegumentar americana em

pacientes de um hospital público em Recife, PE. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 51, n. 2, p. 127-131, 2019.

OPAS (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD). **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Washington: OPAS, 2019b. 200 p.

OPAS (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD). **Normas, pautas y procedimientos para el diagnóstico y control**. Caracas: OPAS, 2019a. 196 p.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In: _____. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 291-309.

REIS, S. R. *et al.* Intradermoreação de Montenegro em cães (Mammalia: Canidae) experimentalmente inoculados por *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), principais agentes causadores de leishmaniose tegumentar na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, p. 593-595, 2008.

SANTOS, J. M. L. dos. *et al.* Prevalence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in dogs from Garanhuns, in the middle scrub zone (Agreste) of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 41-45, 2010.

SILVA, C. M. H. S. de; WINK, C. A. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2018.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TAFURI, W. L. *et al.* Estudo histopatológico comparativo do teste cutâneo em cães de área endêmica de leishmaniose tegumentar, utilizando dois antígenos: Leishvacin reo P10.000g. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, n. 1, p. 11-14, 1993.

TODOLÍ, F. *et al.* Anti-*Leishmania* IgA in urine samples from dogs with clinical leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 1, p. 17-23, 2009.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Control of the leishmaniases**: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. 949.ed. Geneva: World Health Organization, 2010. 186p.

ZANETTE, M. F. *et al.* Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 105-107, 2014.

ZANETTI, A. dos. S. *et al.* Diagnostic accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays to detect anti-*Leishmania* antibodies in patients with American tegumentary leishmaniasis: a

systematic review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, p. 1-11, 2019.

Capítulo 11

Resistência antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina em rebanhos brasileiros: uma revisão dos desafios no contexto da saúde única



Mikaela Vieira Beloni¹
Kássia Vidal Menezes²
Nicolly Soares Ferreira³
Fábulo Junior Nogueira Fernandes⁴
Mariana Drummond Costa Ignacchiti⁵
Juliana Alves Resende⁶

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mikaelabeloni@hotmail.com

² Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: kassiavidal@hotmail.com

³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: ni.colly_ferreira@hotmail.com

⁴ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: fabulojunior@gmail.com

⁵ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mariana.ignacchiti@ufes.br

⁶ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: juliana.resende@ufes.br

1 INTRODUÇÃO

A alta prevalência da mastite bovina nos rebanhos leiteiros está relacionada com o caráter multifatorial da doença que é decorrente de complexas interações entre os hospedeiros, o meio ambiente e agentes infecciosos. A doença é caracterizada por inflamação intramamária que causa alterações patológicas no tecido glandular e uma série de modificações físico-químicas no leite, resultando em prejuízos diretos à produção leiteira, devido a diminuição da produção e a qualidade do leite. Trata-se de patologia de difícil tratamento, que pode acometer grande quantidade de animais em uma única propriedade e apresenta altos índices de reincidência (RUEGG, 2017).

Na maioria dos casos, a mastite é causada pela invasão de bactérias potencialmente patogênicas e o conhecimento da persistência dos patógenos, bem como os fatores de risco associados com a doença são pontos críticos na prevenção da mastite. O *Staphylococcus aureus* além de importante patógeno humano é mundialmente conhecido como um dos principais responsáveis pela mastite bovina, sendo capaz de induzir infecções crônicas de difícil tratamento no úbere (ELEMO *et al.*, 2017; PÉREZ *et al.*, 2020b; REN *et al.*, 2020). Trata-se de um microrganismo potencialmente patogênico que tem habilidade de invadir e colonizar o epitélio mamário devido a inúmeros fatores de virulência, como: produção de enzimas (serina proteases, cisteína proteases, lipases), toxinas e formação de biofilme (ZAATOUT; AYACHI; KECHA, 2020).

Embora alguns programas de prevenção da mastite tenham sido implementados em diferentes países, a prevalência de *S. aureus* em vacas ainda permanece alta (PÉREZ *et al.*, 2020a). Estudos epidemiológicos têm demonstrado a presença do gênero *Staphylococcus* em aproximadamente 50% dos casos de mastite bovina (MELLO *et al.*, 2020). A persistência desta infecção está associada a falha da terapia antimicrobiana e à resistência antimicrobiana. O surgimento e disseminação de linhagens multirresistentes continua a desafiar a capacidade de tratar doenças zoonóticas e suscita discussões sobre os riscos para população humana (GOMES; HENRIQUES, 2015).

O tratamento e a prevenção da mastite incluem principalmente o uso de antibióticos e o manejo adequado dos animais para prevenir a propagação da doença aos animais saudáveis (PROCÓPIO *et al.*, 2019). No entanto, o uso de antibióticos deve ser cauteloso, pois o seu uso excessivo e indevido pode levar ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana, caracterizando-se como sério problema relacionado com a entrada de bactérias resistentes na cadeia alimentar (GOMES; HENRIQUES, 2015; PROCÓPIO *et al.*, 2019).

O uso de antibióticos no gado leiteiro pode acarretar também a presença de seus resíduos no leite que é usado para consumo humano, representando preocupação para os consumidores (GOMES; HENRIQUES, 2015). Diante deste cenário, é possível afirmar que a saúde humana está relacionada à saúde dos animais e ao contexto ambiental, especialmente onde a globalização, e a emergência de agentes infecciosas têm mudado a dinâmica das doenças nas populações (AHMAD; KHAN, 2019).

A partir do crescente aumento de doenças relacionadas a interações de fatores humanos, animais e ambientais surgiu uma nova abordagem para esclarecer esses problemas, conhecida como Saúde Única (*One Health*). Essa abordagem tem o intuito de definir políticas públicas eficazes para a prevenção e controle da disseminação de doenças infecciosas decorrentes dessa interface (HERNANDO-AMADO *et al.*, 2019).

Portanto, a contribuição da bovinocultura leiteira, a respeito da disseminação da resistência antimicrobiana destaca a importância da abordagem integrada e multissetorial na luta contra esse importante problema de saúde pública. Considerando a relevância da mastite bovina para a saúde pública e animal, este capítulo tem como objetivo apresentar uma atualização sobre a resistência antimicrobiana em *S. aureus* isoladas de mastite bovina em rebanhos brasileiro, com foco nos desafios no contexto da saúde única.

2 MASTITE BOVINA

O leite é um dos produtos mais versáteis da indústria alimentícia, sendo um dos alimentos mais importantes da dieta humana. Em 2017, a produção mundial de leite foi de 823 milhões de toneladas e a perspectiva é que até 2027 ocorra aumento de 22% na produção, principalmente em países em desenvolvimento, tal como o Brasil (LOPES *et al.*, 2020). Neste contexto, a mastite bovina é uma patologia que causa enormes prejuízos financeiros aos produtores e as indústrias de leite, em razão das perdas na produção e na qualidade do leite, mortes e abates prematuros de animais afetados e pelo custo referente ao tratamento (MUSHTAQ *et al.*, 2018). Em decorrência da infecção mastítica, são estimadas perdas econômicas anuais de US\$ 138,00 até US\$ 224,10 por vaca em lactação (GONÇALVES *et al.*, 2021).

A mastite é uma condição inflamatória da glândula mamária dos bovinos que se manifesta pelos sintomas inflamatórios (calor, rubor, tumor e dor) nos tetos, por alterações no leite (grumos, sangue e pus) e por queda na produção (LOPES *et al.*, 2020). Trata-se de uma das doenças mais frequentes e onerosas que acomete as vacas leiteiras em todo o mundo

(JAMALI *et al.*, 2018). Refere-se a uma patologia de natureza recorrente, de caráter complexo e multifatorial, envolvendo (i) condições relacionadas ao patógeno (virulência e quantidade de microrganismos invasores), (ii) condições inerentes ao animal (eficiência de defesa do úbere) e (iii) fatores de risco do ambiente (LEELAHAPONGSATHON *et al.*, 2020; MASSOTE *et al.*, 2019; VLIEGHER; OHNSTAD; PIEPERS, 2018).

O processo inflamatório da glândula mamária inicia-se após a invasão do canal do teto por patógenos microbianos, seguido de sua multiplicação nos tecidos produtores de leite (MUSHTAQ *et al.*, 2018). Rapidamente os mecanismos de defesa do úbere iniciam a resposta imune de fase aguda em combate a infecção intramamária. Se os mecanismos de defesa do úbere forem eficientes no combate a infecção, as bactérias serão completamente destruídas, o recrutamento de neutrófilos da fase aguda será interrompido e ocorrerá um quadro de infecção intramamária transitória, que se cura espontaneamente (LEELAHAPONGSATHON *et al.*, 2020).

Porém, se os mecanismos de defesa do úbere não forem eficientes no combate a infecção, a mastite pode manifestar-se de duas formas. A primeira é caracterizada por uma resposta imunológica agressiva e com sintomas inflamatórios graves, como temperatura retal elevada, letargia e anorexia, além das alterações observadas na glândula mamária e no leite. Esse quadro clínico é classificado como mastite clínica (MC) e pode se manifestar de forma hiperaguda, aguda, subaguda, crônica e gangrenosa (LEELAHAPONGSATHON *et al.*, 2020; MASSOTE *et al.*, 2019; VLIEGHER; OHNSTAD; PIEPERS, 2018). A segunda forma é caracterizada por uma resposta imune menos agressiva, resultando na persistência da infecção intramamária sem sinais clínicos, ou seja, não há mudança detectável no úbere e não há anormalidades visíveis no leite. Porém, pode ocorrer a detecção de bactérias nas secreções, tal como a redução da produção e alterações na composição do leite, como o aumento na contagem de células somáticas e alterações nos teores de caseína, cálcio, gordura e lactose. Este quadro é classificado como mastite subclínica (MS) e pode afetar cerca de 20-50% das vacas de um determinado rebanho, sendo a forma mais frequente de mastite (BRASIL, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2018; VLIEGHER; OHNSTAD; PIEPERS, 2018). Devido ao seu desenvolvimento silencioso, as manifestações subclínicas frequentemente evoluem para infecções crônicas (ROCHA *et al.*, 2019).

Mais de 140 espécies de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e algas, foram identificados como agentes causadores da mastite bovina. Esses microrganismos podem ser classificados em patógenos ambientais ou patógenos contagiosos, de acordo com sua origem e meio de transmissão (MUSHTAQ *et al.*, 2018).

Os patógenos ambientais são microrganismos oportunistas presentes no ambiente em que esses animais estão inseridos, como na água contaminada, no solo, nas fezes e nos equipamentos de ordenha. Desta forma, a invasão da glândula mamária por esses patógenos pode ocorrer na ordenha ou quando as vacas se deitam em ambientes contaminados. Entre os patógenos ambientais os mais encontrados são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, leveduras, algas e fungos (BRASIL, 2012; MASSOTE *et al.*, 2019; PÉREZ *et al.*, 2020a; VLIEGHER; OHNSTAD; PIEPERS, 2018).

Os patógenos contagiosos são microrganismos transmitidos pelo contato de um animal mastítico com outros animais. Esses microrganismos geralmente fazem parte da microbiota natural do animal, como é o caso do *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (BELONI *et al.*, 2020).

3 *Staphylococcus aureus*: PRINCIPAL AGENTE ETIOLÓGICO DA MASTITE SUBCLÍNICA

Staphylococcus aureus é mundialmente conhecido como um dos principais patógenos contagiosos envolvidos em infecções subclínicas da mastite bovina (MOLINERI *et al.*, 2021; PÉREZ *et al.*, 2020b). Esse microrganismo é capaz de induzir infecções crônicas de longa duração, de natureza recorrente e com baixa resposta a terapia antibiótica (MOLINERI *et al.*, 2021; PÉREZ *et al.*, 2020a). Por se tratar de patógeno contagioso, o *S. aureus* comumente tem a pele do teto e as glândulas mamárias como seu reservatório primário, sendo transferido para outros animais do rebanho durante a ordenha (SCHMIDT; KOCK; EHLERS, 2017).

Estudos realizados no continente Africano, na Europa e na América relataram alta prevalência de *S. aureus* causando infecções mastíticas em vacas leiteiras. Na África, um estudo realizado por Elemo *et al.* (2017), no sudeste da Etiópia, avaliou o envolvimento do *S. aureus* em 251 casos de mastite clínica ou subclínica em vacas leiteiras em lactação. A prevalência geral de *S. aureus* foi de 44,62% (112/251). Sendo isolado em 34,62% (9/26) dos casos clínicos e em 45,78% (103/225) dos subclínicos. Ainda na Etiópia, Abebe *et al.* (2016), observaram a prevalência do *S. aureus* em 73,2% de 95 rebanhos leiteiros acometidos por mastite. No Brasil, Busanello *et al.* (2017), relatou a prevalência de *S. aureus* em diversos estados brasileiros, variando entre 4,8% e 28,2%.

A infecção por *S. aureus* se inicia com a adesão dessas bactérias no epitélio do teto do hospedeiro bovino, logo, diferentes enzimas e toxinas produzidas rompem as barreiras do

epitélio do úbere, permitindo a penetração no tecido e a colonização da camada queratinizada do canal do teto. Essa camada atua como uma barreira física que protege as bactérias da fagocitose, tornando a cura espontânea difícil ou mesmo impossível (KIBEBEW, 2017).

Os produtos bacterianos, secretados para o rompimento das barreiras do epitélio do úbere, atuam como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - *Pathogen Associated Molecular Pattern*) contribuindo para a detecção desses microrganismos pelo sistema imunológico, especificamente pelas células epiteliais mamárias. Visto que essas células possuem receptores de reconhecimento de moléculas padrão (PRRs) que atuam como “sensores” imunológicos que permite rápido reconhecimento e ativação de uma resposta imune, produzindo mediadores de inflamação e defesa local (PÉREZ *et al.*, 2020a).

Esta resposta inflamatória associada a infecção, resulta no aumento na contagem de células somáticas, comprometimento da capacidade de produção de leite do tecido mamário e alteração na composição do leite. Este quadro inflamatório causa aumento da permeabilidade vascular, culminando no vazamento de íons, proteínas e enzimas e diminuição da síntese de alguns componentes do leite, como a caseína, lactose, gordura e sólidos desnatados, afetando a qualidade do leite produzido (MALIK *et al.*, 2018).

Além da importância para a produção animal, a presença do *S. aureus* no úbere bovino é de grande relevância para a saúde pública, visto que esses microrganismos podem ser veiculados no leite e em produtos lácteos e causar graves infecções em humanos, principalmente porque os *S. aureus* são capazes de produzir enterotoxinas (LAVOR *et al.*, 2019). Adicionado a isso, a presença de genes associados a resistência aos antibióticos nessas linhagens é uma grande ameaça. Outrora pensava-se que a disseminação de genes de resistência fosse restrita a linhagens animais, porém nos últimos anos estes genes têm sido identificados em linhagens de origem humana (PÉREZ *et al.*, 2020a).

4 IMPORTÂNCIA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *S. aureus* PARA A MASTITE BOVINA

S. aureus pode exibir múltiplos fatores de virulência que facilitam a invasão, colonização do tecido do hospedeiro, evasões dos mecanismos de defesa imunológica e auxiliam na aquisição de nutrientes e disseminação pelo tecido infectado (HOEKSTRA *et al.*, 2018). A expressão desses fatores de virulência é controlada por fatores de transcrição. Observou-se que durante os estágios iniciais da infecção, na fase logarítmica de crescimento, ocorre a expressão de adesinas de superfície que se ligam a receptores do epitélio do hospedeiro,

favorecendo a colonização e posterior multiplicação do microrganismo; enquanto na fase estacionária ocorre a secreção de toxinas (hemolisinas α , β e γ , leucotoxinas, enterotoxinas) e enzimas (serina proteases, cisteína proteases, lipases) favorecendo a disseminação dos microrganismos para os tecidos adjacentes. A expressão sequencial, das proteínas de membranas (adesão celular) e das toxinas é muito importante para a patogênese da mastite causada por *S. aureus* (LOWY, 1998; PÉREZ *et al.*, 2020a).

A adesina intercelular polissacarídica (PIA), também atua na capacidade de formação da matriz extracelular (MEC) dos *S. aureus*, considerado importante fator de virulência. Essa substância polimérica extracelular promove a adesão entre as células e atua como barreira protetora contra o sistema imunológico do hospedeiro (NOTCOVICH *et al.*, 2018; VALERO-LEAL *et al.*, 2017). A formação da MEC é importante para a formação do biofilme, que consiste em um processo de várias etapas que envolvem a fixação celular e a formação de matriz extracelular, resultando em uma comunidade bacteriana englobada por matriz de composição complexa, aderida a uma superfície biótica ou abiótica (NOTCOVICH *et al.*, 2018; VALERO-LEAL *et al.*, 2017).

O biofilme é responsável por infecções crônicas e/ou persistentes, pois facilita a aderência e colonização do *Staphylococcus* spp. ao epitélio da glândula mamária, como também contribui para a evasão das defesas imunológicas e para a sobrevivência dos patógenos as condições adversas dentro do hospedeiro. Dentro do biofilme, as bactérias se adaptam apresentando alterações metabólicas devido ao estresse, aumento da mutabilidade, troca de material genético e de expressão gênica. Além disso, o biofilme reduz a difusão de drogas dentro da matriz, tornando os patógenos resistentes a altas concentrações de antimicrobianos, termo definido como recalcitrância clínica aos antibióticos. A recalcitrância aos antibióticos é alcançada em biofilmes por meio de uma variedade de mecanismos. Células de biofilme são 10-1000 vezes menos suscetíveis a vários agentes antimicrobianos do que em sua forma planctônicas, o que pode limitar os tratamentos terapêuticos (ASLANTAŞ; DEMIR, 2016; MOORMEIER; BAYLES, 2017; VALERO-LEAL *et al.*, 2017; URUÉN *et al.*, 2021).

A capacidade de formação de biofilme por *S. aureus* da glândula mamária foi demonstrada *in vitro* (NOTCOVICH *et al.*, 2018) e *in vivo* (ASLANTAŞ; DEMIR, 2016). Pérez *et al.* (2020b), demonstraram que linhagens de *S. aureus* isoladas de mastite bovina em quatro estados brasileiros, são em sua maioria linhagens formadoras de biofilme. Gogoi-Tiwari *et al.* (2017) demonstraram, através de análise histopatológica em modelo murino, que glândulas mamárias infectadas com linhagens de *S. aureus* formadoras de biofilme apresentam um intenso infiltrado neutrofílico e necrose no tecido das glândulas mamárias e reação muito

menos severa quando infectadas com linhagens fracamente produtoras de biofilme. Estes relatos demonstram a importância dos fatores de virulência do *S. aureus* para o sucesso da infecção mastítica em bovinos.

5 TERAPÊUTICA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA ASSOCIADOS A MASTITE BOVINA CAUSADA POR *S. aureus*

O controle e tratamento da mastite causada por *S. aureus* é um desafio para os produtores de leite e indústrias de laticínios em todo o mundo. O sucesso terapêutico da mastite depende principalmente do patógeno envolvido, do grau de lesão do parênquima mamário, da seleção das drogas antimicrobianas, da via de administração e da eliminação de fatores que predis põe a infecção (HOSSAIN, 2017).

Atualmente, o método mais comum para o tratamento da mastite bovina é a infusão intramamária de antibióticos. Os antibióticos são fármacos quimioterápicos empregados no tratamento de infecções (KATZUNG; TREVOR, 2017). Esses medicamentos são utilizados com objetivo de reduzir a incidência de novas infecções intramamárias e a duração das infecções previamente existentes. No entanto, este tipo de estratégia apresenta algumas desvantagens, incluindo: a baixa taxa de cura e o aumento da ocorrência de microrganismos resistentes (MUSHTAQ *et al.*, 2018; VARELA-ORTIZ *et al.*, 2018).

Outra desvantagem do uso desses medicamentos em bovinos, é que o leite obtido durante o período de tratamento da mastite deve ser descartado, pois pode conter resíduos de antimicrobianos. Assim, considerando a baixa relação custo-benefício do tratamento da doença e o risco associado a presença de antimicrobianos no leite, o tratamento antibiótico da mastite bovina durante a lactação não é recomendado, exceto em casos pontuais (LANGONI *et al.*, 2017).

Os principais antibióticos disponíveis no mercado nacional, com indicação na bula para tratamento de mastite bovina, e com atividade frente ao patógeno *S. aureus*, estão apresentados na Tabela 1. Eles são divididos em oito classes e somam 28 princípios ativos (PEREIRA; SCUSSEL, 2017; SOUZA *et al.*, 2015).

Em um estudo prospectivo, Tomazi e Santos (2020) caracterizaram o perfil de tratamento e quantificaram o consumo de antimicrobianos para o tratamento da mastite em rebanhos leiteiros do Brasil. Entre as drogas intramamárias, os aminoglicosídeos foram os antimicrobianos mais consumidos, seguido pela combinação de tetraciclina, aminoglicosídeo e polipeptídeo. Para antimicrobianos administrados sistemicamente, fluoroquinolonas, seguido

de penicilina e a combinação de sulfonamida e pirimidina. O uso de terapia de combinação (ou seja, associação de antimicrobianos administrados intramamários e sistemicamente) foi relatado para 64,3% dos tratamentos no nível de vacas.

Tabela 1 - Principais antibióticos disponíveis no mercado nacional com indicação na bula para o tratamento da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*.

Classe dos antibióticos	Princípio ativo	Referência
Aminoglicosídeos	Estreptomicina; Gentamicina; Neomicina.	Pereira e Scussel (2017) e Souza <i>et al.</i> (2015)
Beta-lactâmicos (Penicilinas e Cefalosporinas)	Amoxicilina; Ampicilina; Benzilpenicilina (Penicilina G); Cefalexina; Cefalônio; Cefoperazone; Cefquinoma; Ceftiofur; Cloxacilina.	Pereira e Scussel (2017) e Souza <i>et al.</i> (2015)
Lincosamidas	Lincomicina	Pereira e Scussel (2017) e Souza <i>et al.</i> (2015)
Macrolídeos	Espiramicina; Tilosina	Pereira e Scussel (2017) e Souza <i>et al.</i> (2015)
Polipeptídeos	Bacitracina	Souza <i>et al.</i> (2015)
Quinolonas	Ciprofloxacina; Danofloxacina; Enrofloxacina; Marbofloxacina; Norfloxacina	Pereira e Scussel (2017) e Souza <i>et al.</i> (2015)
Sulfonamidas	Sulfadiazina; Sulfametoxipiridazina; Sulfadoxina; Sulfametoxazol; Trimetoprim	Pereira e Scussel (2017) e Souza <i>et al.</i> (2015)
Tetraciclinas	Oxitetraciclina; Tetraciclina	Pereira e Scussel (2017) e Souza <i>et al.</i> (2015)

Fonte: Os autores.

A eficácia do uso dos antimicrobianos depende de muitos fatores, tais como as características específicas da interação do antibiótico com o patógeno, as características farmacocinéticas do medicamento e a susceptibilidade do microrganismo (ZAINETTINOVA *et al.*, 2019).

Contudo, observa-se que a administração intramamária de antibióticos apresenta baixa taxa de cura frente ao *S. aureus*, variando de 10-30%, e resultando em infecções crônicas e recorrentes (GOMES; HENRIQUES, 2015; ZAATOUT; AYACHI; KECHA, 2020). A indicação do tratamento de longa duração, ou terapia estendida, tem melhorado a resposta ao tratamento em casos de mastite por *S. aureus*, no entanto, com taxas de cura ainda baixas, de 30-50% (LANGONI *et al.*, 2017). Assim, os antibióticos não são mais considerados suficientes

para o sucesso no tratamento da mastite bovina causada por *S. aureus* (ZAATOUT; AYACHI; KECHA, 2020).

A baixa taxa de cura em infecções estafilocócicas, se deve a dois fatores principais. O primeiro refere-se à capacidade dessa espécie de invadir o tecido da glândula mamária e formar abscessos, tornando o tratamento das infecções mais difícil pela restrição de seu contato com os antibióticos. O segundo refere-se ao desenvolvimento de resistência aos antibióticos pelas linhagens (GOMES; HENRIQUES, 2015).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno natural que ocorre geralmente devido a modificações genéticas adquiridas por mutação e seleção (transferência vertical de genes) e/ou aquisição de genes de resistência entre diferentes espécies (transferência horizontal de genes). A seleção de linhagens resistentes pode ser acelerada pelo uso incorreto de antimicrobianos. Tem sido demonstrado que o uso de antimicrobianos em concentrações subclínicas pode estimular a transferência horizontal de genes relacionados à resistência (HOSSAIN, 2017; PÉREZ *et al.*, 2020a). Assim, a administração de baixas concentrações de agentes antimicrobianos nos animais pode selecionar bactérias portadoras de genes de resistência antimicrobiana (ARGs) ou plasmídeos de multirresistência, levando à multiplicação e disseminação desses genes entre as linhagens (PÉREZ *et al.*, 2020a).

Para que o tratamento da mastite com antimicrobianos seja bem-sucedido o princípio ativo deve atingir e conservar concentrações dentro do úbere acima da concentração inibitória mínima (CIM), e se possível, acima do valor da concentração bactericida mínima (CBM) para o patógeno causador (HOSSAIN, 2017; PÉREZ *et al.*, 2020a). Além disso, os determinantes genéticos da resistência antimicrobiana, muitas vezes localizados em elementos genéticos móveis (transposon), podem ser facilmente transmitidos entre diferentes hospedeiros, incluindo humanos, animais e o meio ambiente (HARBOTTLE *et al.*, 2006).

O surgimento e a disseminação da resistência antimicrobiana continuam sendo desafio para o tratamento de doenças zoonóticas e exigem conhecimento avançado sobre a frequência de resistência entre bactérias potencialmente zoonóticas, a fim de monitorar os riscos à população humana (ISKANDAR *et al.*, 2020). Neste sentido, o perfil de resistência de linhagens de *S. aureus* isoladas de mastite bovina em rebanhos brasileiros no ano de 2020, está resumida na Tabela 2.

Tabela 2 – Resistência aos antimicrobianos em linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina em rebanhos brasileiros no ano de 2020 (continua).

Classe dos antibióticos	Princípio ativo	Prevalência da resistência	Referência	
Aminoglicosídeos	Aminoglicosídeos	3,25% (13/400)	Pérez <i>et al.</i> (2020b)	
	Bacitracina	100% (1/1)	Duarte <i>et al.</i> (2020)	
	Estreptomicina	33,33% (7/20)	Tavo <i>et al.</i> (2020)	
	Gentamicina		0% (0/20)	Tavo <i>et al.</i> (2020)
			5,71% (2/35)	Alves <i>et al.</i> (2020)
		80% (146/182)	Santos <i>et al.</i> (2020)	
Anfenicóis	Cloranfenicol	0% (0/20)	Tavo <i>et al.</i> (2020)	
		2,85% (1/35)	Alves <i>et al.</i> (2020)	
Betalactâmicos (Penicilinas e Cefalosporinas)	Amoxicilina	33,33% (7/20)	Tavo <i>et al.</i> (2020)	
	Ampicilina	20,00% (3/15)	Monistero <i>et al.</i> (2020)	
	Aztreonam	100% (1/1)	Duarte <i>et al.</i> (2020)	
	Benzilpenicilina		94,50% (172/182)	Santos <i>et al.</i> (2020)
			100% (20/20)	Tavo <i>et al.</i> (2020)
			80% (28/35)	Alves <i>et al.</i> (2020)
	Penicilina		52,25% (217/400)	Pérez <i>et al.</i> (2020b)
			20% (3/15)	Monistero <i>et al.</i> (2020)
			15,85% (26/164)	Zuniga <i>et al.</i> (2020)
	Cefoxitina	2,19% (4/182)	Santos <i>et al.</i> (2020)	
Oxacilina		3,84% (7/182)	Santos <i>et al.</i> (2020)	
		1,22% (1/82)	Mello <i>et al.</i> (2020)	
Glicopeptídeos	Vancomicina	22,2% (4/20)	Tavo <i>et al.</i> (2020)	
		0% (0/82)	Mello <i>et al.</i> (2020)	
Lincosamidas	Lincomicina	47,7% (7/15)	Monistero <i>et al.</i> (2020)	
	Clindamicina	14,28% (5/35)	Alves <i>et al.</i> (2020)	
Macrolídeos	Macrolídeos	5,25% (21/400)	Pérez <i>et al.</i> (2020b)	
		13,3% (2/15)	Monistero <i>et al.</i> (2020)	
		14,28% (5/35)	Alves <i>et al.</i> (2020)	
	Espiramicina	93,3% (14/15)	Monistero <i>et al.</i> (2020)	
Rifamicina	2,85% (1/35)	Alves <i>et al.</i> (2020)		

Tabela 2 – Resistência aos antimicrobianos em linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina em rebanhos brasileiros no ano de 2020 (conclusão).

Classe dos antibióticos	Princípio ativo	Prevalência da resistência	Referência
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	8,57% (3/35)	Alves <i>et al.</i> (2020)
Quinolonas	Quinolonas	1,75 % (7/400)	Pérez <i>et al.</i> (2020b)
Tetraciclina	Tetraciclina	100% (20/20)	Tavo <i>et al.</i> (2020)
		15,50% (62/400)	Pérez <i>et al.</i> (2020b)
		20,00% (7/35)	Alves <i>et al.</i> (2020)
		43,96% (80/182)	Santos <i>et al.</i> (2020)

Fonte: Os autores.

Através da pesquisa nas bases de dados foram encontradas 8 publicações científicas relacionadas ao perfil de resistência aos antimicrobianos de linhagens de *S. aureus* isoladas da mastite bovina em rebanhos brasileiros, no ano de 2020. Os estudos apresentados na Tabela 2 somam um total de 899 linhagens de *S. aureus* isoladas em rebanhos de nove estados brasileiros, são eles, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Apenas o trabalho de Monistero *et al.* (2020) não descreveu o estado de origem das amostras.

Minas Gerais destaca-se na produção leiteira sendo o estado mais avaliado, seis entre os oito trabalhos apresentados avaliaram linhagens de *S. aureus* isoladas de rebanhos bovinos mineiros. Nota-se também que quatro trabalhos avaliaram linhagens de *S. aureus* cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Gado de Leite, Brasil). A Embrapa é uma grande referência brasileira em pesquisa da mastite bovina, e seu acervo é composto por linhagens de *S. aureus* coletadas ao longo de muitos anos, de diversos estados brasileiros, abrangendo as principais regiões produtoras de leite do Brasil (PÉREZ *et al.*, 2020b).

Todas as linhagens estudadas foram isoladas de amostras de leite de vacas com mastite clínica ou subclínica. As técnicas tradicionais de cultivo e identificação de *S. aureus* foram largamente utilizadas, tal como a inoculação do leite ou do isolado em placas de ágar manitol (meio seletivo para *S. aureus*), ágar sangue (determinação da atividade hemolítica), ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) e ágar nutriente, seguida da confirmação das colônias por coloração Gram, análises morfológicas, testes bioquímicos (maltose, trealose e manitol), testes de catalase e coagulase. Pérez *et al.* (2020b) e Santos *et al.* (2020) além de realizar a avaliação fenotípica, confirmaram a identificação dos isolados por análise de reação em cadeia da polimerase (PCR) e pela detecção do gene da termonuclease (*nuc*) específico para *S. aureus*.

Diferentes técnicas para avaliação da resistência aos antimicrobianos foram utilizadas: PCR (PÉREZ *et al.*, 2020b; ZUNIGA *et al.*, 2020), reverse transcription (RT)-PCR (ZUNIGA *et al.*, 2020), difusão em disco (ALVES *et al.*, 2020; DUARTE *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2020; TAVO *et al.*, 2020), Vitek 2® Compact (SANTOS *et al.*, 2020), E-test (MELLO *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2020), MICRONAUT-S Mastitis (MONISTERO *et al.*, 2020) e microdiluição em caldo (DUARTE *et al.*, 2020; MONISTERO *et al.*, 2020). O método mais utilizado para avaliação das linhagens foi o teste difusão em disco, observado em quatro dos artigos analisados, seguido da PCR, E-test e microdiluição em caldo, observados em dois artigos cada um.

Os diferentes métodos empregados nos estudos podem ser levados em consideração na comparação do perfil de resistência. De forma geral, os critérios interpretativos dos dados são definidos de modo que haja correlação entre os métodos. O teste de difusão em disco é utilizado rotineiramente em laboratórios de diagnóstico, por ser de fácil execução e não exigir equipamentos especiais, entre outras vantagens em relação aos testes de diluição. Enquanto os testes de diluição fornecem resultado quantitativo, a concentração do antibiótico que inibe uma determinada espécie bacteriana (CLSI, 2018). Os critérios interpretativos são determinados pela seleção de pontos de corte que definem as categorias de suscetibilidade e resistência destinadas a orientar as decisões de tratamento (TOMAZI; SANTOS, 2020). Nestes estudos, os pontos de corte estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) foram usados para análise dos resultados do teste de difusão em disco, Vitek 2® Compact, E-test, MICRONAUT-S Mastitis e microdiluição em caldo. No trabalho de Monistero *et al.* (2020) pontos de corte padronizados pela Société Française de Microbiologie (SFM) também foram usados, para lincomicina, canamicina e espiramicina.

Para as análises realizadas por PCR, a resistência bacteriana foi determinada pela ocorrência e expressão dos genes de resistência, os principais genes investigados estão apresentados na Tabela 3. No trabalho de Pérez *et al.* (2020b), as linhagens que exibiram fenótipo de resistência a qualquer um dos antimicrobianos no teste de difusão em disco foram avaliados quanto à presença de genes de resistência aos fármacos, os resultados mostraram que a maior prevalência foi para o gene *blaZ*, 82,03% (178/217), e a menor prevalência foi para o *tetL* 1,61% (1/62). Neste mesmo estudo, o gene de resistência à fluoroquinolona, *mepA*, foi detectado pela primeira vez em todos os isolados de *S. aureus* de mastite bovina fenotipicamente resistentes à ciprofloxacina ou enrofloxacin (7/7).

Tabela 3 – Genes de resistência antimicrobiana investigados em *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina nas análises por PCR.

Alvo	Gene	Referência
Resistência aos aminoglicosídeos	<i>aac</i> (6' - <i>Ie-aph</i> (2') – <i>Ia</i> ; <i>aacA-aphD</i>	Pérez <i>et al.</i> (2020b) e Zuniga <i>et al.</i> (2020).
Resistência a betalactâmicos	<i>mecA</i> , <i>mecA</i> (LGA251), <i>blaZ</i> , <i>femA</i> e <i>femB</i>	Pérez <i>et al.</i> (2020b) e Zuniga <i>et al.</i> (2020).
Resistência a macrolídeos	<i>erm</i> (A); <i>erm</i> (B); <i>erm</i> (C); <i>erm</i> (Y); <i>mph</i> (C); <i>msr</i> (A)	Pérez <i>et al.</i> (2020b)
Resistência a macrolídeo / lincosamida / estreptogramina B	<i>erm</i> (T)	Pérez <i>et al.</i> (2020b)
Resistência a quinolonas	<i>mepA</i>	Pérez <i>et al.</i> (2020b)
Resistência à tetraciclina	<i>tet</i> (L); <i>tet</i> (K); <i>tet</i> (M);	Pérez <i>et al.</i> (2020b)

Fonte: Os autores.

Outro fator que deve ser considerado na interpretação dos resultados é o tamanho da amostra do estudo. Por exemplo, observa-se que a prevalência de resistência para gentamicina variou de 0% a 80%, e o tamanho amostral variou de 20 a 182 respectivamente (TAVO *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2020). Assim compreende-se que a variação no número de amostras avaliadas tem grande impacto no resultado, quando apresentados em porcentagem. Contudo é evidente que as linhagens de *S. aureus* têm apresentado alta prevalência de resistência a quase todas as classes de agentes antimicrobianos aprovados para o uso em animais e humanos (ALVES *et al.*, 2020; DUARTE *et al.*, 2020; MELLO *et al.*, 2020; MONISTERO *et al.*, 2020; PÉREZ *et al.*, 2020b; SANTOS *et al.*, 2020; TAVO *et al.*, 2020; ZUNIGA *et al.*, 2020). Desta forma os riscos destas linhagens associadas a mastite bovina para a saúde pública não podem ser ignorados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mastite bovina é uma doença de caráter complexo e multifatorial, que afeta o bem-estar animal e causa grandes impactos financeiro em todos os setores da cadeia produtiva, desde os produtores de leite até as indústrias de laticínios e derivados. *S. aureus* é o principal microrganismo contagioso causador da mastite. Dada a diversos fatores de virulência, esse patógeno causa infecções persistentes e de difícil tratamento. Assim destaca-se necessidade de compreender os potenciais riscos das linhagens de *S. aureus* prevalentes em infecções intramamárias em rebanhos bovinos brasileiros.

Quando presentes em infecções mastíticas em bovinos, *S. aureus* podem ser potencialmente transmitidos aos seres humanos, por meio da transmissão ocupacional ou ainda veiculados diretamente através do leite e da carne. Uma vez diagnosticada a mastite, o principal desafio do veterinário/produtor é tratar os animais. Atualmente, os antibióticos têm sido amplamente utilizados como o único agente terapêutico no manejo. No entanto, além dos custos relacionados ao tratamento, o surgimento de resistência e a não responsividade do gado aos antibióticos, várias outras opções de tratamento estão sendo exploradas (vacinas, bacteriocinas, fitoterapia, imunoterapia e tecnologia de nanopartículas). Novas pesquisas devem ser direcionadas para estratégias terapêuticas avançadas no intuito de oferecer solução para a situação atual. Além disso, técnicas de diagnóstico precoce e eficiente no nível da fazenda também devem ser estimuladas, o que permitirá o controle e tratamento eficaz da mastite.

O controle contínuo da doença e da disseminação de patógenos emergentes é desafiador e requer abordagem de saúde única, no qual, setores ambientais, veterinários e de saúde humana devem trabalhar em estreita colaboração para melhor compreender a ecologia e prevenção de doenças zoonóticas, uma vez que bactérias resistentes podem se espalhar de um para o outro, sem reconhecer as fronteiras humano-animal ou geográficas.

8 REFERÊNCIA

- ABEBE, R. *et al.* Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2016.
- AHMAD, M.; KHAN, A. U. Global economic impact of antibiotic resistance: a review. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 19, n. 1, p. 313-316, 2019.
- ALVES, M. F. N. F. *et al.* First report of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring mecC gene in milk samples from cows with mastitis in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 2175-2179, 2020.
- ASLANTAŞ, Ö.; DEMIR, C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 8607-8613, 2016.
- BELONI, M. V. *et al.* Atividade antibacteriana dos óleos essenciais frente a agentes causadores da mastite bovina. In: SILVA, M. A. da. *et al.* **Tópicos Especiais em Ciência Animal IX**. 1. ed. Alegre: CAUFES, 2020. p. 262-281.
- BRASIL. Governo do Brasil. Ministério da educação. Mastite bovina: controle e prevenção. **Boletim Técnico**, v.1, n. 93, p. 1-30, 2012.

- BUSANELLO, M. *et al.* Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6545–6553, 2017.
- CLSI (CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: CLSI standard M100. 28. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018. 296p.
- DUARTE, V. D. S. *et al.* Milk microbial composition of Brazilian dairy cows entering the dry period and genomic comparison between *Staphylococcus aureus* strains susceptible to the bacteriophage vB_SauM-UFV_DC4. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.
- ELEMO, K. K. *et al.* Prevalence, risk factors and multidrug resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in selected dairy farms in and around Asella town, Arsi Zone, South Eastern Ethiopia. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 45, p. 1632–1642, 2017.
- GOGOI-TIWARI, J. *et al.* Mammary gland pathology subsequent to acute infection with strong versus weak biofilm forming *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: a pilot study using non-invasive mouse mastitis model. **PloS One**, v. 12, n. 1, p. 1-19, 2017.
- GOMES, F.; HENRIQUES, M. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. **Current Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 377-382, 2015.
- GONÇALVES, J. L. *et al.* Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. **Livestock Science**, n.1, v. 210, p. 25-32, 2018.
- GONÇALVES, J. L. *et al.* Herd-level associations between somatic cell counts and economic performance indicators in Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 2, p. 1855-1863, 2021.
- HARBOTTLE, H. *et al.* Genetics of antimicrobial resistance. **Animal Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 111-124, 2006.
- HERNANDO-AMADO, S. *et al.* Defining and combating antibiotic resistance from one health and global health perspectives. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1432-1442, 2019.
- HOEKSTRA, J. *et al.* High production of LukMF' in *Staphylococcus aureus* field strains is associated with clinical bovine mastitis. **Toxins**, v. 10, n. 5, p. 200-210, 2018.
- HOSSAIN, M. K. Bovine mastitis and its therapeutic strategy doing antibiotic sensitivity test. **Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2017.
- ISKANDAR, K. *et al.* Drivers of antibiotic resistance transmission in low-and middle-income countries from a “one health” perspective — a review. **Antibiotics**, v. 9, n. 7, p. 372–394, 2020.
- JAMALI, H. *et al.* Invited review: incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 6, p. 4729-4746, 2018.

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 13. ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2017. 1202 p.

KIBEBEW, K. Bovine mastitis: a review of causes and epidemiological point of view. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 7, n. 2, p. 1-14, 2017.

LANGONI, H. *et al.* Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1261-1269, 2017.

LAVOR, U. L. *et al.* Bacterial identification, somatic cell count, antimicrobial profile and toxigenic *Staphylococcus* strains search from mastitic cow milk samples on small farms properties. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 715-722, 2019.

LEELAHAPONGSATHON, K. *et al.* Epidemiologia molecular das infecções intramamárias por *Streptococcus uberis*: padrões persistentes e transitórios de infecção em um rebanho leiteiro. **Journal of Milk Science**, v. 103, n. 4, p. 3565-3576, 2020.

LOPES, T. S. *et al.* Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 131, n. 1, p. 186-193, 2020.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

MALIK, T. A. *et al.* Somatic cells in relation to udder health and milk quality-a review **Journal of Animal Health and Production**, v. 6, n. 1, p. 18-26, 2018.

MASSOTE, V. P. *et al.* Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. **Revista Agroveterinária do Sul de Minas**, v. 1, n. 1, p. 41-54, 2019.

MELLO, P. L. *et al.* *Staphylococcus* spp. Isolated from bovine subclinical mastitis in different regions of Brazil: molecular typing and biofilm gene expression analysis by RT-qPCR. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 1-17, 2020.

MOLINERI, A. I. *et al.* Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis: systematic review and meta-analysis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 188, n. 1, p. 1-10, 2021.

MONISTERO, V. *et al.* Different distribution of antimicrobial resistance genes and virulence profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical mastitis in six countries. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 4, p. 3431-3446, 2020.

MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 365-376, 2017.

MUSHTAQ, S. *et al.* Bovine mastitis: an appraisal of its alternative herbal cure. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, n. 1, p. 357-361, 2018.

NOTCOVICH, S. *et al.* Biofilm-forming potential of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in New Zealand. **Veterinary Sciences**, v. 5, n. 1, p. 8-12, 2018.

- PEREIRA, M. N.; SCUSSEL, V. M. Resíduos de antimicrobianos em leite bovino: fonte de contaminação, impactos e controle. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 2, p. 170–182, 2017.
- PÉREZ, V. K. C. *et al.* Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, n. 1, p. 792–802, 2020a.
- PÉREZ, V. K. C. *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 2111-2122, 2020b.
- PROCÓPIO, T. F. *et al.* Looking for alternative treatments for bovine and caprine mastitis: evaluation of the potential of *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae lectin (CasuL), both alone and in combination with antibiotics. **Microbiology Open**, v. 8, n. 11, p. 1-11, 2019.
- REN, Q. *et al.* Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 4, p. 3368–3380, 2020.
- ROCHA, L S. *et al.* Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical bovine mastitis. **PloS One**, v. 14, n. 8, p. 1-19, 2019.
- RUEGG, P. L. A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10381-10397, 2017.
- SANTOS, R. P. *et al.* Molecular typing and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis and nasal samples. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 1-9, 2020.
- SCHMIDT, T.; KOCK, M. M.; EHLERS, M. M. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and close human contacts in South African dairy herds: genetic diversity and inter-species host transmission. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 511, 2017.
- SOUZA, G. N. de. *et al.* Circular técnica 108: avaliação de informações técnicas contidas nas bulas dos antimicrobianos indicados para mastite bovina como método auxiliar na definição de protocolos de tratamento. **Embrapa Gado de Leite**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2015.
- TAVO, L. C. V. ã. *et al.* Microbiological evaluation of milk quality and antibiogram in dairy cows managed on pasture. **Journal of Agricultural Studies**, v. 8, n. 3, p. 321-334, 2020.
- TOMAZI, T.; SANTOS, M. V. dos. Antimicrobial use for treatment of clinical mastitis in dairy herds from Brazil and its association with herd-level descriptors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 176, n. 1, p. 1-8, 2020.
- URUÉN, C. *et al.* Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 1-36, 2021.

VALERO-LEAL, K. *et al.* Capacidad de formación de biopelícula y limo en *Staphylococcus* que causan mastitis subclínica bovina en el estado Zulia-Venezuela. **Kasmera**, v. 45, n. 1, p. 24-32, 2017.

VARELA-ORTIZ, D. F. *et al.* Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases and in vitro efficacy of bacteriophage. **Veterinary Research Communications**, v. 42, n. 3, p. 243–250, 2018.

VLIEGHER, S.; OHNSTAD, I.; PIEPERS, S. Management and prevention of mastitis: a multifactorial approach with a focus on milking, bedding and data-management. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 6, p. 1214–1233, 2018.

ZAATOUT, N.; AYACHI, A.; KECHA, M. *Staphylococcus aureus* persistence properties associated with bovine mastitis and alternative therapeutic modalities. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 5, p. 1102-1119, 2020.

ZAINETTINOVA, D. B. *et al.* The effectiveness of the treatment of cows with mastitis. Scientific messenger of LNU. **Veterinary Medicine and Biotechnologies**, v. 21, n. 94, p. 78–81, 2019.

ZUNIGA, E. *et al.* Expression of genes encoding resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 14, n. 7, p. 772-780, 2020.

Capítulo 12

Arcabouço regulatório da produção de medicamentos de uso veterinário no Brasil



Nayhara Madeira Guimarães¹

Amanda Soares dos Santos²

Andressa Brito Damaceno³

Paula Salve Guizardi⁴

Amanda Azevedo Assis⁵

Lucelena Paulucio⁶

Beatriz Fernandes⁷

Janaína Cecília Oliveira Villanova⁸

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: nayhara.mg2@gmail.com

² Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: amandasoaresds@gmail.com

³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: andressabdamaceno@gmail.com

⁴ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: paulasalve10@gmail.com

⁵ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: amandhaassis@hotmail.com

⁶ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lucelenafeleepaulucio@gmail.com

⁷ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: beatriz.apf.fernandes@gmail.com

⁸ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: pharmacotecnica@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

O mercado de produtos veterinários em geral e, especialmente, de medicamentos, vem apresentando crescimento expressivo nos últimos anos, tanto em função da humanização do atendimento aos animais, como em função do aumento da população de animais para a produção de alimentos (CAPANEMA *et al.*, 2007). A produção e comercialização de produtos farmacêuticos de uso veterinário no Brasil é normatizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no Decreto de Lei nº 467, de 13 de fevereiro de 1969, (BRASIL, 1969). Atualizado pela Lei nº 12.689, de 19 de julho de 2012, nestas legislações, além de definidos os conceitos de produtos de uso veterinário em geral, são normatizadas a produção, o registro, a fiscalização e a comercialização de medicamentos veterinários no território nacional (BRASIL, 2012b). Como definido no Decreto de Lei nº 467 de 13 de fevereiro de 1969, em seu artigo 1º, produto veterinário é:

Toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada cuja administração seja aplicada de forma individual ou coletiva, direta ou misturada com os alimentos, destinada à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais, incluindo os aditivos, suprimentos promotores, melhoradores da produção animal, medicamentos, vacinas, antissépticos, desinfetantes de uso ambiental ou equipamentos, pesticidas e todos os produtos que, utilizados nos animais ou no seu habitat, protejam, restaurem ou modifiquem suas funções orgânicas e fisiológicas, bem como os produtos destinados ao embelezamento dos animais (BRASIL, 1969).

Do ponto de vista sanitário e técnico, é permitida a manufatura ou a manipulação de medicamentos de uso veterinário nas mesmas instalações utilizadas para o preparo de medicamentos de uso humano. No entanto, há limitações para o uso do mesmo espaço e equipamentos para tal, uma vez que produtos contendo ingredientes ativos e/ou excipientes de uso exclusivo em veterinária devem, obrigatoriamente, ser obtidos em instalações segregadas. Neste caso, as empresas serão inspecionadas pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Ainda, todo estabelecimento que manipule produtos de uso veterinário deve obrigatoriamente estar registrado no MAPA, para efeito de licenciamento. Por outro lado, as empresas que optarem por compartilhar suas linhas de produção ficarão sujeitas a inspeções regulares tanto da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), bem como pelo MAPA, devendo cumprir integralmente todos os requisitos de Boas Práticas de Fabricação (BPFs) preconizadas por ambos os órgãos reguladores (BRASIL, 2012a).

Dada a complexidade do tema e a escassez de informações compiladas em um mesmo documento acerca da normatização da fabricação de medicamentos de uso veterinário, o presente capítulo foi proposto.

2 MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO

Medicamento é definido como todo produto tecnicamente elaborado, preparado a partir da mistura de um ou mais ingredientes ativos com um ou mais excipientes, obtidos mediante processo produtivo, que apresenta propriedades preventivas, curativas, paliativas ou profiláticas, bem como para fins de diagnóstico (BRASIL, 1973). Medicamentos podem ser tanto de uso humano quanto animal (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2011). Ao contrário dos medicamentos de uso humano, os medicamentos de uso veterinário são classificados dentro de cinco classes que são: produtos parasiticidas; produtos de origem biológica ou biotecnológica (soros e vacinas); medicamentos para o tratamento de infecções, tais como antimicrobianos e antissépticos; aditivos alimentares; e outros, na qual se incluem todas as demais classes terapêuticas (CAPANEMA *et al.*, 2007).

Entende-se por medicamento industrializado, aquele produzido em grande escala e em grandes quantidades, segundo forma e fórmula farmacêuticas, bem como dosagens padronizadas. Portanto, são passíveis de registro na ANVISA e/ou no MAPA. Enquanto o medicamento manipulado é aquele preparado em pequena escala, sob prescrição de profissional habilitado e mediante retenção da receita. As formulações são personalizadas no que diz respeito à dose, composição e forma farmacêutica. Os primeiros são preparados nas indústrias farmacêuticas enquanto os segundos, nas farmácias magistrais (BRASIL, 2008; CAPANEMA *et al.*, 2007). Ambos visam suprir a demanda por medicamentos para atender à toda a população animal. Cabe ressaltar, como será discutido mais adiante, que não é permitida a administração de medicamentos manipulados em animais de produção (BRASIL, 2014).

Uma vez que os medicamentos veterinários exercem protagonismo tanto no bem estar e na saúde animal, quanto na produtividade dos rebanhos, se faz necessário o estabelecimento de normas reguladoras que garantam a segurança, a eficácia e a qualidade dos produtos farmacêuticos destinados a atender as demandas desta população. Portanto, a contínua disponibilidade de produtos com qualidade, segurança e eficácia terapêutica no mercado é objetivo das contínuas normatizações e atualizações das normas existentes, implementadas pelos órgãos regulatórios (BARRETO, 2013). A seguir, o arcabouço regulatório que rege a

produção de medicamentos pelos setores magistral e industrial é apresentada, de maneira resumida, dando ênfase para as boas práticas de fabricação e manipulação.

3 ARCABOUÇO REGULATÓRIO

O segmento de medicamentos veterinários no país é atendido pelos setores magistral e industrial, ambos importantes para assegurar a saúde dos animais e para a manutenção da saúde pública, representando impacto considerável na economia. Estes setores são capazes de oferecer medicamentos de uso humano e/ou veterinário exclusivo para a população animal. Neste contexto, o MAPA e a ANVISA editam as normas que regulamentam a produção de medicamentos no país (DIAS; MOURA, 2012). A Figura 1 apresenta linha histórica com as principais normas que regulam os setores de produção de medicamentos manipulados e industrializados no país. Na seção seguinte as principais normas acerca dos medicamentos manipulados, industrializados e genéricos são compiladas.

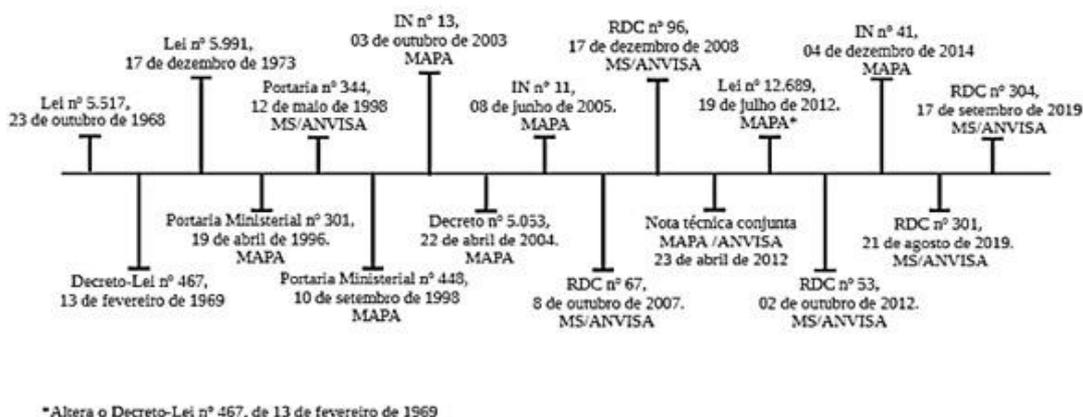


Figura 1 – Legislação abrangente para produção de produtos de uso veterinário.
Fonte: Os autores (Criada com o software gratuito BioRender.com).

3.1 LEGISLAÇÃO PARA O SETOR MAGISTRAL

As farmácias que manipulam medicamentos veterinários são estabelecimentos de saúde cujo principal objetivo é suprir a demanda por produtos personalizados para esta população (DIAS; MOURA, 2012). Medicamento manipulado é aquele preparado em farmácias magistrais pelo profissional farmacêutico, a partir de uma prescrição de profissional habilitado que estabeleça quais os ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs), excipientes, dose, forma farmacêutica, posologia e modo de usar ou, preparado a partir de fórmulas inscritas no Formulário Nacional ou em Formulários Internacionais reconhecidos pela ANVISA (BRASIL,

2010). Preparações magistrais veterinárias devem conter em seus rótulos, entre outros, os dizeres “USO VETERINÁRIO” (BRASIL, 2008). Ao contrário dos medicamentos industrializados, os manipulados não requerem registro na ANVISA ou no MAPA (BRASIL, 2010). No entanto, as farmácias magistrais que manipulam medicamentos de uso veterinário, exclusivos ou não, devem obrigatoriamente possuir registro no MAPA, e a licença deve ser renovada anualmente em um prazo de até sessenta dias antes do seu vencimento (BRASIL, 2005).

São exemplos de vantagens de medicamentos veterinários manipulados: a possibilidade de preparo de medicamentos isentos de excipientes específicos, que podem desencadear reações adversas em certas populações de animais; o preparo de associações de IFAs; o ajuste de dosagens à necessidades terapêuticas de cada animal; a adequação de formas farmacêuticas à determinadas exigências específicas ou populacionais; menor desperdício e menos sobras. Uma vez que pode ser preparada a quantidade adequada ao tratamento; o menor custo para o tratamento a longo prazo, entre outras (CARVALHO, 2014).

No que diz respeito à manipulação de medicamentos veterinários, não é permitido manipular para animais produtores de alimentos, pois, é vedado ao médico veterinário prescrever medicamentos sem registro no órgão competente para estes animais. Tal fato se justifica pela exigência de isenção de vestígios de IFAs que possam comprometer a comercialização dos alimentos e/ou causar danos à saúde do consumidor, gerando impacto também econômico na produção pecuária quando fora dos requerimentos estabelecidos (BRASIL, 2014). O licenciamento de medicamentos veterinários para a população de animais destinados à produção de alimentos é concedido pelas autoridades regulatórias mediante análise criteriosa do dossiê dos produtos registrados, sendo item imprescindível a ser comprovado, o limite máximo de resíduos (LMR) dos IFAs nos alimentos (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009). As farmácias magistrais não possuem infraestrutura suficiente para avaliação do LMR e não é economicamente viável implantar tal rotina, uma vez que as formulações são individualizadas e preparadas em pequenas quantidades (BRASIL, 2005). Neste cenário, é vedada a manipulação de produtos de uso veterinários para todas as espécies animais destinadas à alimentação humana, exceto quando se tratar de preparações homeopáticas produzidas em conformidade com a Farmacopeia Brasileira de Homeopatia (BRASIL, 2014).

Apesar do MAPA regulamentar inúmeras ações da produção de medicamentos de uso veterinário, a responsabilidade acerca do estabelecimento de requerimentos e fiscalização do LMR é atribuição da ANVISA, uma vez que se trata de ato de vigilância sanitária. Das cerca de 240 substâncias farmacologicamente ativas registradas na ANVISA como componentes de

medicamentos veterinários, a RDC nº 53 de 2 de outubro de 2012 prevê o limite máximo de resíduos (LMR) em alimentos de origem animal para somente 24 destas (BRASIL, 2012c). Cabe destacar a proibição do uso de determinados ingredientes ativos na população animal para a produção de alimentos, tais como a nitrofurantoína, furazolidona e cloranfenicol (BRASIL, 1998b).

Como mencionado anteriormente, do ponto de vista sanitário e técnico, é permitida a manipulação de medicamentos de uso veterinário nas mesmas instalações de farmácias magistrais nas quais são manipulados medicamentos de uso humano, desde que os ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) sejam de uso em ambos. No caso de IFAs de uso exclusivo na farmacoterapia veterinária, a farmácia deve possuir instalações segregadas. No primeiro caso, os estabelecimentos serão inspecionados pela ANVISA e pelo MAPA, enquanto no segundo, somente pelo MAPA. Em ambos os tipos de estabelecimento, o responsável técnico é o Farmacêutico e as Boas Práticas de Manipulação preconizadas por ambos os órgãos reguladores deverão ser atendidas (BRASIL, 2007; BRASIL, 2012a). A manipulação de substâncias que são utilizadas tanto na terapêutica em humanos quanto em animais no mesmo ambiente se justifica por existirem estudos científicos consistentes sobre a toxicidade das substâncias em humanos, o que mitigaria o risco associado à possibilidade de contaminação cruzada (BRASIL, 2012a).

A manipulação de medicamentos é normatizada pela RDC nº 67 de 8 de outubro de 2007. A RDC nº 67/2007 regulamenta as Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em Farmácias (BPMF), apresentando as exigências a serem cumpridas, acerca das instalações, equipamentos, pessoal, controle de qualidade, armazenamento, manipulação, fracionamento, dispensação, entre outros aspectos (BRASIL, 2007). Complementarmente à RDC nº 67/2007, a Instrução Normativa (IN) nº 41, de 04 de dezembro de 2014, traz cinco anexos que regulamentam a manipulação de produtos veterinários (BRASIL, 2014):

- I - Anexo - Regulamento técnico para registro e fiscalização de estabelecimentos que manipulam produtos de uso veterinário;
- II - Anexo I - Regulamento de boas práticas de manipulação de produtos veterinários;
- III - Anexo II - Regulamento de boas práticas de manipulação de produtos veterinários estéreis;
- IV - Anexo III - Roteiro de inspeção para estabelecimento que manipula produtos veterinários; e
- V - Anexo IV - Tabela de potências mínimas para manipulação de produtos veterinários homeopáticos (BRASIL, 2014).

O anexo I da referida IN trata das exigências mínimas para o registro e a fiscalização dos estabelecimentos que realizam manipulação, conservação e dispensação de preparações magistrais e oficinais, destinadas ao uso em animais de companhia, esporte, peixes e aves ornamentais. Desse modo, a licença de funcionamento do estabelecimento que manipula produtos destinados ao uso veterinário deve constar, obrigatoriamente, todas as atividades desenvolvidas pelo estabelecimento, sendo esta emitida pela Superintendência Federal de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do estado em que o estabelecimento está localizado. No anexo II, trata das Boas Práticas de Manipulação de Produtos Veterinários (BPMPV), as quais devem ser analisadas na avaliação farmacêutica da prescrição, no processo de manipulação, conservação e dispensação de preparações magistrais e oficinais. De modo que o estabelecimento que manipula produto assegure toda a qualidade microbiológica, química e física de todos os produtos manipulados. E o anexo III lista todos os itens sujeitos à fiscalização (BRASIL, 2005; BRASIL, 2014).

3.2 LEGISLAÇÃO PARA O SETOR INDUSTRIAL

Medicamentos industrializados ou especialidades farmacêuticas são aqueles produzidos por indústrias especializadas, em grande escala, utilizando processos automatizados ou semiautomatizados, que permitem a manufatura de grandes quantidades em cada lote. Estes produtos são padronizados no que diz respeito à forma farmacêutica, dosagem e excipientes que os compõem (CAPANEMA *et al.*, 2007).

A indústria de produtos veterinários é representada pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), o qual descreve que a indústria de saúde animal compreende a pesquisa e desenvolvimento de produtos, produção em grande escala, aperfeiçoamento dos métodos para controle e garantia da qualidade, comercialização e distribuição dos produtos, com o objetivo de colaborar com a prevenção e cura das doenças animais, contribuindo para a produtividade das criações com finalidade econômica e para a saúde dos animais de produção, de companhia, esporte e lazer (CAPANEMA *et al.*, 2007).

O Decreto de Lei nº 467 de 13 de fevereiro de 1969 (BRASIL, 1969), a Portaria Ministerial nº 301 de 19 de abril de 1996 (BRASIL, 1996) e o Decreto nº 5.053 de 22 de abril de 2004 (BRASIL, 2004) são os alicerces da regulamentação das indústrias que produzem medicamentos veterinários no país. Todos os produtos de uso veterinário, nacionais ou importados, incluindo vacinas, devem ser registrados e aprovados pela Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários (CPV), subsidiada ao Departamento de Defesa Animal

(DDA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BARRETO, 2013).

O Decreto nº 5.053 de 22 de abril de 2004 do MAPA aprovou o anexo regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem ou comercializem, oficializando o atendimento às Boas Práticas de Fabricação (BRASIL, 2004). A IN nº 13 de 03 de outubro de 2003 do MAPA, instituiu o regulamento de Boas Práticas de Fabricação de Produtos de Uso Veterinário (BPFV), visando atualizar os critérios de avaliação das condições de fabricação e garantir qualidade dos produtos de uso veterinário, em conformidade com os regulamentos de BPF no âmbito do MERCOSUL (BRASIL, 2003).

A IN 13/2003 regulamenta todas as etapas do processo produtivo, bem como a infraestrutura, pessoal e contém cinco artigos relacionados a política da qualidade. O fabricante deve elaborar produtos veterinários de modo a assegurar que os mesmos sejam adequados para o uso pretendido e estejam de acordo com os requisitos de identidade, pureza e segurança, baseando-se nas políticas da qualidade preestabelecidas, dessa forma, é necessário que as instalações sejam adequadas e que todos os funcionários sejam treinados adequadamente pelo fabricante, para as tarefas e responsabilidades designadas e para as boas práticas de fabricação para minimizar o risco de erros (BRASIL, 2003).

Entre os itens normatizados, se destacam os seguintes: (i) os laboratórios de controle da qualidade devem ser separados das áreas de produção e projetados de forma a se adequarem às operações neles realizadas, da mesma forma, as instalações do biotério também devem ser separadas para diminuir o risco de contaminação. Sendo assim, é necessário que os equipamentos sejam adequados às operações que realizam e devem contar com um procedimento escrito de higiene que deverá abranger o pessoal, as instalações, os equipamentos e aparelhos, os materiais de produção e recipientes e os produtos de limpeza e desinfecção (BRASIL, 2003); (ii) com relação a documentação é necessário um documento padrão que especifique, por exemplo, uma fórmula onde estejam estabelecidos as matérias-primas e os materiais de embalagem (qualidade e quantidade), assim como procedimentos detalhados de produção e controle da qualidade para cada produto, obedecendo uma ordem de produção escrita que contenha informações relevantes da fórmula padrão (BRASIL, 2003); (iii) durante a produção deve-se seguir os procedimentos escritos e registrados que garantem boa conformidade ao produto final e ao final do processamento, os produtos passam por fiscalização em relação ao cumprimento das especificações estabelecidas, aprovados ou reprovados, armazenados, rotulados e dispensados para uso, de acordo com procedimentos escritos. As condições de armazenamento, expedição e distribuição (temperatura, umidade, luminosidade, prazo de validade), devem ser compatíveis com as requeridas pelo produto e coincidir com as

indicadas no rótulo do mesmo (BRASIL, 2003). No caso de reclamações, recolhimento do mercado, devoluções e reprovação dos produtos são registrados e destinados de acordo com a IN nº 13 (BRASIL, 2003); (iv) a função do Controle da Qualidade abrange todas as atividades e decisões que possam afetar a qualidade do produto. As principais atribuições do Controle da Qualidade são aprovar: especificações e métodos de ensaio para matérias-primas e produtos; intermediários, materiais de embalagem e produtos acabados; especificações e metodologias analíticas para os controles em processo; procedimentos de amostragem; procedimentos referentes a medidas sanitárias e de higiene (BRASIL, 2003).

Em 2012, após avaliação técnica conjunta da ANVISA e do MAPA, sobre a necessidade de definir a viabilidade do uso da mesma planta fabril para a fabricação de medicamentos de uso veterinário e uso humano, foi lançada uma IN que regulamentou a atividade, destacando que as empresas que optarem por compartilhar suas linhas de produção deveriam estar sujeitas a inspeções regulares tanto da ANVISA quanto do MAPA, devendo cumprir os requisitos de BPF impostos por ambos (BRASIL, 2012a).

No que diz respeito às regulamentações da ANVISA para a produção industrial de medicamentos, a RDC nº 301 de 21 de agosto de 2019 é a norma vigente. A resolução visa assegurar o rigor tanto no controle de qualidade como na gestão de qualidade, bem como no processo produtivo, a fim de produzir medicamentos com qualidade, eficazes e seguros. Ainda, busca adequar os produtos à qualidade exigida não somente ao mercado nacional bem como para exportação (BRASIL, 2019a).

Segundo a resolução, as boas práticas de fabricação se aplicam a todas as etapas do ciclo de vida do produto, desde a fabricação de medicamentos experimentais, transferência de tecnologia, fabricação comercial até a descontinuação do produto. A RDC nº 301/2019 inclui regras sobre pessoas envolvidas no processo de produção de medicamentos, instalações e equipamentos utilizados, documentação, embalagem e armazenamento, que devem ser treinadas obedecendo as boas práticas de fabricação, entre outros fatores relacionados à operação e logística farmacêutica (BRASIL, 2019a).

O controle da temperatura ao longo de todo o processo de fabricação é um item importante para a qualidade dos medicamentos e está previsto na RDC nº 301 de 2019. Isso porque muitos produtos podem perder suas propriedades e serem inutilizados caso não estiverem no ambiente com as condições ideais (BRASIL, 2019a). Em especial na fase de armazenagem, a RDC destaca a importância de se verificar e monitorar as condições do ambiente para manter a qualidade dos produtos fabricados. No caso de medicamentos termolábeis (sensíveis à variação

de temperatura) esses procedimentos são essenciais para garantir a integridade dos fármacos (BRASIL, 2019a).

A RDC nº 301 de 2019 não traz recomendações sobre qual método de monitoramento de temperatura utilizar. No entanto, a RDC nº 304 de 17 de setembro de 2019, publicada posteriormente e referente às boas práticas de distribuição, armazenagem e transporte de medicamentos, sugere que os ambientes onde se localizam os termolâbeis sejam preferencialmente controlados com sistemas informatizados (BRASIL, 2019b).

3.3 MEDICAMENTO GENÉRICO DE USO VETERINÁRIO

Assim como nas políticas de medicamentos genéricos de uso humano, em 2012 os medicamentos genéricos de uso veterinário foram regulados, conforme a Lei nº 12.689 de 19 de julho de 2012 (BRASIL, 2012b). A norma traz as seguintes definições:

I - Medicamento de referência de uso veterinário: medicamento veterinário inovador registrado no órgão federal competente e comercializado no País, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente nesse órgão, por ocasião do registro;

II - Medicamento similar de uso veterinário: medicamento de uso veterinário que contém o mesmo princípio ativo do medicamento de referência de uso veterinário registrado no órgão federal competente, com a mesma concentração e forma farmacêutica, mas cujos excipientes podem ou não ser idênticos, devendo atender às mesmas especificações das farmacopeias autorizadas e aos padrões de qualidade pertinentes e sempre ser identificado por nome comercial ou marca;

III - Medicamento genérico de uso veterinário: medicamento que contém os mesmos princípios ativos do medicamento de referência de uso veterinário, com a mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, podendo ser com este intercambiável, permitindo-se diferir apenas em características relativas ao tamanho, formato, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos do produto, geralmente produzido após a expiração ou a renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada suas bioequivalência, eficácia e segurança por meio de estudos farmacêuticos, devendo sempre ser designado pela Denominação Comum Brasileira - DCB ou, na sua ausência, pela Denominação Comum Internacional – DCI (BRASIL, 2012b).

Os genéricos são medicamentos que apresentam o mesmo princípio ativo, forma farmacêutica, dosagem e indicação terapêutica, cuja equivalência biológica com o medicamento referência tenha sido confirmada mediante a realização de estudos de bioequivalência. Dessa forma, os medicamentos genéricos possuem a mesma qualidade, eficácia e segurança, sendo intercambiáveis. Ainda, o medicamento genérico tem preço consideravelmente inferior ao do medicamento de referência. O menor preço se deve, principalmente, pela ausência de marketing associada aos genéricos, uma vez que os genéricos

não possuem marca fantasia e são prescritos pelas DCB e DCI. A identificação dos medicamentos genéricos é dada com a presença de uma faixa amarela com o “G” de genérico em destaque e a identificação “Medicamento Genérico” na embalagem (BRASIL, 2010).

3.4 OUTRAS NORMATIVAS DE INTERESSE QUE REGULAM A PRODUÇÃO E O USO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

A Lei de nº 5.517, de 23 de outubro de 1968 é responsável por regulamentar a profissão do Médico Veterinário e criação dos conselhos Federal e Regionais de Medicina Veterinária. Segundo os artigos 2º e 3º, apenas os que cursarem bacharelado em Medicina Veterinária em escolas reconhecidas pelo Ministério da Educação ou graduados em escolas estrangeiras com diplomas validados nacionalmente e que apresentarem registro profissional pelos Conselhos Federal ou Regionais de Medicina Veterinária poderão exercer a profissão no território nacional (BRASIL, 1968).

Os artigos 5º e 6º afirmam que são atribuições exclusivas do médico veterinário funções como prática clínica e cirúrgica; assistência, planejamento, direção técnica e execução da defesa sanitária animal, bem como dos estabelecimentos, indústrias e eventos que contenham animais ou produtos de origem animal; peritagens e perícias; estudo e aplicações de medidas de controle de zoonoses, entre outros (BRASIL, 1968).

No ano de 1969 foi estabelecido sobre a fiscalização dos produtos de uso veterinário, bem como dos estabelecimentos responsáveis por sua produção, por meio do Decreto de Lei nº 467, de 13 de fevereiro de 1969. Tal Decreto de Lei estabelece, em seus artigos 1º e 2º, que toda indústria, comércio e emprego dos produtos de uso veterinário deverão ser fiscalizados, em todo o âmbito do território nacional, incluindo aqueles que fracionem, comerciem, armazenem ou manipulem tais produtos nacionais ou importados. Além disso, esse Decreto-Lei cria, organiza e dá atribuições à Comissão de Biofarmácia Veterinária, subordinada ao Departamento de Defesa e Inspeção Agropecuária (BRASIL, 1969). Foi firmado que a licença para funcionamento do estabelecimento deveria ser renovada anualmente e a licença para comercialização dos produtos nacionais é válida por dez anos. A licença para comercialização de produtos importados apresentava um período máximo de três anos de validade, sendo que esses produtos deveriam ser integralmente produzidos no Brasil dentro do prazo máximo de três anos, exceto para aqueles produtos comprovadamente impossibilitados de serem produzidos nacionalmente (BRASIL, 1969). Entretanto, a Lei 12.689/2012 prorroga a validade

de licença para a comercialização de produtos importados para o período de dez anos (BRASIL, 2012b).

A responsabilidade técnica dos estabelecimentos responsáveis pela produção ou fracionamento dos produtos de uso veterinário é restrita a médicos veterinários, farmacêuticos ou químicos, acordando com o produto manuseado pelos estabelecimentos (BRASIL, 1969).

A Lei nº 5.991, de 17 de dezembro de 1973 é responsável pelo controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos nas unidades que integram o serviço público civil e militar da administração direta e indireta, da União, dos Estados, do Distrito Federal, dos Territórios e dos Municípios e demais entidades paraestatais, no que diz respeito aos conceitos, definições e responsabilidade técnica (BRASIL, 1973).

Em seu artigo 4º define o conceito de droga, medicamento, insumo farmacêutico, correlato, farmácia, drogaria, entre outros. Os artigos 5º e 6º mostram que o comércio de drogas, medicamentos e de insumos farmacêuticos é privativo das empresas e dos estabelecimentos definidos nesta Lei, sendo esses, farmácia, drogaria, posto de medicamento e unidade volante e dispensário de medicamentos. Em hoteleiros e similares é permitido a disposição de medicamentos que não dependam de receita médica para uso exclusivo a seus usuários (BRASIL, 1973).

Nos artigos 15º e 18º fica estabelecido que a farmácia e a drogaria têm, obrigatoriamente, a assistência de técnico responsável, inscrito no Conselho Regional de Farmácia, na forma da lei e é facultativo manter serviço de atendimento ao público para aplicação de injeções a cargo de técnico habilitado, observada a prescrição médica, respectivamente. No parágrafo 2º do artigo 18º ainda estabelece que a farmácia pode manter laboratório de análises clínicas, desde que em dependência distinta e separada, e sob a responsabilidade técnica do farmacêutico bioquímico (BRASIL, 1973).

Outro ponto importante é apresentado no artigo 38º, em que os rótulos das farmácias magistrais devem conter: nome e endereço do estabelecimento; número da licença sanitária; nome do responsável técnico e seu número no conselho; nome do medicamento como na receita; número de registro do medicamento (lote interno); nome do paciente e do profissional prescritor. Nos casos em que há necessidade de descrições, essas devem conter: Uso interno, Uso externo, agite antes de usar, Uso veterinário e Veneno (BRASIL, 1973). O artigo 8º ressalta a importância de obedecer aos padrões de qualidade visando a segurança dos produtos (BRASIL, 1973).

Além de medicamentos de uso exclusivo em veterinária, o médico veterinário pode prescrever medicamentos de uso humano controlados pela Portaria nº 344 de 12 de maio de

1998, para a aplicabilidade veterinária, como entorpecentes e psicotrópicos. O receituário controlado deverá informar dados do animal como o nome, a raça, a espécie e porte, além dos dados do seu tutor, como nome e endereço completo (BRASIL, 1998a).

A fiscalização dos produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos fica sob responsabilidade do Serviço de Defesa Sanitária Animal, que pertence ao Departamento de Defesa e Inspeção Agropecuária do Ministério da Agricultura. O Artigo 6º indica que quaisquer infrações referentes à regulamentação podem ser penalizadas de acordo com a gravidade ou reincidência, através de advertências, multas de uma a três vezes o valor do maior salário vigente nacionalmente e duplicar em reincidências, ou até mesmo cancelamento do registro do produto e cassação do registro do estabelecimento. Entretanto, este artigo foi vetado pela Lei Ordinária nº 12.689/2012 (BRASIL, 2012b).

A Lei declara critérios para o registro, aquisição, prescrição, fabricação, distribuição e dispersão dos medicamentos genéricos de uso veterinário. O artigo 3º afirma que o estabelecimento que deseja registrar os medicamentos genéricos de uso veterinário deverá comprovar bioequivalência em relação ao medicamento de referência, equivalência terapêutica, resíduos e período de carência equivalentes, quando uso destinado a animais de consumo humano. O MAPA é responsável pela realização de análise fiscal objetivando confirmação da bioequivalência, por meio da amostragem dos medicamentos genéricos de uso veterinário nas indústrias e o comércio (BRASIL, 2012b).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O medicamento é uma entre as inúmeras ferramentas disponíveis para assegurar a manutenção do bem-estar e da sanidade animal. Os medicamentos são desenvolvidos com a finalidade de prevenir, tratar ou curar as doenças e melhorar a qualidade de vida dos animais. De maneira mais ampla, no que diz respeito aos animais destinados à produção de alimentos, os medicamentos podem contribuir para a economia do país, pois, contribuem para o aumento da produtividade de alimentos. No âmbito das diversas populações animais, podem ser utilizados medicamentos industrializados ou manipulados e, em ambos os casos, normas rigorosas que assegurem as boas práticas de fabricação e ou manipulação, respectivamente, devem ser seguidas. Sabendo-se que conforme a população veterinária podem ser utilizados medicamentos de uso humano e de uso exclusivo veterinário, ANVISA e MAPA são responsáveis pelas regulamentações de ambos os setores. Os órgãos vêm aprimorando seus regulamentos relativos às boas práticas de fabricação e manipulação, inclusive, editando

normas conjuntas, cabendo aos profissionais médicos e farmacêuticos envolvidos com o preparo dos medicamentos, implementá-las nos diferentes estabelecimentos. Pelo exposto, é de grande importância que estes profissionais tenham acesso a tais regulamentos de forma contextualizada, a fim de entender e explorar as diferentes normas corretamente.

5 REFERÊNCIAS

BARRETO, W. D. **Processo de desenvolvimento de fármacos veterinários**. 2013. 48 f. Monografia. (Graduação em Engenharia Bioquímica) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **O que devemos saber sobre medicamentos?** São Paulo: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2010. 97p.

_____. Decreto-lei nº 467, de 13 de fevereiro de 1969. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 fev. 1969. Seção 1, p. 1465.

_____. Lei nº 5.517, de 23 de outubro de 1968. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 25 out. 1968. Seção 1, p. 940.

_____. Lei nº 5.991, de 17 de dezembro de 1973. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 19 de dez. 1973. Seção 1, p. 13049.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 de abr. 2004. Seção 1, p. 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 11 de 08 de junho de 2005. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 de jun. 2005. Seção 1, p. 27.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 13 de 03 de outubro de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 06 de out. 2003. Seção 1, p. 2.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 41, de 04 de dezembro de 2014. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 05 dez. 2014. Seção 1, p. 3.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Lei nº 12.689, de 19 de julho de 2012. Altera o Decreto-Lei nº 467, de 13 de fevereiro de 1969. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 de jul. 2012b. Seção 1, p. 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria Ministerial nº 301, de 19 de abril de 1996. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 25 de abr. 1996. Seção 1, p. 7013.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria Ministerial n.º 448, de 10 de setembro de 1998. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 de set. 1998b. Seção 1, p. 5.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria n.º 344, de 12 de maio de 1998. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 15 de mai. 1998a. Seção 1, p. 3.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC n.º 53 de 2 de outubro de 2012. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 3 de out. 2012c. Seção 1, p. 47

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC n.º 67 de 8 de outubro de 2007. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 09 out. 2007. Seção 1, p. 29.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n.º 96, de 17 de dezembro de 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, 18 de dez. 2008. Seção 1, p. 102.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução-RDC n.º 301 de 21 de agosto de 2019. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 22 de agost. 2019a. Seção 1, p. 64.

_____. Ministério da Saúde. Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução-RDC n.º 304 de 17 de setembro de 2019. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 de set. 2019b. Seção 1, p. 64.

_____. **Nota técnica conjunta DFIP/SDA/MAPA - GGIMP/ANVISA/MS**. Apresenta a necessidade de instalações segregadas para fabricação de medicamentos para uso veterinário e para uso humano. Brasília, 23 de abr. de 2012a. p. 1.

CAPANEMA, L. X. L. *et al.* Panorama da indústria farmacêutica veterinária. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p.157-174, 2007.

CARVALHO, B. M. M. **A veterinária, os medicamentos e a formação dos profissionais de farmácia**. 2014. 64 f. Dissertação (Mestrado em Aconselhamento e Informação em Farmácia) - Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto, Porto, 2014.

DIAS, M. C.; MOURA, R. C. R. **Manipulação de produtos veterinários: aplicabilidade, legislação e atuação dos profissionais da saúde**. 2012. 24 f. Monografia (Especialização) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2012.

SPINOSA, H. de S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M., **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2011. 824p.

SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W. de; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da

vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 14, n. 6, p. 2091-2106, 2009.

Capítulo 13

Potencial de nanoemulsões contendo óleos essenciais para o controle alternativo de dermatoses fúngicas em animais domésticos



Caroline de Souza Fontes¹
Natália Assis Guedes²
Bianca de Oliveira Botelho³
Isabella Vilhena Freire Martins⁴
Adilson Vidal Costa⁵
Lucas de Souza Soares⁶
Vagner Tebaldi de Queiroz⁷

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: caroline.fontes@edu.ufes.com

² Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: natalia.guedes@edu.ufes.br

³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: biancabotelho93@hotmail.com

⁴ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: isabella.martins@ufes.br

⁵ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: avcosta@hotmail.com

⁶ Universidade Federal da Grande Dourados, e-mail: lucassoares@ufgd.edu.br

⁷ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: vagner.queiroz@ufes.br

1 INTRODUÇÃO

Doenças causadas por fungos patogênicos em animais e humanos, quando não tratadas adequadamente podem se tornar um problema de saúde pública. Esporos fúngicos veiculados pelo ar, solo e animais contribuem para a ocorrência de doenças em mais de 300 milhões de pessoas no mundo a cada ano (RODRIGUES; NOSANCHUK, 2020). Os fungos são microorganismos oportunistas que causam dermatoses em animais, após a penetração acidental pelas barreiras cutâneas intactas ou quando os hospedeiros possuem problemas de imunidade e/ou outras condições debilitantes (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2018). Em animais, existem mais de 30 espécies de dermatófitos que são considerados os principais agentes etiológicos de micoses superficiais, sendo *Microsporum canis* a espécie mais isolada de infecções em cães e gatos, seguida por *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Outras espécies de dermatófitos comumente isoladas de infecções em cães, gatos e outros animais (cavalos, roedores e ruminantes, por exemplo) são *Trichophyton equinum*, *Trichophyton erinacei*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton verrucosum* (BOND, 2010).

M. canis e *Sporothrix brasiliensis* são fungos zoonóticos causadores de dermatoses comuns em práticas de clínica veterinária, de forma que a sua disseminação intermitente tem forte impacto na saúde pública (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2018). A esporotricose é uma infecção aguda ou crônica, limitada a lesões localizadas com nódulos eritematosos e úlceras distribuídos em um padrão, causada por *Sporothrix schenckii* (CHAKRABARTI *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2014). Embora lesões semelhantes tenham sido descritas em humanos e outros animais (além de cães e gatos), lesões cutâneas em gatos veiculam a maior concentração de células de levedura, tornando esses animais a principal fonte zoonótica de infecção e transmissão de esporotricose para os seres humanos (POESTER *et al.*, 2018).

A infecção ocasionada por *Malassezia pachydermatis*, levedura saprofítica e lipofílica, também apresenta grande relevância para a área da saúde animal (NARDONI *et al.*, 2015). *M. pachydermatis* é frequentemente encontrada nos canais auditivos e pele de cães, gatos e outros animais domésticos e selvagens. Em condições favoráveis de desenvolvimento, a multiplicação excessiva deste organismo irá ocorrer e o mesmo passará a atuar como um patógeno secundário oportunista. Os cães podem, ainda, apresentar otites causadas por *Malassezia* spp., podendo ser observada como dermatite localizada ou generalizada (BOND *et al.*, 2020).

Agentes antifúngicos usados para o tratamento dessas infecções em humanos também são usados em animais, como, por exemplo, os polienos (anfotericina B e nistatina), os azóis (imidazóis e triazóis), as alilaminas (terbinafina) e as equinocandinas (SEYEDMOUSAVI *et*

al., 2018). Contudo, a ação desses antifúngicos tem se mostrado não eficiente em alguns casos, mesmo quando usados em altas concentrações, seja pela dificuldade na administração do produto ou aderência à lesão, podendo ainda causar efeitos adversos graves, devido à alta toxicidade (GUPTA; VERSTEEG; SHEAR, 2017). Além disso, a resistência dos fungos aos compostos tradicionalmente utilizados tem aumentado, nos últimos anos, tornando-se necessária a busca por novos agentes que sejam eficazes e apresentem baixa toxicidade nas concentrações de uso (EBANI *et al.*, 2020b).

Nesse sentido, a utilização de óleos essenciais (OEs) pode consistir em uma alternativa para o desenvolvimento de formulações potencialmente antifúngicas, visando o tratamento de infecções causadas por esses micro-organismos. OEs são constituídos por uma mistura complexa de compostos voláteis e apresentam, entre outras, propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas e inseticidas. Ao contrário dos compostos sintéticos, os OEs possuem amplo espectro antifúngico, mecanismos de ação variados e efeitos colaterais menos intensos. Entretanto, ainda existem poucos estudos *in vivo* avaliando o potencial de formulações contendo os OEs ou seus compostos químicos majoritários no controle alternativo de doenças fúngicas em animais (HU *et al.*, 2017; PAZ *et al.*, 2018).

Algumas propriedades físico-químicas dos OEs, entre elas, a baixa dispersibilidade em água e a alta volatilidade, limitam o preparo de formulações para a sua utilização clínica. Assim, tecnologias adequadas para superar tais problemas devem ser empregadas, a fim de possibilitar o uso de OE ou de seus compostos químicos majoritários na preparação de produtos para o uso veterinário. O preparo de nanoemulsões é uma alternativa estratégica para a dispersão de compostos hidrofóbicos em meio aquoso, que pode viabilizar a produção de formulações contendo diferentes componentes, incluindo OEs, na produção de produtos dermatológicos, fármacos, alimentos, defensivos agrícolas, entre outros (NUNES *et al.*, 2018). Dessa forma, o objetivo deste capítulo é apresentar o potencial dos OEs para o controle de infecções fúngicas em animais, bem como o preparo de nanoemulsões como uma alternativa tecnológica para a veiculação desses compostos e para o desenvolvimento de formulações de uso veterinário.

2 ÓLEOS ESSENCIAIS

A constituição química dos óleos essenciais (OEs) é variada e apresenta uma mistura complexa de compostos como éteres, fenóis, álcoois, terpenos, sendo a maioria deles constituídos de terpenóides e fenilpropanóides (Figura 1). Os terpenóides são derivados de unidades de isopreno (C_5H_8) que foram originadas a partir de moléculas de acetil-CoA (Rota

do mevalonato) ou oriundos de unidades de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (Rota do metileritritol fosfato). Os fenilpropanóides são constituídos por um anel aromático unido a uma cadeia de três carbonos e derivados, biossinteticamente, do ácido chiquímico (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A atividade antifúngica dos OEs tem sido documentada sobre ampla variedade de fungos (ALAM *et al.*, 2017; DJORDJEVIC *et al.*, 2013; RAO *et al.*, 2010). Os OEs e seus componentes químicos atuam em nível de membrana e citoplasma, onde alteram completamente a morfologia e função celular (NAZZARO *et al.*, 2013; NAZZARO *et al.*, 2017). Em virtude dessas propriedades, os OEs ou seus componentes majoritários tem sido utilizados nas indústrias farmacêutica, química, de cosméticos e de alimentos para o desenvolvimento de produtos (PEDRO *et al.*, 2013; VIGAN, 2010). Carvacrol, timol, linalol e eugenol (Figura 1) apresentam-se como compostos majoritários em diferentes OEs e o modo de ação destes compostos como agente antifúngico será discutido a seguir.

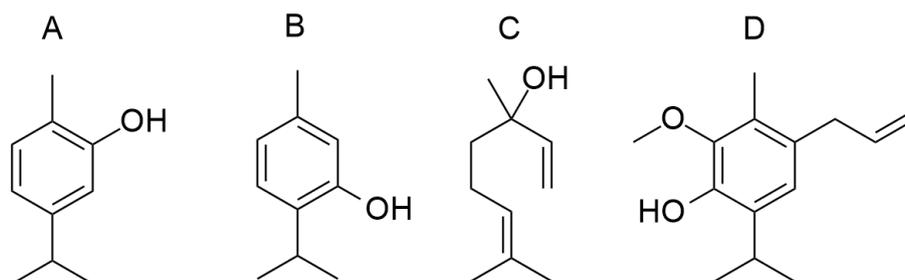


Figura 1 – Fórmula estrutural dos terpenóides carvacrol (A), timol (B) e linalol (C) e do fenilpropanóide eugenol (D).

Fonte: Os autores.

2.1 MECANISMOS DE AÇÃO ANTIFÚNGICO

A parede celular dos fungos pode ser considerada como o principal alvo para agentes antifúngicos tóxicos, visto que desempenha papel importante no crescimento e viabilidade de fungos (NAZZARO *et al.*, 2017). Na parede celular fúngica, os elementos estruturais glicano, quitina e manana são geralmente considerados alvos terapêuticos. A quitina, um homopolímero não ramificado constituído por ligações β -(1 \rightarrow 4) N-acetilglicosamina, é indispensável para a constituição da parede celular e, portanto, para a sobrevivência dos fungos. A inibição da polimerização da quitina pode afetar a maturação da parede celular, a formação do septo e do anel de gemas inibindo o crescimento celular (WU *et al.*, 2008).

A atividade antifúngica dos OEs pode estar relacionada com as propriedades dos terpenóides, que devido à sua natureza altamente lipofílica e baixa massa molar são capazes de modificar a estrutura da membrana da célula, causando a lise celular ou inibição da esporulação e a germinação de fungos (NAZZARO *et al.*, 2017). A atividade antimicrobiana da maioria dos terpenóides está relacionada a seus grupos funcionais, principalmente, os que possuem hidroxila e a presença de elétrons deslocalizados (NAZZARO *et al.*, 2013). Alguns mecanismos de ação para compostos majoritários de óleos essenciais (terpenóides e fenilpropanóides) sobre diferentes espécies de fungos são resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Modos de ação de carvacrol, timol, linalol e eugenol sobre diferentes fungos

Compostos majoritários de OEs	Mecanismo de ação	Referência
Carvacrol	Efeito na membrana/parede celular Alteração no crescimento celular e morfologia	Kong <i>et al.</i> (2012)
	Inibição da bomba de efluxo	Ahmad; Klan; Manzoor (2013)
	Produção de espécies reativas de oxigênio anti-óxido nítrico	Kohanski <i>et al.</i> (2007)
	Efeito sinérgico com antifúngicos azóis	Dorman e Deans (2000)
Timol	Efeito na membrana/parede celular e morfologia Alteração no crescimento celular	Ahmad; Klan; Manzoor (2013)
	Inibição da bomba de efluxo	Kong <i>et al.</i> (2012)
	Produção de espécies reativas de oxigênio anti-óxido nítrico	Kohanski <i>et al.</i> (2007)
	Efeito sinérgico com antifúngicos azóis	Dorman e Deans (2000)
Linalol	Efeito na membrana/parede celular	Haque <i>et al.</i> (2016)
	Inibição do desenvolvimento do biofilme	Zore <i>et al.</i> (2011)
Eugenol	Efeito na membrana/parede celular	Belenky e Collins (2011)
	Inibição do desenvolvimento do biofilme	Martinez e Fries (2010)

Fonte: Adaptado de Nazzaro *et al.* (2017).

O carvacrol interage com a região hidrofóbica das cadeias de ácidos graxos, resultando em mudanças conformacionais da bicamada fosfolipídica, uma vez que ocupa mais do que a quantidade normal de espaço entre as cadeias. Assim, uma perturbação das interações de van der Waals entre as cadeias lipídicas lineares presentes na membrana celular do fungo causa a

fluidização dos lipídios. Com o aumento na fluidez ocorre o extravasamento de prótons e íons de potássio, levando à diminuição do gradiente de pH através da membrana citoplasmática. O colapso do potencial de membrana é seguido pela inibição da síntese de ATP e, conseqüentemente, a lise celular (ULTEE *et al.*, 2002). O efeito antifúngico sinérgico do carvacrol e do timol com o fluconazol, um antimicótico azólico, foi relatado em *Candida albicans*. Estes compostos inibiram (70-90%) a superexpressão dos genes da bomba de efluxo CDR1 e MDR1, demonstrando o seu potencial para bloquear as bombas transportadoras de drogas (AHMAD; KLAN; MANZOOR, 2013).

A manutenção da integridade da estrutura e função da membrana plasmática das células fúngicas é essencial para a sobrevivência desses micro-organismos. Logo, toda alteração ou modificação importante, que envolva a síntese ou manutenção da membrana celular, pode resultar em danos e, conseqüentemente, causar a morte do fungo (TRINDADE *et al.*, 2015).

2.2 ATIVIDADE CONTRA ESPÉCIES DOS GÊNEROS *Malassezia* spp., *Sporothrix* spp., *Microsporum* spp. e *Trichophyton* spp.

A ação dos OEs no controle de fungos de interesse de diferentes áreas é relatada por trabalhos científicos e, inclusive, alguns mecanismos de ação de compostos majoritários presentes nesses metabólitos foram estudados. Contudo, a utilização de OEs em produtos comerciais para o controle de fungos zoonóticos e/ou de infecções de pele de animais não é de uso corrente, estando limitada a poucos relatos na literatura (AIEMSAARD *et al.*, 2020; BISMARCK *et al.*, 2020; DEBBABI *et al.*, 2020; EBANI; MANCIANTI, 2020).

Na Tabela 2 são apresentados estudos descrevendo o controle *in vitro* e *in vivo* de fungos dos gêneros *Malassezia* spp., *Sporothrix* spp., *Microsporum* spp. e *Trichophyton* spp. ou tratamento de lesões pelo uso de OEs e ingredientes ativos.

Tabela 2 - Estudos *in vitro* e *in vivo* de óleos essenciais (OEs) e ingredientes ativos sobre fungos causadores de dermatose em animais (continua).

Infecção/Fungo	Óleo essencial (OE)/Composto ativo	Resultado	Referência
Otite/ <i>Malassezia pachydermatis</i>	<i>Satureja montana aetheroleum</i>	Inibição total ^{1,2}	Bismarck <i>et al.</i> (2020)
	<i>Cymbopogon citrati aetheroleum</i>		
	<i>Oleum geranii</i>		
	<i>Origani aetheroleum</i>		
	<i>Cymbopogon martinii aetheroleum</i>		
	<i>Cymbopogon nardus aetheroleum</i>		
	<i>Thymi aetheroleum c.t. thymol</i>		
Otite/ <i>M. pachydermatis</i>	<i>Cinnamomi aetheroleum</i>	Moderadamente sensível ^{1,2}	Bismarck <i>et al.</i> (2020)
	<i>Caryophylli aetheroleum</i>		
	<i>Leptospermum scoparium aetheroleum</i>		
	<i>Coriandri aetheroleum</i>		
Dermatite/ <i>M. pachydermatis</i>	<i>Thymi aetheroleum c.t. linalool</i>	CMI (mg/mL) ³	Ebani <i>et al.</i> (2020a)
	<i>Aloysia triphylla</i>		
	<i>Satureja montana</i>		
Dermatofitose/ <i>Microsporium canis</i>	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	CMI (%) ³	Najar <i>et al.</i> (2020)
	<i>Helichrysum cooperi</i>		
	<i>Helichrysum edwardsii</i>		
Dermatofitose/ <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Helichrysum pandanifolium</i>	CMI (%) ³	Najar <i>et al.</i> (2020)
	<i>H. cooperi</i>		
	<i>H. edwardsii</i>		
Dermatofitose/ <i>M. canis</i> <i>M. gypseum</i> <i>T. mentagrophytes</i>	<i>H. pandanifolium</i>	CMI (mg/mL) ³	Elaissi <i>et al.</i> (2020)
	<i>Thymus numidicus</i>		
	<i>Thymus numidicus</i>		
Dermatite/ <i>Microsporium gypseum</i>	<i>Thymus numidicus</i>	CMI (mg/mL) ³	Debbabi <i>et al.</i> (2020)
	<i>C. nepeta subsp. nepeta</i>		
	<i>C. nepeta subsp. glandulosum</i>		

Tabela 2 - Estudos *in vitro* e *in vivo* de óleos essenciais (OEs) e ingredientes ativos sobre fungos causadores de dermatose em animais (continua).

Infecção/Fungo	Óleo essencial (OE)/Composto ativo	Resultado	Referência
Dermatite/ <i>T. mentagrophytes</i>	<i>C. nepeta</i> subsp. <i>nepeta</i>	CMI (mg/mL) ³ 0,20	Debbabi <i>et al.</i> (2020)
	<i>C. nepeta</i> subsp. <i>glandulosum</i>	0,04-0,40	
Dermatite/ <i>M. canis</i>	<i>Clinopodium nepeta</i> subsp. <i>nepeta</i>	CMI (mg/mL) ³ 0,40	Debbabi <i>et al.</i> (2020)
	<i>Clinopodium nepeta</i> subsp. <i>glandulosum</i>	0,40	
Dermatite/ <i>M. pachydermatis</i>	<i>Syzygium aromaticum</i> L. Merr. & L.M.Perry	Eliminação de leveduras ⁴	Aiemsraad <i>et al.</i> (2020)
Dermatofitose/ <i>M. gypseum</i>	Linalol	CMI (µL/mL) ⁵ 0,50	Jain e Sharma (2020)
	Citral	0,10	
	Geraniol	0,03	
	Citronelol	0,05	
Dermatofitose/ <i>M. canis</i>	Linalol	CMI (µL/mL) ⁵ 0,40	Jain e Sharma (2020)
	Citral	0,10	
	Geraniol	0,05	
	Citronelol	0,05	
Otite/ <i>M. pachydermatis</i>	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Redução da infecção igual a de nistatina ⁶	Neves <i>et al.</i> (2018)
Esporotricose/ <i>Sporothrix brasiliensis</i>	<i>Origanum majorana</i> L.	Ausência/baixa contaminação em animais; Redução da carga fúngica em órgãos sistêmicos ⁷	Waller <i>et al.</i> (2019)
Dermatofitose/ <i>M. canis</i>	<i>Eugenia caryophyllus</i> Eugenol	CMI (µg/mL) ³ 62,50-125,00 62,50	Pinto, Sandoval e Vargas (2019)
Dermatofitose/ <i>M. gypseum</i>	<i>E. caryophyllus</i> Eugenol	CMI (µg/mL) ³ 125,00 125,00-250,00	Pinto, Sandoval e Vargas (2019)

Tabela 2 - Estudos *in vitro* e *in vivo* de óleos essenciais (OEs) e ingredientes ativos sobre fungos causadores de dermatose em animais (conclusão).

Infecção/Fungo	Óleo essencial (OE)/Composto ativo	Resultado	Referência
Dermatite/ <i>M. pachydermatis</i>	<i>Cinnamomum aromaticum</i> ; <i>Syzygium aromaticum</i> ; <i>Origanum vulgare</i>	Inibição total (100 %) ¹	Váczi <i>et al.</i> (2018)
Dermatite/ <i>Malassezia nana</i>	<i>Thymus kotschyana</i>	CMI 90 ($\mu\text{g/mL}$) ³ 30,00	Khosravi, Shokri e Fahimirad (2016)
Dermatite/ <i>Malassezia sympodia</i> <i>Malassezia furfur</i>	<i>Zataria multiflora</i> <i>T. kotschyana</i>	CMI 90 ($\mu\text{g/mL}$) ³ 35,00	Khosravi, Shokri e Fahimirad (2016)
Esporotricose/ <i>S. brasiliensis</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. <i>O. vulgare</i> L. <i>O. majorana</i> L.	CMI 90 (mg/mL) ³ 1,12 0,07 0,56	Waller <i>et al.</i> (2016)
Dermatofitose/ <i>M. canis</i>	<i>Thymus serpyllum</i> ; <i>O. vulgare</i> ; <i>Litsea cubeba</i>	CMI (mg/L) ³ 0,03	Nardoni <i>et al.</i> (2015)
Dermatofitose <i>M. gypseum</i>	<i>T. serpyllum</i> <i>O. vulgare</i> <i>L. cubeba</i>	CMI (mg/L) ³ 0,25 0,03 0,25	Nardoni <i>et al.</i> (2015)
Otite/ <i>M. pachydermatis</i>	<i>Ocimum basilicum</i> <i>O. vulgare</i> <i>T. serpyllum</i>	CMI (%) ³ 0,80	Pistelli <i>et al.</i> (2012)
Dermatofitose <i>M. gypseum</i>	Eugenol Nerolidol	CMI (%) ³ 0,01-0,03 0,50-2,00	Lee <i>et al.</i> (2007)

Fonte: Adaptado de Ebani; Mancianti (2020). CMI = Concentração mínima inibitória; ¹ Análise *in vitro* de OE pelo método de disco difusão; ² Análise *in vitro* por ensaio de vapor; ³ Avaliação *in vitro* da CMI pelo método de microdiluição; ⁴ Avaliação *in vitro* por *time-kill test*; ⁵ Avaliação *in vitro* da CMI pelo método de diluição em caldo; ⁶ Avaliação *in vivo* por uso tópico; ⁷ Avaliação *in vivo* por via oral.

Pela Tabela 2, a potencialidade dos OEs no controle desses micro-organismos foi reconhecida nos estudos, sendo que, em alguns casos, o desempenho do tratamento usando OEs mostrou-se equivalente ou até superior ao resultado apresentado por fármacos comerciais, o que evidencia o potencial para que tais produtos naturais sejam usados para o desenvolvimento de novos medicamentos destinados ao tratamento de infecções fúngicas. De fato, a realização de maior número de estudos *in vivo* propondo a aplicação de OEs contra fungos de interesse veterinário pode estimular o desenvolvimento de tratamentos alternativos para a remediação de lesões em animais. Contudo, características intrínsecas de OEs, como, por exemplo, a alta volatilidade, fotodegradação, baixa dispersibilidade em água e oxidação por metais ou oxigênio, podem dificultar a sua administração nas condições de uso veterinário (BANUMATHI *et al.*, 2017; EBANI; MANCIANTI, 2020).

A adição de OEs em formulações para uso terapêutico deve ser pensada, a fim de diminuir a perda de seus compostos ativos, o que poderia reduzir sensivelmente a sua eficiência. Assim, a produção de emulsões e nanoemulsões pode ser vista como uma alternativa para a veiculação de OEs em produtos destinados ao tratamento de lesões fúngicas, pois pode melhorar a dispersibilidade desse material em meio aquoso. Além disso, as nanoemulsões podem modular a liberação dos compostos, melhorando a atividade biológica dos mesmos (PRAKASH *et al.*, 2018).

3 EMULSÕES E NANOEMULSÕES

Emulsões são sistemas coloidais formados por dois ou mais líquidos imiscíveis, estando um desses líquidos finamente disperso no outro na forma de gotículas. As emulsões podem ser classificadas de acordo com a organização dos líquidos imiscíveis ou fases. As emulsões mais comuns são do tipo óleo em água (O/A; a fase oleosa se encontra distribuída na forma de gotículas dispersas dentro de uma fase aquosa) ou do tipo água em óleo (A/O; a fase aquosa se encontra dispersa na forma de gotículas dispersas dentro de uma fase oleosa). Além dessas, existem as emulsões múltiplas que são do tipo óleo em água em óleo (O/A/O) ou água em óleo em água (A/O/A) (MCCLEMENTS, 2012).

Emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, o que pode ser explicado em termos de energia livre de formação (BRÖSEL; SCHUBERT, 1999; PAL, 2011) (Eq. 1).

$$\Delta G = \gamma \cdot \Delta A \quad (1)$$

Na Eq. 1, ΔG é a variação da energia livre de Gibbs envolvida no aumento da área interfacial durante o processo de emulsificação; γ é a tensão interfacial (para os líquidos imiscíveis); e ΔA

é a variação da área interfacial (que aumenta) durante o processo de emulsificação (ATKINS; JONES, 2011).

Pela Eq. 1, como no processo de emulsificação existe aumento explícito na área interfacial do sistema, por consequente, ocorre aumento na variação da energia livre de Gibbs associada ao sistema, durante a produção das emulsões. Portanto, como $\Delta G > 0$, a emulsificação das fases pode ser vista como um processo não espontâneo e, por essa razão, as emulsões tendem à separação de fases, a fim de reduzir a variação da energia livre de Gibbs do sistema. Assim, objetivando a redução da área interfacial, diferentes mecanismos de desestabilização podem ocorrer nesses sistemas, podendo a ação desses eventos ser retardada, a fim de se produzir emulsões cineticamente estáveis. Dentre as estratégias usadas para o aumento da estabilidade cinética desses sistemas, a seleção do tipo e concentração de surfactantes é apontada como fundamental para a diminuição da tensão interfacial entre as fases (o que é fundamental durante a formação das gotículas). Podendo, ainda, conferir uma redução da desestabilização por meio de mecanismos de repulsão eletrostática e/ou estérica entre as gotículas dispersas (BRÖSEL; SCHUBERT, 1999; PAL, 2011).

3.1 MECANISMOS DE DESESTABILIZAÇÃO

Diferentes mecanismos de desestabilização podem ocorrer nas emulsões, a fim de reduzir a área interfacial e, conseqüentemente, o contato energeticamente desfavorável entre as fases. A separação gravitacional pode ser descrita como o mecanismo de desestabilização menos complexo de um sistema emulsionado e, dependendo da densidade relativa das fases, pode se desenvolver na forma de cremação ou sedimentação. A cremação é o movimento ascendente das gotículas, quando essas possuem densidade menor que a do líquido circundante, enquanto a sedimentação é o movimento descensional das gotículas, quando possuem densidade superior à do líquido que as envolve. Em ambos, a agregação das gotículas não envolve a perda da sua integridade interfacial, ou seja, as gotículas tendem a se agregar, sem que ocorra comprometimento do filme interfacial que as envolve e, dessa forma, uma agitação do sistema pode levar à sua redispersão na fase contínua. Assim como na separação gravitacional, no mecanismo conhecido como floculação as gotículas se agregam e não se fundem, permanecendo os agregados dispersos na fase contínua do sistema (MCCLEMENTS; RAO, 2011).

A maturação de Ostwald (ou destilação isotérmica) é um mecanismo de desestabilização caracterizado pela difusão mássica de gotículas menores para gotículas maiores, de forma que

um aumento do diâmetro médio e uma redução da polidispersidade das gotículas pode ser visto, em função do tempo (NAZARZADEH; ANTHONYPILLAI; SAJJADI, 2013).

As gotículas dispersas na fase contínua estão em constante e aleatório movimento (movimento browniano), o que pode promover colisões e choques que, dependendo da intensidade e da frequência, podem levar ao rompimento do filme interfacial, causando a sua fusão, gerando uma nova com um diâmetro maior, sendo esse mecanismo de desestabilização denominado coalescência (MCCLEMENTS; RAO, 2011). O aumento progressivo do diâmetro das gotículas, pela ação de um ou mais mecanismos de desestabilização, leva a condição conhecida como “separação de fases”. A separação de fases é o evento mais drástico e irreversível da desestabilização do sistema, sendo caracterizado pela completa desemulsificação e segregação das fases que compunham, anteriormente, a emulsão (LLS, 2011; SALAGER, 1988).

3.2 SURFACTANTES E COSURFACTANTES

Emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, tendendo à separação de fases, podendo ser cineticamente estáveis, o que favorece a preparação de produtos para diversas áreas tecnológicas contendo ingredientes emulsionados em sua formulação. A adição de surfactantes reduz a tensão interfacial entre as fases imiscíveis, possibilitando a produção de emulsões, além de influenciar diretamente no diâmetro das gotículas formadas. Surfactantes são moléculas que apresentam pelo menos uma região predominantemente hidrofílica (polar) e outra predominantemente hidrofóbica (apolar), que lhes conferem o seu característico caráter anfifílico (DALTIM, 2011; TADROS, 2005).

Os surfactantes podem ser classificados de acordo com a carga eletrostática de grupos funcionais presentes em suas estruturas. Quando carregado negativamente, o surfactante é classificado como aniônico como, por exemplo, a lecitina e mono ou diésteres de ácidos graxos e glicerol. Quando carregados positivamente, o surfactante é classificado como catiônico. Quando não possuem carga eletrostática, os surfactantes são classificados como não iônicos ou neutros como, por exemplo, os surfactantes comercialmente chamados de Tween e Span (DALTIM, 2011; TADROS, 2005). Em adição, existem surfactantes zwitteriônicos, que possuem dois ou mais grupos contendo cargas opostas, podendo apresentar carga negativa ou positiva dependendo do pH da solução (HOELLER; SPERGER; VALENTA, 2009; MCCLEMENTS; RAO, 2011).

O índice conhecido como HLB (sigla derivada de *Hydrophilic-Lipophilic Balance*) é calculado em função dos grupos polares e apolares presentes nas moléculas dos surfactantes (GRIFFIN, 1949) (Eq. 2).

$$HLB = 7 + \sum (n^{\circ} \text{ de grupos hidrofílicos}) - \sum (n^{\circ} \text{ de grupos lipofílicos}) \quad (2)$$

Griffin (1949) determinou que os valores de HLB devem variar entre 0 e 20. A classificação dos surfactantes por HLB permite a previsão do seu comportamento e reduz a quantidade de trabalho para selecioná-lo (GRIFFIN, 1949). Contudo, o HLB deve ser usado apenas como indicativo para a seleção de surfactantes de baixa massa molar. Surfactantes com baixos valores de HLB são classificados como lipofílicos, enquanto aqueles contendo altos valores como hidrofílicos. O monooleato de sorbitano ($C_{24}H_{44}O_6$) comercialmente conhecido como Span 80 é um surfactante lipofílico (HLB 4,3) com massa molar de 428,62 g/mol (NIST, 2021). O monolaurato de polioxietilenosorbitano ($C_{58}H_{114}O_{26}$) ou Tween 20 (HLB 16,7; massa molar = 1.225 g/mol) e o monooleato de polioxietilenosorbitano ($C_{64}H_{124}O_{26}$) ou Tween 80 (HLB 15; massa molar = 1.310 g/mol) são exemplos de surfactantes hidrofílicos (NIST, 2021).

Outro ponto a ser enfatizado é que dois surfactantes distintos, que apresentem características químicas diferentes, podem apresentar o mesmo valor de HLB (DAVIS, 1994; GRIFFIN, 1949). Alguns métodos e formulações requerem a utilização de cossurfactantes para melhorar a formação das emulsões ou nanoemulsões. Os cossurfactantes são moléculas anfifílicas, geralmente uma cadeia de hidrocarbonetos ligada a um grupo polar, podendo ser uma hidroxila (MCCLEMENTS; RAO, 2011). Dentre os cossurfactantes, os mais utilizados são os alcoóis de cadeia curta ou média. Os cossurfactantes em conjunto com os surfactantes atuam reduzindo, para um valor ainda menor, a tensão interfacial entre as fases (FLANAGAN; SINGH, 2006).

3.3 PREPARO POR MÉTODOS DE ALTA ENERGIA

Métodos que proporcionam a entrada de altas taxas de energia no sistema são comumente utilizados na produção de emulsões e nanoemulsões. Os dispositivos industrialmente utilizados nos métodos de alta energia são os homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores, equipamentos “rotor-stator” e homogeneizadores ultrassônicos (LEE; MCCLEMENTS, 2010; LEONG *et al.*, 2009; MCCLEMENTS, 2012).

O homogeneizador ultrassônico é um aparelho que utiliza ondas ultrassônicas de alta intensidade para fragmentar e reduzir o diâmetro de gotículas (ABISMAÏL *et al.*, 1999; POVEY; MCCLEMENTS, 1992). Ondas propagadas em meio líquido durante a homogeneização causam a compressão do líquido em ciclos de baixa pressão (rarefação). Durante a rarefação, as ondas ultrassônicas de alta intensidade criam pequenas bolhas de vácuo. Essas bolhas aumentam o diâmetro e, quando atingem um determinado volume, se colapsam ocasionando o fenômeno denominado cavitação (LEONG *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2017). O colapso dessas bolhas gera uma força intensa que leva à homogeneização das fases, pela ruptura de uma delas na forma de gotículas (LEONG *et al.*, 2009; MCCLEMENTS; RAO, 2011). A utilização de homogeneizadores ultrassônicos para a produção emulsões em escala laboratorial ou industrial é realizada por diferentes áreas tecnológicas. Por exemplo, Abd-Elsalam e Khokhlov (2015) produziram nanoemulsão de eugenol e Tween 20 utilizando homogeneização ultrassônica (10 min e 700 W). Nesse estudo, observaram-se gotículas com diâmetro hidrodinâmico entre 50 a 120 nm, que se mantiveram estáveis por um mês, o que demonstrou a aplicabilidade dessa abordagem para a produção de nanoemulsões.

3.4 POTENCIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

O desenvolvimento de formulações contendo gotículas de OEs com diâmetro nanométrico pode contribuir para minimizar a sua volatilidade, fotodegradação e oxidação de seus compostos majoritários, assim como melhorar a sua dispersibilidade e atividade biológica, assegurando a liberação controlada dos compostos quimicamente ativos (ANTON; VANDAMME, 2011).

Danielli *et al.* (2013) avaliaram a atividade antifúngica do OE de *Stenachaenium megapotamicum* na forma pura e nanoemulsionada. Os autores prepararam a nanoemulsão usando método de baixa energia e obtiveram diâmetro hidrodinâmico médio de gotículas próximo a 210 nm. O teste antifúngico foi realizado em isolados clínicos de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Scytalidium dimidiatum*. Os resultados desse estudo demonstraram que a produção de nanoemulsões melhorou os efeitos biológicos do OE de *S. megapotamicum*, pela redução significativa da concentração mínima inibitória para os micro-organismos citados, quando comparada com o desempenho do OE em sua forma não emulsionada.

Krishnamoorthy *et al.* (2021) avaliaram o efeito antifúngico de nanoemulsão contendo OE de *Cleome viscosa* Linn contra sete isolados de *Candida albicans* presentes em alimentos. As nanoemulsões foram produzidas pelo método de alta energia (homogeneizador ultrassônico) e Triton X-100 (surfactante). Os estudos foram realizados *in vitro* e os valores da concentração mínima inibitória (CMI) e fungicida variaram de 16,5 a 33 $\mu\text{L}/\text{mL}$, sendo mais eficiente que a nistatina, fungicida comercial (controle). Também foi observado que a nanoemulsão atuou de forma eficiente contra a formação de biofilme de *C. albicans* patogênica. A maior redução na formação de biofilme foi observada com 70% do efeito fungitóxico, sendo mais efetivo que o controle.

A contaminação por micotoxinas de fungos do gênero *Fusarium* spp. na cevada destinada para produção de malte é uma grande preocupação para a indústria de bebidas. Wan *et al.* (2020) produziram nanoemulsões de OE de cravo e observaram seu efeito *in vitro* contra o fungo. A nanoemulsão foi produzida pelo método de alta energia utilizando 5 % (m/m) de OE e 1 % (m/m) de Tween 80 (surfactante). Os efeitos de mitigação nos níveis de micotoxinas, biomassa fúngica e os resíduos de sabor de óleo de cravo em maltes foram medidos. Os autores observaram que a nanoemulsão contendo 1,5 mg/g de OE teve influência desprezível na energia germinativa da cevada, ao mesmo tempo que reduziu de forma eficiente os níveis de micotoxinas e da biomassa fúngica toxicogênica. O tratamento utilizado foi eficiente no combate ao fungo e apresentou baixo impacto sobre o sabor do malte processado.

Em função do exposto, a emulsificação de OEs ou seus ingredientes ativos torna-se atrativa para o desenvolvimento de formulações com potencial atividade contra fungos causadores de dermatoses em animais.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Infecções fúngicas, humanas e animais, são comuns em todo o mundo e dermatoses causadas por fungos em animais domésticos têm sido cada vez mais comuns na prática clínica veterinária. Atualmente, o tratamento para essas doenças pode não ser totalmente satisfatório em função da resistência de alguns agentes etiológicos às drogas convencionais, o que impacta diretamente na efetividade, toxicidade e alto custo de alguns tratamentos.

A atividade biológica de óleos essenciais (OEs) tem sido descrita sobre bactérias, fungos e parasitos, porém a sua baixa dispersibilidade em água ainda é uma limitação para o emprego desses produtos naturais para fins terapêuticos. Por outro lado, estudos relacionados com o desenvolvimento de formulações contendo fases nanoemulsionadas têm sido propostos para

melhorar a dispersibilidade, avaliar o carreamento, a liberação controlada e a atividade antifúngica de OEs. Apesar de representar uma tecnologia atrativa, vale salientar que estudos futuros, usando modelos animais ou cultura de células, são necessários para a compreensão da eficiência e elucidação de mecanismos de ação das nanoemulsões contendo OEs contra fungos *in vivo*.

4 REFERÊNCIAS

ABD-ELSALAM, K. A.; KHOKHLOV, A. R. Eugenol oil nanoemulsion: antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and phytotoxicity on cottonseeds. **Applied Nanoscience**, v. 5, n. 2, p. 255-265, 2015.

ABISMAÏL, B. *et al.* Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 6, n. 1-2, p. 75-83, 1999.

AHMAD, A.; KLAN, A.; MANZOOR, N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1-2, p. 80-86, 2013.

AIEMSAARD, J. *et al.* Antimicrobial activity of formulated clove essential oil spray against biofilm-forming *Malassezia pachydermatis* and *Staphylococcus pseudintermedius* clinical isolates. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 50, n. 2, p. 185-191, 2020.

ALAM, S. B. *et al.* Essential oils as biocides for the control of fungal infection and devastating pest (*Tuta absoluta*) of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. 7, p. 1-9, 2017.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 5, p. 978-985, 2011.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. 5. ed. PORTO ALEGRE: Bookman, 2011.

BANUMATHI, B. *et al.* Exploitation of chemical, herbal and nanoformulated acaricides to control the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*— A review. **Veterinary parasitology**, v. 244, n. 1, p. 102-110, 2017.

BELENKY, P.; COLLINS, J. J. Antioxidant strategies to tolerate antibiotics. **Science**, v. 334, n. 6058, p. 915-916, 2011.

BISMARCK, D. *et al.* Antifungal *in vitro* activity of essential oils against clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from canine ears: a report from a practice laboratory. **Complementary Medicine Research**, v. 27, n. 3, p. 143-154, 2020.

BOND, R. *et al.* Biology, diagnosis and treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs and cats: clinical consensus guidelines of the world association for veterinary dermatology. **Veterinary Dermatology**, v. 31, n. 1, p. 73-77, 2020.

- BOND, R. Superficial veterinary mycoses. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 226-236, 2010.
- BRÖSEL, S.; SCHUBERT, H. Investigations on the role of surfactants in mechanical emulsification using a high-pressure homogenizer with an orifice valve. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 38, n. 4-6, p. 533-540, 1999.
- CHAKRABARTI, A. *et al.* Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 3-14, 2015.
- DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2011. 330p.
- DANIELLI, L. J. *et al.* Antidermatophytic activity of volatile oil and nanoemulsion of *Stenachaenium megapotamicum* (Spreng.) Baker. **Industrial Crops and Products**, v. 50, n. 10, p. 23-28, 2013.
- DAVIS, H. T. Factors determining emulsion type: hydrophile-lipophile balance and beyond. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 91, n. 11, p. 9-24, 1994.
- DEBBABI, H. *et al.* Chemical composition, antifungal and insecticidal activities of the essential oils from Tunisian *Clinopodium nepeta* subsp. *nepeta* and *Clinopodium nepeta* subsp. *glandulosum*. **Molecules**, v. 25, n. 2137, p. 1-12, 2020.
- DJORDJEVIC, M. *et al.* Alternative approach in control of tomato pathogen by using essential oils *in vitro*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 45, n. 3, p. 1069-1072, 2013.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.
- EBANI, V. V. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus* and *Malassezia* strains isolated from canine dermatitis. **Microorganisms**, v. 8, n. 252, p. 1-16, 2020a.
- EBANI, V. V. *et al.* Editorial: plant derived products to combat bacterial, fungal and parasitic pathogens. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. 570613, p. 1-3, 2020b.
- EBANI, V. V.; MANCIANTI, F. Use of essential oils in veterinary medicine to combat bacterial and fungal infections. **Veterinary Sciences**, v. 7, n. 193, p. 1-35, 2020.
- ELAISSI, A. *et al.* Chemical composition, antifungal and antiproliferative activities of essential oils from *Thymus numidicus* L. **Natural Product Research**, v. 4, n. 8, p. 1-6, 2020.
- FLANAGAN, J.; SINGH, H. Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 221-237, 2006.
- GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by "HLB". **Journal of Cosmetic Science**, v. 1, n. 5, p. 311-326, 1949.

GUPTA, A. K.; VERSTEEG, S. G.; SHEAR, N. H. Onychomycosis in the 21st century: an update on diagnosis, epidemiology, and treatment. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 21, n. 6, p. 525-539, 2017.

HAQUE, E. *et al.* Terpenoids with antifungal activity trigger mitochondrial dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 85, n. 4, p. 436-443, 2016.

HOELLER, S.; SPERGER, A.; VALENTA, C. Lecithin based nanoemulsions: a comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, n. 1-2, p. 181-186, 2009.

HU, Y. *et al.* Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**, v. 220, n. 4, p. 1-8, 2017.

JAIN, N.; SHARMA, M. Inhibitory effect of some selected essential oil terpenes on fungi causing superficial infection in human beings. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 23, n. 4, p. 862-869, 2020.

KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; FAHIMIRAD, S. Efficacy of medicinal essential oils against pathogenic *Malassezia* sp. isolates. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, n. 1, p. 28-34, 2016.

KOHANSKI, M. A. *et al.* A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 797-810, 2007.

KONG, W. *et al.* Nitric oxide alleviates heat stress-induced oxidative damage in *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 1, p. 15-20, 2012.

KRISHNAMOORTHY, R. *et al.* Antifungal activity of nanoemulsion from *Cleome viscosa* essential oil against food-borne pathogenic *Candida albicans*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 286-293, 2021.

LEE, S. *et al.* Antifungal effect of eugenol and nerolidol against *Microsporum gypseum* in a guinea pig model. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 1, p. 184-188, 2007.

LEE, S. J.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 6-7, p. 560-569, 2010.

LEONG, T. S. H. *et al.* Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 6, p. 721-727, 2009.

LLS (LUBRIZOL LIFE SCIENCE). **Emulsion stability and testing**. 2011. Disponível em: <<https://lubrizolcdmo.com/technical-briefs/emulsion-stability-and-testing/>>. Acesso em: 03 jul. 2021.

MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 4, p. 266-275, 2010.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011.

NAJAR, B. *et al.* Volatilome analyses and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oils from five south African helichrysum species. **Molecules**, v. 25, n. 3196, p. 1-17, 2020.

NARDONI, S. *et al.* *In vitro* activity of twenty commercially available, plant-derive essential oils against selected dermatophyte species. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 8, p. 1473-1478, 2015.

NAZARZADEH, E.; ANTHONYPILLAI, T.; SAJJADI, S. On the growth mechanisms of nanoemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 397, n. 5, p. 154-162, 2013.

NAZZARO, F. *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

NAZZARO, F. *et al.* Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 86, p. 1-20, 2017.

NEVES, R. C. S. M. *et al.* *In vitro* and *in vivo* efficacy of tea tree essential oil for bacterial and yeast ear infections in dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 1597-1607, 2018.

NIST (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY). **NIST Livro de Química na Web, SDR 69**. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/>>. Acesso em: 01 jul. 2021.

NUNES A. P. *et al.* *Poiretia latifolia* essential oil as a promising antifungal and anti-inflammatory agent: chemical composition, biological screening, and development of a nanoemulsion formulation. **Industrial Crops and Products**, v. 126, n. 11 p. 280-286, 2018.

PAL, R. Influence of interfacial rheology on the viscosity of concentrated emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 356, n. 1, p. 118-122, 2011.

PAZ, C. *et al.* Assessment of insecticidal responses of extracts and compounds of *Drimys winteri*, *Lobelia tupa*, *Viola portalesia* and *Vestia foetida* against the granary weevil *Sitophilus granarius*. **Industrial Crops and Products**, v. 122, n. 10, p. 232-238, 2018.

PEDRO, A. S. *et al.* The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. In: MÉNDEZ-VILAS, A. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. Badajoz: Formatex, 2013. p. 1364-1374.

PINTO, S. M. L.; SANDOVAL, L. V. L.; VARGAS, L. Y. *In vitro* susceptibility of *Microsporium* spp. and mammalian cells to *Eugenia caryophyllus* essential oil, eugenol and semisynthetic derivatives. **Mycoses**, v. 62, n. 1, p. 41-50, 2019.

PISTELLI, L. *et al.* Antimycotic activity of some aromatic plants essential oils against canine isolates of *Malassezia pachydermatis*: an *in vitro* assay. **The Open Mycology Journal**, v. 6, p. 17-21, 2012.

POESTER, V. R. *et al.* Sporotrichosis in southern Brazil, towards an epidemic? **Zoonoses and Public Health**, v. 65, n. 7, p. 815-821, 2018.

POVEY, M. J. W.; MCCLEMENTS, D. J. **Developments in acoustics and ultrasonics**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1992. 264p.

PRAKASH, A. *et al.* Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review. **Food Research International**, v. 111, n. 5, p. 509-523, 2018.

RAO, A. *et al.* Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5062–5069, 2010.

RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D. Fungal diseases neglected pathogens: a wake-up call to public health officials. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 2, p. 1-9, 2020.

SALAGER, J. Phase transformation and emulsion inversion on the basis of catastrophe theory. In: BECHER, P. **Encyclopedia of emulsion technology**. New York: Marcel Dekker, 1988. p. 79-134.

SEYEDMOUSAVI, S. *et al.* Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. **Medical Mycology**, v. 56, n. 4, p. 165-187, 2018.

SINGH, Y. *et al.* Nanoemulsion: concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, n. 4, p. 28-49, 2017.

TADROS, T. F. **Applied surfactants: principles and applications**. 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. 654p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

TRINDADE, L. A. *et al.* Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover-screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. **Clinical Oral Investigations**, v. 19, n. 9, p. 2223-2231, 2015.

ULTEE, A. *et al.* The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561–1568, 2002.

VÁCZI, P. *et al.* Antifungal effect of selected essential oils on *Malassezia pachydermatis* growth. **Folia Veterinaria**, v. 62, n. 2, p. 67-72, 2018.

VIGAN, M. Essential oils: renewal of interest and toxicity. **European Journal of Dermatology**, v. 20, n. 6, p. 685-692, 2010.

WALLER, S. B. *et al.* *In vitro* susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to essential oils of Lamiaceae family. **Mycopathologia**, v. 181, n. 11-12, p. 857-863, 2016.

WALLER, S. B. *et al.* *In vivo* protection of the marjoram (*Origanum majorana* Linn.) essential oil in the cutaneous sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. **Natural Product Research**, v. 35, n. 17, p. 2977-2981, 2021.

WAN, J. *et al.* Clove oil-in-water nanoemulsion: mitigates growth of *Fusarium graminearum* and trichothecene mycotoxin production during the malting of *Fusarium* infected barley. **Food Chemistry**, v. 312, n. 126120, p. 1-7, 2020.

WU, X. *et al.* Effect of pligiochin E, an antifungal macrocyclic bis (bibenzyl), on cell wall chitin synthesis in *Candida albicans*. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, n. 12, p. 1478–1485, 2008.

ZHOU, X. *et al.* Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Fungal Diversity**, v. 66, n. 1, p. 153-165, 2014.

ZORE, G. B. *et al.* Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**, v. 18, n. 13, p. 1181-1190, 2011.

Capítulo 14

Produtos naturais com atividade anti-biofilme para tratamento de doenças infecciosas de importância veterinária



Kássia Vidal Menezes¹

Mikaela Vieira Beloni²

Winner Duque Rodrigues³

Nicolly Soares Ferreira⁴

Mariana Drummond Costa Ignachiti⁵

Juliana Alves Resende⁶

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: kassiavidal@hotmail.com

² Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mikaelabeloni@hotmail.com

³ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, e-mail: winner.duque@gmail.com

⁴ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: ni.colly_ferreira@hotmail.com

⁵ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mariana.ignacchiti@ufes.br

⁶ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: juliana.resende@ufes.br

1 INTRODUÇÃO

Antibióticos são usados largamente na medicina humana e animal, como terapêutico e profilático de infecções bacterianas. Ainda, na criação de animais, doses subterapêuticas podem ser utilizadas como promotores de crescimento (KUMAR; PATYAL; PANDA, 2018). A resistência aos antibióticos é um problema complexo e multifatorial, no entanto acredita-se que o consumo inadequado de antibióticos seja o principal impulsionador (COSTELLOE *et al.*, 2010).

O desenvolvimento ou aquisição de genes de resistência antimicrobiana é uma ameaça global para a saúde humana, animal e ambiental que podem tornar as bactérias resistentes a agentes antimicrobianos e aumentar a incidência de falhas terapêuticas (McEWEN; COLLIGNON, 2018). O Sistema de Vigilância Antimicrobiana Global da Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou uma ocorrência generalizada de bactérias multirresistentes entre 2.164.568 pessoas com suspeita de infecções bacterianas em 66 países, no ano de 2018 (URUÉN *et al.*, 2021). Em todo mundo, a resistência a antimicrobianos causa aproximadamente 700.000 mortes anuais. E na ausência de intervenções, estima-se que até 2050, 10 milhões de mortes serão causadas por bactérias resistentes. Particularmente preocupante é o fato de que o desenvolvimento de novos antimicrobianos está muito atrás da velocidade de surgimento e disseminação das bactérias resistentes (BRASIL, 2018).

Além dos mecanismos genéticos bem conhecidos por trás do fenômeno da resistência, como mutações e transferência horizontal de genes, as bactérias são capazes de exibir outras estratégias para resistir a exposição a antimicrobianos, uma das quais é a capacidade de produzir biofilmes (SCHWARZ; LOEFFLER; KADLEC, 2017).

Os biofilmes são associações altamente estruturadas de diferentes microrganismos que estão incorporados em uma matriz extracelular de polissacarídeos, e aderidos a uma superfície. Para formar um biofilme, as bactérias precisam sincronizar sua expressão gênica e algumas usam sistemas de detecção de quórum (*quorum sense* - QS). O QS desempenha papel crítico na comunicação célula-célula e regula a densidade celular e comportamentos coletivos (RABIN *et al.*, 2015). Esta estrutura confere benefícios aos membros desta comunidade microbiana, como maior resistência ao sistema imunológico do hospedeiro e sobrevivência na presença de altas concentrações de drogas antimicrobianas. Essa resistência aos antibióticos é alcançada por uma variedade de mecanismos, como resultado de mudanças genéticas e metabólicas nas células dentro do biofilme e características estruturais que influenciam a permeabilidade da droga.

Desta maneira, o biofilme é reconhecido como um reservatório de genes de resistência (HUGHES; WEBBER, 2017; LEBEAUX; GHIGO; BELOIN, 2014; URUÉN *et al.*, 2021).

Os biofilmes estão envolvidos em uma ampla gama de infecções agudas e crônicas. Em ruminantes, as principais complicações decorrentes da formação de biofilme estão relacionadas a infecções epidérmicas e inflamações no tecido intestinal, como a mastite, otite, abscessos hepáticos, enterites e endometrites (ABDULLAHI *et al.*, 2016).

A dose terapêutica utilizada pela farmacoterapia tradicional em bactérias planctônicas não são adequadas para tratar os biofilmes, uma vez que a concentração de antibióticos necessária para erradicar bactérias com este fenótipo pode ser cerca de 100 a 1000 vezes maior (LOCK, 2015). Assim, novas estratégias além dos antibióticos devem ser desenvolvidas para combater infecções bacterianas e a formação de biofilme.

Nas últimas décadas, novas abordagens na prevenção da formação de biofilme foram amplamente desenvolvidas e relatadas, incluindo produtos naturais a partir de plantas. Uma variedade de espécies vegetais, bem como os mecanismos subjacentes na função anti-biofilme foram identificados (SONG *et al.*, 2018). Desta forma, esses agentes anti-biofilme naturais são candidatos promissores que podem fornecer novas estratégias para combater bactérias multirresistentes e tratamento de infecções associadas ao biofilme (LU *et al.*, 2019).

Compreender os mecanismos que esses agentes infecciosos utilizam para sobreviver aos antibióticos ajuda a desenvolver novas estratégias antimicrobianas. Neste sentido, esta revisão tem como objetivo descrever brevemente os mecanismos de formação de biofilme e detecção de quórum (QS), as principais infecções associadas ao biofilme em ruminantes, bem como os avanços recentes na descoberta e identificação de espécies vegetais como agentes anti-biofilme.

2 DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA BACTERIANA

A formação de biofilme é um processo dinâmico que ocorre em uma série de etapas sequenciais. É iniciado pela interação da bactéria com uma superfície biótica ou abiótica. A exposição de células planctônicas a condições ambientais adversas, como, antibióticos, estresse nutricional, podem iniciar a expressão gênica e ativar a formação de biofilme (URUÉN *et al.*, 2021). As bactérias planctônicas têm crescimento celular e taxa de reprodução relativamente alta, no entanto, o estado do biofilme coincide com o estado natural e predominante das bactérias, no qual restringe a mobilidade bacteriana e aumenta a densidade celular, fornecendo um ambiente ideal para sobrevivência (JAMAL *et al.*, 2018).

O biofilme pode consistir em uma única espécie microbiana ou a combinação de diferentes espécies de bactérias, protozoários, arqueias, algas, fungos filamentosos e leveduras, que se ligam fortemente uns aos outros, apresentando nível de organização muito mais elevado do que as células isoladas (FLEMMING; WUERTZ, 2019; MUHAMMAD *et al.*, 2020). Esse processo requer a coordenação de todas as células individuais da população e para orquestrar comportamentos coletivos, utilizam o QS. O QS é mediado pela produção, liberação, acumulação e detecção em todo o grupo de moléculas sinalizadoras extracelulares chamadas autoindutores e permite que grupos de bactérias alterem o comportamento de maneira síncrona em resposta às mudanças na densidade populacional e na composição de espécies da comunidade bacteriana vizinha (MUKHERJEE; BASSLER, 2019).

A formação de biofilme (Figura 1) envolve três estágios sequenciais. O primeiro estágio compreende a fixação reversível da bactéria com superfícies. A aderência microbiana pode ser mediada por interações adesão-receptor e as forças físicas associadas à adesão bacteriana, incluem ligações covalentes, interações de Van Der Waals, interações eletrostáticas e interações ácido-base (ROY *et al.*, 2018). Esse processo é mediado por fibras que se projetam da superfície da célula bacteriana, como flagelos, lipopolissacarídeo (LPS), fímbrias ou *pili*, e interagem com o substrato formando uma associação dinâmica e reversível, no qual alguns microrganismos se desprendem e retornam ao estado planctônico se interrompidos por forças mecânicas, ou em resposta à disponibilidade de nutrientes (SONG *et al.*, 2018; URUÉN *et al.*, 2021). Após a fixação em uma superfície, o processo adesivo é seguido por maturação imediata, com secreção da matriz extracelular (MEC) e proliferação celular para montagem das microcolônias. Finaliza-se com a diferenciação do biofilme em uma estrutura madura (ROY *et al.*, 2018).

A MEC consiste em um conglomerado de diferentes substâncias que, juntas, constrói o espaço intercelular das comunidades microbianas e forma a estrutura do biofilme. A estrutura da matriz do biofilme pode variar dependendo das espécies bacterianas, e em geral, pode ser composto de água, polissacarídeos, proteínas, lipídeos, surfactantes, glicolipídeos, DNA extracelular (eDNA), RNA extracelular, vesículas de membrana e íons como Ca^{2+} (URUÉN *et al.*, 2021). Em muitas bactérias, substância polissacarídica extracelular (EPS) e eDNA são componentes proeminentes da MEC, que estabelece as condições ideais para a comunicação interbacteriana, através do QS, e troca de material genético, o que é relevante para a dispersão de genes de resistência a antibióticos, que pode ser até 1000 vezes maior comparado com bactérias planctônicas (ROY *et al.*, 2018; SONG *et al.*, 2018; URUÉN *et al.*, 2021).

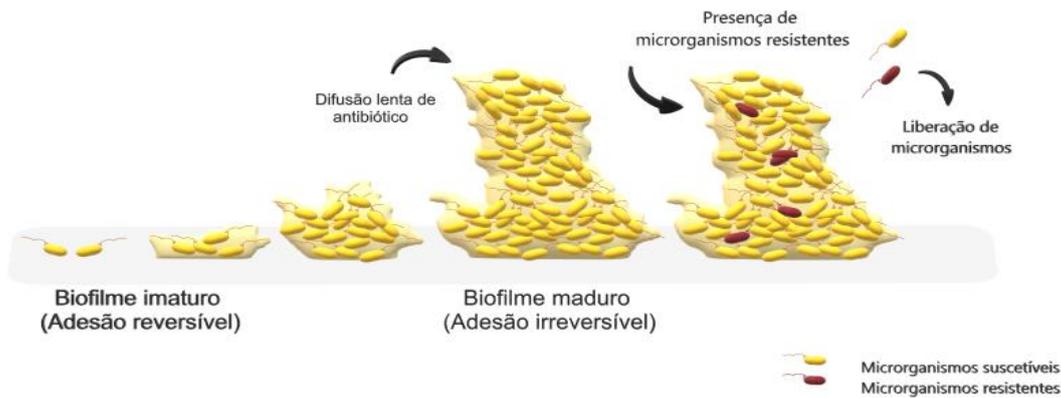


Figura 1 – Desenho esquemático representando as fases de formação do biofilme bacteriano. Fonte: Os autores.

Uma vez que as bactérias começam a secretar a EPS, o segundo estágio de desenvolvimento do biofilme entra em processo. A secreção de EPS é contínua até o terceiro estágio de formação, garantindo a fixação segura e irreversível das bactérias à superfície dentro de uma camada densamente complexa, biofilme maduro. Após a formação de biofilme maduro, duas características podem ser fortemente correlacionadas: o aumento da produção de EPS e o desenvolvimento de resistência a antibióticos (ROY *et al.*, 2018).

Muitas bactérias podem alternar entre a forma planctônica e de biofilme. Após o desenvolvimento completo do biofilme, a forma de liberação dos microrganismos pode ser dividida em tipos ativos e passivos. A dispersão celular ativa é iniciada pelos próprios microrganismos, enquanto o desprendimento passivo é mediado por forças externas por meio de processos mecânicos (MUHAMMAD *et al.*, 2020; ROY *et al.*, 2018; SONG *et al.*, 2018).

Uma bactéria é definida como clinicamente resistente a um agente antimicrobiano quando o antibiótico, na dosagem terapêutica recomendada, não é capaz de inibir efetivamente o crescimento da bactéria ou de matá-la. A resistência aos antimicrobianos envolve mecanismos que evitam a ligação do antibiótico ao seu alvo, como alteração enzimática, mudanças na permeabilidade de membrana, efluxo da droga, entre outros e pode acontecer por mutação ou transferência horizontal de genes. Em contraste, a tolerância a antimicrobianos é a capacidade das células de sobreviver ao efeito de um antimicrobiano devido a um estado fenotípico reversível, de maneira que a droga, na dosagem terapêutica recomendada demora mais tempo para inibir efetivamente o microrganismo (OLSEN, 2015; SCHWARZ; LOEFFLER; KADLEC, 2017; SHARMA; MISBA; KHAN, 2019). Ao contrário da resistência, a tolerância é apenas temporária e após maiores períodos de exposição, a droga elimina a bactéria (URUÉN *et al.*, 2021). Em biofilmes, a tolerância antimicrobiana é um estado natural e está relacionada a estrutura do biofilme (OLSEN, 2015).

Para reconhecer que os biofilmes empregam uma mistura complexa de mecanismos de tolerância e resistência, muitos autores usam o termo recalcitrância para se referir à suscetibilidade reduzida das células do biofilme aos antibióticos. A recalcitrância aos antibióticos é alcançada em biofilmes por meio de uma variedade de mecanismos de resistência e tolerância, tais como: (i) matriz hidratada autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que limita a difusão de antibióticos; (ii) baixa atividade metabólica; (iii) taxa de crescimento lenta; (iv) acúmulo de enzimas, íons metálicos e um baixo pH que inativam as moléculas dos antibióticos; (v) maior taxa de mutações e transferência de genes de resistência; e (vi) expressão diferencial de genes de resistência a antibióticos específicos de biofilme. A recalcitrância clínica aos antibióticos é responsável pela maioria das dificuldades encontradas no tratamento de infecções relacionadas ao biofilme (FUENTE-NÚÑEZ *et al.*, 2013; OLSEN, 2015; VUOTTO; DONELLI, 2019).

3 PRINCIPAIS DOENÇAS INFECCIOSAS EM RUMINANTES ASSOCIADAS A FORMAÇÃO DE BIOFILME

As doenças associadas ao biofilme representam sério desafio à saúde animal, resultando em grandes perdas econômicas na indústria pecuária. Acredita-se que o biofilme seja responsável por cerca de 65-80% das doenças infecciosas que afetam animais e humanos, portanto, o impacto dessas comunidades microbianas na medicina veterinária e humana, não pode ser ignorado (ABDULLAHI *et al.*, 2016; GARCÍA; PERCIVAL, 2011).

A fisiopatologia da maioria das infecções associadas ao biofilme em animais é semelhante à de humanos. De acordo com Abdullahi *et al.* (2016) aproximadamente 61% das infecções por biofilme em humanos são de origem zoonótica, destacando a importância da adoção de um protocolo de tratamento e prevenção eficaz para o controle do biofilme na medicina veterinária, e retomando os conceitos da Saúde Única (“*One Health*”), ou seja, reconhecendo que entre a saúde humana e a saúde animal não existem linhas divisórias.

As doenças infecciosas associadas à formação de biofilme apresentam características específicas: (i) As bactérias envolvidas na infecção são aderentes a algum substrato ou estão associadas à superfície. (ii) O exame direto do tecido infectado mostra bactérias vivendo em aglomerados, ou microcolônias, encerradas em uma matriz extracelular. A matriz pode frequentemente ser composta de componentes bacterianos e do hospedeiro. (iii) A infecção é geralmente confinada a um local específico. Embora possa ocorrer disseminação, esse é um fenômeno secundário. (iv) A infecção é crônica e difícil de erradicar com uso de antibióticos

(OLSON *et al.*, 2002; PARSEK; SINGH, 2003). Algumas das doenças infecciosas típicas de ruminantes, nas quais os biofilmes bacterianos estão envolvidos, baseado em análises histopatológica e ultraestrutural do tecido, estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais doenças infecciosas em ruminantes associadas à formação do biofilme bacteriano

Doenças	Principais bactérias envolvidas	Ruminantes afetados	Referências
Abscesso hepático	<i>Fusobacterium necrophorum</i> ; <i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Bovinos	Abdullahi <i>et al.</i> (2016) e Tadepalli <i>et al.</i> (2009)
Endometrite	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>F. necrophorum</i> ; <i>A. pyogenes</i>	Bovinos	Elamaran <i>et al.</i> (2018)
Enterite	<i>E. coli</i> ; <i>Salmonella</i> spp.	Bovinos, ovinos e caprinos	Olson <i>et al.</i> (2002)
Linfadenite caseosa	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Bovinos, ovinos e caprinos	Abdullahi <i>et al.</i> (2016) e Williamson (2001)
Mastite	<i>Acinetobacter baumannii</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>Streptococcus uberis</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bovinos, ovinos e caprinos	Abdullahi <i>et al.</i> (2016), Beloni <i>et al.</i> (2020), Wareth, Neubauer e Sprague (2019)
Otite	<i>E. coli</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>P. aeruginosa</i>	Bovinos e ovinos	Constantin, Houshaimy e Togoe (2016)
Pneumonia	<i>A. baumannii</i> ; <i>Streptococcus</i> sp.	Bovinos, ovinos e caprinos	Abdullahi <i>et al.</i> (2016), Wareth, Neubauer e Sprague (2019)

Fonte: Os autores.

O abscesso hepático é uma lesão na parede do fígado resultante da invasão e multiplicação de bactérias da espécie *Fusobacterium necrophorum*. Trata-se de um microrganismo que faz parte da microbiota gastrointestinal dos ruminantes. Do rúmen, o *F. necrophorum* ganha entrada na circulação portal e fica alojado no fígado, causando os abscessos (TADEPALLI *et al.*, 2009). A incidência do *F. necrophorum*, isolado a partir da cultura dos

abscessos hepáticos, tem variado de 81 a 100%. O segundo patógeno mais frequentemente isolado é o *Arcanobacterium pyogenes*. Os abscessos hepáticos são apontados como um problema econômico, pois causam impactos para os produtores e a indústria frigorífica devido à redução do desempenho dos animais e condenação do órgão, respectivamente (DE PAULA JÚNIOR *et al.*, 2018).

A endometrite é uma das doenças uterinas mais comuns em vacas leiteiras, causando diminuição da fertilidade e grandes perdas econômicas. Após o parto, bactérias do ambiente podem contaminar o lúmen uterino da maioria dos bovinos. A infecção persiste no útero por mais de três semanas, com cerca de 15% dos bovinos leiteiros apresentando sinais de endometrite clínica. Essa infecção geralmente envolve uma mistura de bactérias patogênicas, dentre as quais podemos citar a *Escherichia coli*, o *Staphylococcus aureus* e o *F. necrophorum* (ELAMARAN *et al.*, 2018).

Enterite se refere à inflamação do intestino que acomete os ruminantes, essa patologia é associada a um quadro de desinteria devido à má digestão e desequilíbrio de fluidos e eletrólitos. A gravidade dos sinais clínicos pode diferir entre bovinos e os pequenos ruminantes. O diagnóstico da causa da enterite e dos patógenos envolvidos na etiologia têm importantes implicações zoonóticas e para a saúde do rebanho (HELLER; CHIGERWE, 2018).

Linfadenite caseosa é uma doença crônica, debilitante e infectocontagiosa causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* produtoras ou não produtoras de biofilme, que geram graves perdas econômicas, principalmente em fazendas de pequenos produtores acometendo os rebanhos ovinos, caprinos e bovinos (COSTA *et al.*, 2020; SÁ *et al.*, 2018). Esta patologia altamente prevalente, é caracterizada pela formação de abscessos nos linfonodos externos, internos e nos órgãos, se apresentando em duas formas principais: a forma externa, caracterizada por infecção do tecido subcutâneo e linfonodos superficiais (mandibular, parotídeo, cervical superficial, subilíaco e mamário). E uma forma interna caracterizada pelo desenvolvimento de abscessos em órgãos internos, como pulmão, fígado, rins, útero, baço e linfonodos internos (mediastinal, brônquico e lombar). Ambas as formas podem existir concomitantemente. Outros locais menos comuns de envolvimento incluem o úbere, escroto, sistema nervoso central e articulações (WILLIAMSON, 2001). De acordo com Costa *et al.* (2020), devido a capacidade de *C. pseudotuberculosis* permanecer no meio ambiente por vários meses, nota-se a dificuldade em monitorar o estado da doença, bem como sua facilidade de propagação, portanto, o número de animais infectados em um rebanho com lesões viscerais pode ser significativamente maior do que aqueles com sinais superficiais da doença.

A mastite é a inflamação da glândula mamária, caracterizada pela presença dos sintomas inflamatórios nos tetos em resposta a invasão e multiplicação de microrganismos, tais como bactérias, algas, micoplasmas ou fungos, dentro do tecido da glândula mamária. Essa patologia é de difícil tratamento e causa enormes prejuízos à pecuária leiteira em consequência de queda na qualidade e quantidade do leite produzido, mortes e abates prematuros de animais afetados e pelos custos referentes ao tratamento (BELONI *et al.*, 2020; LOPES *et al.*, 2020; MUSHTAQ *et al.*, 2018).

Otite é a inflamação do ouvido causada por uma infecção, caracterizada por pústulas, furúnculos ou crostas, comum em bovinos e ovinos em ambiente de confinamento. A patologia tem impacto negativo na produção animal, seja pelo custo dispendioso com medicamentos, que por vezes são ineficazes, ou pelo desconforto aos animais por meio de prurido intenso na região (CONSTANTIN; HOUSHAIMY; TOGOE, 2016; SOBRAL *et al.*, 2019).

Finalmente, a pneumonia trata-se da infecção do trato respiratório dos ruminantes com inflamação dos bronquíolos, parênquima e pleura. De acordo com Wareth, Neubauer e Sprague (2019), a presença de *A. baumannii* foi observada como uma das principais causas de pneumonia em bovinos. O acometimento pela doença tem consequências a longo prazo ao impactar negativamente no crescimento, desempenho reprodutivo e longevidade, sendo um fardo econômico para as indústrias de carne e laticínios devido à mortalidade dos animais infectados (LIMA *et al.*, 2016; MARGARIDO; LIMA NETO; FERREIRA, 2008).

No hospedeiro, os biofilmes atuam como fatores que protegem os microrganismos das defesas do sistema imunológico, e, também, oferecem proteção contra os desafios mecânicos e químicos. Entender o dinamismo das infecções causadas por bactérias formadoras de biofilme, pode auxiliar na elucidação dos mecanismos moleculares de patogenicidade e resistência; bem como auxiliar no desenvolvimento de novas formulações que tenham os biofilmes como alvos (ABDULLAHI *et al.*, 2016; GARCÍA; PERCIVAL, 2011).

Atualmente, o tratamento das infecções causadas por linhagens bacterianas formadoras de biofilme requer abordagem dupla por meio da combinação de anti-biofilme e agente antimicrobiano, pois a abordagem antimicrobiana convencional tem um alcance restrito ao local da infecção, com pouco ou nenhum efeito sobre o biofilme. Assim, torna-se iminente a busca por estratégias alternativas para tratar e inibir a formação do biofilme em infecções em ruminantes, visando a manutenção da saúde animal e humana dentro do contexto da saúde única. Diante disso, os produtos naturais têm se destacado como potenciais alternativas ao tratamento de infecções microbianas e propriedade anti-biofilme (ABDULLAHI *et al.*, 2016).

4 USO DE PRODUTOS NATURAIS COMO FONTES ALTERNATIVAS DE TRATAMENTO ANTIMICROBIANO E ANTI-BIOFILME

Dentre as fontes de produtos naturais, as plantas têm uma contribuição significativa na descoberta de novos compostos bioativos, sendo estes decorrentes do metabolismo secundário do vegetal. A presença dos metabólitos secundários confere ao organismo vantagens em relação aos demais, além disso, o teor e variedade desses metabólitos são influenciados por fatores inerentes às plantas e ao meio em que está localizada (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Diversas atividades biológicas foram atribuídas aos produtos naturais, dentre elas, a antimicrobiana tem sido bastante explorada devido à necessidade emergente na busca de novos antibióticos decorrente do desenvolvimento de mecanismos de resistência (HØIBY *et al.*, 2010; NEWMAN; CRAGG, 2020).

A complexidade química presente nos extratos vegetais tem permitido explorar diferentes alternativas que visem o controle microbiológico, interagindo direta ou indiretamente com o microrganismo. No primeiro caso, a diversidade de substâncias presente nos extratos vegetais, pode atuar de maneira sinérgica frente ao microrganismo, interagindo com diferentes alvos na célula microbiana ou, indiretamente, diminuindo a adesão celular a superfícies e/ou interferindo na comunicação celular bacteriana (BJARNSHOLT *et al.*, 2013). Diante do exposto, constituintes químicos de origem vegetal que potencializam a ação antimicrobiana, atenuem a virulência e/ou modulem a formação dos biofilmes, configuram uma estratégia promissora na antibioticoterapia (ROY *et al.*, 2018).

Considerando que a formação e a presença de biofilmes prejudicam a atuação de antimicrobianos e que os fármacos disponíveis apresentam eficácia limitada, o emprego de produtos naturais provenientes de plantas tem se destacado nos recentes estudos (BORGES *et al.*, 2016). Os efeitos anti-biofilme de produtos naturais baseiam-se principalmente nos seguintes aspectos, a inibição da formação da matriz polimérica, supressão da adesão e fixação celular, diminuição da produção de moléculas sinalizadoras, bloqueando assim o QS e o desenvolvimento do biofilme (LU *et al.*, 2019).

Alam *et al.* (2020) avaliaram a atividade de diferentes plantas medicinais frente a formação de biofilmes provenientes de *P. aeruginosa*, em que, o extrato metanólico dos rizomas de *Berginia ciliata* inibiu a formação do biofilme em 81% sem interferir na sobrevivência dos microrganismos. Enquanto, o extrato etanólico das folhas de *Clematis grata* reduziu em 80%, contudo, esta redução está associada à atividade microbicida, no qual o extrato vegetal diminuiu significativamente a população dos microrganismos. A caracterização química desses extratos

vegetais, mostrou a classe dos flavonoides como compostos majoritários, os autores sugerem que esta classe esteja envolvida nessa atividade, detalhes sobre o potencial biológico desta classe foram revisados recentemente (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). Tanto o extrato metanólico, quanto das nanopartículas com *B. ciliata* foram capazes de reduzir a formação de biofilme de *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus* (ZIA *et al.*, 2018). Em estudo anterior, a atividade antimicrobiana de *B. ciliata* havia sido relatada frente a *P. aeruginosa* e as espécies de *Bacillus megaterium* e *B. subtilis* (MAZHAR-UL-ISLAM *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos na decocção de *Oxytropis glabra* inibiu significativamente a formação de biofilme em cerca de 95% sem afetar o crescimento celular de *S. epidermidis* e sugerem uma aplicação potencial para *O. glabra* como um candidato promissor para a exploração de novos medicamentos contra infecções associadas ao biofilme de *S. epidermidis* (REN; WANG; CHEN, 2020).

Isolados de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. megaterium* foram empregados no estudo de Sharun *et al.* (2021), que avaliou a atividade antimicrobiana do extrato de *Terminalia chebula* Retz como prevenção à formação de biofilmes. Foi verificada a eficácia nas concentrações de 100, 500 e 1000 µg/mL, sendo que a concentração intermediária e o controle positivo (amoxicilina 100 µg/mL) não apresentaram diferença estatística significativa, evidenciando que o extrato vegetal pode ser uma alternativa promissora no controle desses microrganismos. O extrato utilizado foi obtido com acetato de etila e a fitoquímica indica a presença de taninos hidrolisáveis como compostos majoritários. Está descrito na literatura que compostos dessa classe interagem com diferentes proteínas, polissacarídeos e polímeros, logo a presença desses constituintes nos microrganismos poderiam ser alvo de interação com os taninos (MELLO; SANTOS, 2017).

Song *et al.* (2019), utilizaram óleo da semente de toranja, utilizado como conservante de alimentos, frente a inibição de biofilmes formados pelas linhagens de *S. aureus* e *E. coli*, separadamente. O óleo da semente de toranja apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 25 e 250 µg/mL para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. A inibição da formação de biofilmes de *S. aureus* variou entre 55,8% a 70,2% e 20,6% a 55,4% para linhagens de *E. coli*. Enquanto, a erradicação do biofilme formado só foi alcançada nas concentrações acima do CIM referente a cada linhagem analisada. O óleo da semente de toranja promoveu alterações na produção e motilidade de EPS para ambas espécies, porém alteração na hidrofobicidade foi presente apenas em *E. coli*.

Wojnicz *et al.* (2012) avaliaram os extratos metanólicos de *Betula pendula*, *Equisetum arvense*, *Herniaria glabra*, *Galium odoratum*, *Urtica dioica* e *Vaccinium vitis-idaea* e relataram uma redução significativa na formação de biofilme de *E. coli* uropatogênica.

Silva *et al.* (2019) utilizaram isolados *Staphylococcus* spp. provenientes do leite de ruminante com mastite subclínica na avaliação antimicrobiana de diferentes concentrações do extrato etanólico das cascas e folhas de *Commiphora leptophloeos*. A concentração bactericida mínima (CBM) foi obtida pelo extrato das cascas, sendo de 781 µg/mL. Ambos extratos vegetais foram mais eficientes na prevenção da formação dos biofilmes do que na erradicação do biofilme previamente consolidado. A caracterização química dos extratos revelou a presença de compostos flavonoides como a vitexina e seus análogos, e taninos condensados.

A espécie *Croton urucurana* também foi eficaz na erradicação do biofilme produzido por *S. aureus*, inibindo a formação do biofilme em 50,03%, na concentração de 5 mg/mL, e se mostrando significativamente superior à gentamicina, que na concentração de 30 mg/mL erradicou apenas 13,94% do biofilme. O α -costol, composto isolado desta espécie, reduziu significativamente a população bacteriana presente no biofilme; este sesquiterpeno oxigenado apresenta ação na Na⁺/K⁺ATPase de diversos microrganismos. Outras espécies de *Croton* spp. tiveram atividade analisada frente aos biofilmes produzidos por esses microrganismos, como a *C. nepetaefolius* (NADER *et al.*, 2018).

Produtos naturais isolados também se mostraram promissores na inibição da formação de biofilmes de *P. aeruginosa*, dentre diversas classes de metabólitos secundários com atividade frente a formação de biofilmes. Uma revisão feita por Paczkowski *et al.* (2017), reúne vários flavonóides capazes de suprimir a comunicação QS de *P. aeruginosa* e, conseqüentemente, a formação de biofilmes. Amaya *et al.* (2012) avaliaram seis lactonas sesquiterpênicas oriundas de *Centratherum punctatum*, em que houve alteração na formação do biofilme, atividade de elastase e na produção autoindutores do QS, a eficiência das lactonas sesquiterpênicas na redução da formação do biofilme variou de 39% a 42%.

Uruén *et al.* (2021) traz uma revisão de diferentes formas de controle microbiológico com alvo em ação anti-biofilme, e além disso, aborda a elucidação de alguns mecanismos de ação das substâncias ativas de origem natural, como as furanonas halogenadas e os flavonoides como, a quercetina, e os constituintes de óleos essenciais como, cinamaldeído, timol e o carvacrol. Dentre as alterações em comum para esses compostos estão a inibição ou interrupção da comunicação via QS; interrupção da síntese de macromoléculas como lipídios, proteínas e polissacarídeos e genes relacionados à formação de biofilmes; alteração da permeabilidade da membrana celular e motilidade microbiana. Terapias combinadas utilizando diferentes produtos

naturais também têm sido promissoras como, por exemplo, a associação de carvacrol e eugenol ou cinamaldeído e eugenol aumentam a permeabilidade da membrana de espécies como *P. aeruginosa*, *S. aureus* e de *S. epidermidis*, respectivamente. A utilização combinada de curcumina e ciprofloxacino correspondeu à inibição de QS de *E. coli*, *P. aeruginosa* e de *S. aureus* (LOPES *et al.*, 2020). Song *et al.* (2018), reuniram em sua revisão mais de 90 compostos ativos naturais com propriedade anti-biofilme, dentre eles, diversos polifenóis, terpenos e alcalóides, além de óleos essenciais e extratos vegetais.

O biofilme produzido por *A. baumannii* mostrou ser suscetível ao monoterpeno mirtenol na concentração de 200 µg/mL, de maneira que não houve efeito prejudicial sobre o crescimento e a viabilidade do microrganismo. De acordo com as análises microscópicas ocorreu redução da espessura e da cobertura do biofilme. Ainda no estudo ficou evidente que o composto foi capaz de inibir os fatores de virulência e suprimir genes associados ao biofilme, além disso, melhorou a suscetibilidade aos antibióticos convencionais, como amicacina, ciprofloxacina, gentamicina e trimetoprima (SELVARAJ *et al.*, 2020).

O extrato metanólico de *Actinidia deliciosa* apresentou atividade anti-biofilme para *A. baumannii* resistentes ao carbapenem na concentração de 22,5 µg/mL, causando uma redução na matriz extracelular de EPS, proteínas e eDNA (TIWARI *et al.*, 2017). Mohammadi *et al.* (2019) analisaram a suscetibilidade de diferentes microrganismos frente ao extrato de *Carum copticum* no desenvolvimento de biofilmes e na forma planctônica. Dentre os microrganismos testados, o extrato foi eficaz ao inibir a forma planctônica de *S. aureus*, diferente do que aconteceu com *A. baumannii*, em que ocorreu baixa eficiência. Quando avaliado a inibição da formação de biofilmes, o extrato metanólico de *C. copticum* reduziu em até 98% o biofilme produzido por *A. baumannii*.

O própolis verde foi utilizado no tratamento de pós-cirúrgico de linfadenite caseosa em ovelhas por Kalil *et al.* (2019). Os resultados obtidos foram comparados ao controle positivo, solução de iodo a 10%, em que o grupo tratado com a pomada de própolis verde 20% resultou na cicatrização completa da ferida operatória com antecedência de uma semana em relação ao grupo controle. Os microrganismos *C. pseudotuberculosis* foram isolados antes do tratamento das feridas e tiveram a suscetibilidade testada frente ao própolis, e o mesmo foi capaz de inibir o crescimento de 23 dos 27 isolados clínicos, com CIM de 0,1 a 0,8 mg/mL. Em quatro isolados, não houve a formação de biofilmes. A pomada foi preparada a partir do extrato hidroalcoólico de própolis (80% v/v) seguido de uma fusão com óleos e ceras também naturais, no final a concentração de própolis correspondia a 20% da preparação.

Estudo realizado por He *et al.* (2016) demonstrou que 50 µg/mL de resveratrol, um polifenol de origem natural, encontrado em cascas de uva e frutas vermelhas, possui efeito bacteriostático em células planctônicas das espécies de *Fusobacterium* spp., com CIM correspondente a 100 µg/mL. O resveratrol também interferiu significativamente na formação de biofilme, em concentração variando de 1,56 a 25,0 µg/mL. Além disso, esse composto natural foi capaz de promover alterações na estrutura do biofilme formado e suprimiu genes envolvidos na produção de biofilmes.

Os constituintes voláteis de *Polygonum cuspidatum* foram eficazes na inibição do crescimento de *Salmonella* spp., *E. coli*, *S. aureus*, com uma concentração variando de 5,74 a 8,89%, respectivamente (KIM; HWANG; SHIN, 2005). Outros compostos voláteis, pertencentes a *Minthostachys verticillata*, foram testados frente a *S. uberis* isolados de mastite bovina. Além do óleo essencial, foi avaliado a ação do limoneno isolado. A CIM para o óleo essencial variou entre 1,56 e 12,5%, enquanto que a CBM variou entre 12,5 e 25%. Enquanto a CIM e CBM para o limoneno variou de 0,39 a 6,25% e 25%, respectivamente. Ambos tratamentos também foram eficazes na redução do biofilme formado pelo *S. uberis*, sendo relatado o intervalo de 88,25% a 23,5% para o óleo essencial, e de 92,18% a 23,20% para o limoneno (MONTIRONI; CARIDDI; REINOSO, 2016).

Sakarikou *et al.* (2020), trazem uma revisão atual sobre os extratos e produtos naturais isolados de plantas com atividade anti-biofilme sobre diferentes espécies de *Salmonella* spp. A atividade antimicrobiana do sesquiterpeno *trans-trans*-farnesol foi relatada pela primeira vez na literatura com CIM de 16 µg/mL para *S. agalactiae* e *S. pyogenes*. Além disso, o mesmo composto foi eficaz na inibição do biofilme de *S. aureus* resistentes à meticilina, variando as concentrações de 2 a 128 µg/mL (LOPES *et al.*, 2021).

É inegável o potencial farmacológico que as plantas e seus derivados podem exercer na terapêutica humana e animal. Muitos estudos dispostos na literatura científica ainda carecem de harmonização metodológica para a investigação antimicrobiana, o mesmo também ocorre com as técnicas empregadas na identificação e caracterização das plantas utilizadas nos estudos. Isso dificulta compilar os dados obtidos até hoje, tanto a respeito da suscetibilidade dos microrganismos quanto das substâncias ou extratos vegetais eficazes. A organização dessas informações químicas e biológicas, por meio de técnicas de desreplicação e empregando a química medicinal se faz necessária e pode racionalizar estudos futuros de maneira que atenda à necessidade constante de fármacos eficazes, principalmente com propriedades antimicrobianas e anti-biofilmes (BERLINCK *et al.*, 2017; NEWMAN; CRAGG, 2020).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A capacidade dos microrganismos de evoluir e se adaptar aos estímulos ambientais leva ao desenvolvimento de resistência a uma ampla gama de antibióticos disponíveis comercialmente. A formação de biofilme é uma forma antiga de adaptação bacteriana que contribui substancialmente para falhas terapêuticas. O controle de infecções bacterianas resistentes associadas ao biofilme é um problema de saúde humana, animal e ambiental. A interconexão dessas três áreas favorece a transmissão de bactérias, bem como o fluxo de elementos genéticos contendo genes de resistência a antibióticos. A disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos pode ocorrer por meio de transmissão cruzada de reservatórios animais para humanos, seja por exposição direta ou através da cadeia alimentar, enquanto a transmissão do meio ambiente para humanos pode ocorrer por meio do consumo de água e alimentos. Evidenciando a importância do estudo das doenças infecciosas no contexto da saúde única, é urgente a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas para transcender os problemas de resistência aos antibióticos em doenças infecciosas microbianas.

Conforme discutido nesta revisão, resistência antimicrobiana associada a formação do biofilme integra muitos mecanismos, incluindo mudanças metabólicas, respostas ao estresse, inativação de antibióticos na matriz polimérica, interrupção da comunicação interbacteriana, aumento da mutabilidade e troca de material genético. Muitos destes fatores foram observados *in vitro*. No entanto, é necessário estudar biofilmes em infecções animais, em que populações bacterianas podem ser heterogêneas e fatores como, defesa do hospedeiro e difusão dos antimicrobianos nos tecidos podem influenciar no prognóstico da doença. A compreensão mais aprofundada desta dinâmica certamente propiciará novas estratégias terapêuticas para lidar com estas infecções.

A vasta disponibilidade de produtos de origem natural, sua utilização para fins terapêuticos, baixo custo, e a complexidade química em princípios ativos presentes nas plantas têm despertado o interesse no uso destas como possíveis fontes de antimicrobianos e anti-biofilmes. É notório que as plantas e seus derivados, têm se destacado nas pesquisas devido aos resultados promissores relatados, encorajando novos estudos para expandir a terapêutica atual. Assim, é necessário a promoção de tratamentos alternativos mais seguros, eficazes e com custo acessível. E, espera-se que os conhecimentos acumulados até o momento possam contribuir e racionalizar estudos posteriores.

6 REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, U. F. *et al.* Intrigues of biofilm: a perspective in veterinary medicine. **Veterinary World**, v. 9, n. 1, p. 12-18, 2016.
- ALAM, K. *et al.* Anti-biofilm activity of plant derived extracts against infectious pathogen-*Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 11, p. 1734-1741, 2020.
- AMAYA, S. *et al.* Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by sesquiterpene lactones. **Phytomedicine**, v. 19, n. 13, p. 1173-1177, 2012.
- BELONI, M. V. *et al.* Atividade antibacteriana dos óleos essenciais frente a agentes causadores da mastite bovina. In: SILVA, M. A. da. *et al.* **Tópicos Especiais em Ciência Animal IX**. 1 ed. Alegre: CAUFES, 2020, p. 262 – 281.
- BERLINCK, R. G. S. *et al.* A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017.
- BJARNSHOLT, T. *et al.* Applying insights from biofilm biology to drug development—can a new approach be developed? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 10, p. 791-808, 2013.
- BORGES, A. *et al.* New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 1-41, 2016.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Assessoria de assuntos internacionais de saúde. saúde e política externa: os 20 anos da assessoria de assuntos internacionais de saúde (1998-2018) / Ministério da saúde, assessoria de assuntos internacionais de saúde.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 364p.
- CONSTANTIN, T.; HOUSHAIMY, K.; TOGOE, D. Medical and surgical management of otitis in sheep-case report. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 10, p. 390-395, 2016.
- COSTA, L. *et al.* Utility assessment of an Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of subclinical cases of caseous lymphadenitis in small ruminant flocks. **Veterinary Medicine and Science**, v. 6, n. 4, p. 796-803, 2020.
- COSTELLOE, C. *et al.* Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 340, p. 1-11, 2010.
- DE PAULA JÚNIOR, R. G. *et al.* Abscesso hepático em bovinos: revisão. **Pubvet**, v.12, n.4, p.1-11, 2018.
- ELAMARAN, A. *et al.* Evaluation of ethno veterinary herbal formulation (*Cuminum cyminum* Raphanus sativus) in managing bovine endometritis. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, n. 4, p. 1116-1119, 2018.

- FLEMMING, H. C.; WUERTZ, S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 247-260, 2019.
- FUENTE-NÚÑEZ, C. de la. *et al.* Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 580-589, 2013.
- GARCÍA, A. B.; PERCIVAL, S. L. Zoonotic infections: the role of biofilms. In: PERCIVAL, S. L.; KNOTTENBELT, D. C.; GARCÍA, A. B. **Biofilms and Veterinary Medicine**. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2011, p. 69-110.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- HE, Z. *et al.* Anti-biofilm activities from resveratrol against *Fusobacterium nucleatum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1065, p. 1-9, 2016.
- HELLER, M. C.; CHIGERWE, M. Diagnosis and treatment of infectious enteritis in adult ruminants. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 34, n. 1, p. 119-131, 2018.
- HØIBY, N. *et al.* Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.
- HUGHES, G.; WEBBER, M. A. Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. **British Journal Of Pharmacology**, v. 174, n. 14, p. 2237-2246, 2017.
- JAMAL, M. *et al.* Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 7-11, 2018.
- KALIL, M. A. *et al.* Brazilian green propolis as a therapeutic agent for the post-surgical treatment of caseous lymphadenitis in sheep. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. 399, p. 1-10, 2019.
- KIM, Y.; HWANG, C.; SHIN, D. Volatile constituents from the leaves of *Polygonum cuspidatum* S. et Z. and their anti-bacterial activities. **Food Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 139-144, 2005.
- KUMAR, A.; PATYAL, A.; PANDA, A. K. Sub-therapeutic use of antibiotics in animal feed and their potential impact on environmental and human health: a comprehensive review. **Journal of Animal Feed Science and Technology**, v. 6, p. 15-25, 2018.
- LEBEAUX, D.; GHIGO, J.; BELOIN, C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 3, p. 510-543, 2014.
- LIMA, S. F. *et al.* The upper respiratory tract microbiome and its potential role in bovine respiratory disease and otitis media. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.

- LOCK, G. A. **Infecções bacterianas associadas a biofilmes em superfícies bióticas: critérios diagnósticos, tratamentos e perspectivas.** 2015. 74 f. Trabalho de Conclusão (Curso. Faculdade de Farmácia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- LOPES, A. P. *et al.* Antimicrobial, modulatory, and antibiofilm activity of tt-farnesol on bacterial and fungal strains of importance to human health. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 47, p. 1-8, 2021.
- LOPES, T. S. *et al.* Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 131, p. 186-193, 2020.
- LU, L. *et al.* Developing natural products as potential anti-biofilm agents. **Chinese Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-17, 2019.
- MARGARIDO, R. S.; LIMA NETO, D. L.; FERREIRA, F. V. Doenças respiratórias dos bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 10, p. 1-6, 2008.
- MAZHAR-UL-ISLAM, I. A. *et al.* Evaluation of antibacterial activity of *Bergenia ciliata*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 2, p. 21-27, 2002.
- MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial resistance: a one health perspective. **Microbiology Spectrum**, v. 6, p. 521-547, 2018.
- MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento.** 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 235-248.
- MOHAMMADI, M. *et al.* Study the antibacterial and antibiofilm activity of *Carum copticum* against antibiotic-resistant bacteria in planktonic and biofilm forms. **Microbial Pathogenesis**, v. 129, p. 99-105, 2019.
- MONTIRONI, I. D.; CARIDDI, L. N.; REINOSO, E. B. Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 48, n. 3, p. 210-216, 2016.
- MUHAMMAD, M. H. *et al.* Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1-20, 2020.
- MUKHERJEE, S.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 371-382, 2019.
- MUSHTAQ, S. *et al.* Bovine mastitis: an appraisal of its alternative herbal cure. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p. 357-361, 2018.
- NADER, T. T. *et al.* Antibiofilm activity of *Croton urucurana* compounds against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis in dairy cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1713-1719, 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 877-886, 2015.

OLSON, M. E. *et al.* Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 2, p. 86-92, 2002.

PACZKOWSKI, J. E. *et al.* Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 10, p. 4064-4076, 2017.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. 1-11, 2016.

PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 677-701, 2003.

RABIN, N. *et al.* Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 493-512, 2015.

REN, X.; WANG, L.; CHEN, W. *Oxytropis glabra* DC. inhibits biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* by down-regulating ica operon expression. **Current Microbiology**, v. 77, p. 1167-1173, 2020.

ROY, R. *et al.* Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522-554, 2018.

SÁ, M. C. A. *et al.* Linfadenite caseosa em caprinos e ovinos: revisão. **PUBVET**, v. 12, n. 11, a. 202, p.1-13, 2018.

SAKARIKOU, C. *et al.* Exploitation of plant extracts and phytochemicals against resistant *Salmonella* spp. in biofilms. **Food Research International**, v. 128, n. 108806, p. 1-63, 2020.

SCHWARZ, S.; LOEFFLER, A.; KADLEC, K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. **Advances in Veterinary Dermatology**, v. 8, p. 95-110, 2017.

SELVARAJ, A. *et al.* Antibiofilm and antivirulence efficacy of myrtenol enhances the antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.

SHARMA, D.; MISBA, L.; KHAN, A. U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2019.

SHARUN, K. *et al.* Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v. 41, n. 1, p. 107-136, 2021.

- SILVA, I. F. *et al.* Antimicrobial activity of ethanolic extracts from *Commiphora leptophloeos* (Mart.) JB Gillett against *Staphylococcus* spp. isolated from cases of mastitis in ruminants. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, p. 1-14, 2019.
- SOBRAL, S. A. *et al.* *Rhabditis* spp., in the Espírito Santo, State of Brazil and evaluation of biological control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 2, p. 333-337, 2019.
- SONG, X. *et al.* A review of natural products with anti-biofilm activity. **Current Organic Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 789-817, 2018.
- SONG, Y. J. *et al.* Anti-biofilm activity of grapefruit seed extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 1177-1183, 2019.
- TADEPALLI, S. *et al.* *Fusobacterium necrophorum*: a ruminal bacterium that invades liver to cause abscesses in cattle. **Anaerobe**, v. 15, n. 1-2, p. 36-43, 2009.
- TIWARI, V. *et al.* Effect of secondary metabolite of *Actinidia deliciosa* on the biofilm and extra-cellular matrix components of *Acinetobacter baumannii*. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 345-351, 2017.
- URUÉN, C. *et al.* Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 1-36, 2021.
- VUOTTO, C.; DONELLI, G. Novel treatment strategies for biofilm-based infections. **Drugs**, v. 79, n. 15, p. 1635-1655, 2019.
- WARETH, G., NEUBAUER, H.; SPRAGUE, L.D. *Acinetobacter baumannii* – a neglected pathogen in veterinary and environmental health in Germany. **Veterinary Research Communications**, v. 43, p. 1–6, 2019.
- WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 359-371, 2001.
- WOJNICZ, D. *et al.* Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and biofilm formation by the uropathogenic *Escherichia coli*. **Urological Research**, v. 40, n. 6, p. 683-697, 2012.
- ZIA, G. *et al.* *In vitro* studies on cytotoxic, DNA protecting, antibiofilm and antibacterial effects of biogenic silver nanoparticles prepared with *Bergenia ciliata* rhizome extract. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 68-78, 2018.

Capítulo 15

Compostos bioativos presentes em produtos comerciais destinados ao bem estar dos animais



Daiana Freitas Ferreira¹

Ana Flávia Ferreira Selva²

Mikaela Vieira Beloni³

Iara Evelim da Silva Ferreira⁴

Natânia do Carmo Sperandio⁵

Maria Júlia Singulane Lavorato⁶

Kássia Vidal Menezes⁷

Mariana de Oliveira Lima⁸

Elizeu Costa Silva⁹

Janaina Cecília Oliveira Villanova¹⁰

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: daiafreitasferreira@hotmail.com.br

² Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: aflavia44@hotmail.com

³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mikaelabeloni@hotmail.com

⁴ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: iara-evelim@hotmail.com

⁵ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: nataniasperandio@gmail.com

⁶ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mjslavorato@gmail.com

⁷ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: kassiavidal@hotmail.com

⁸ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: maricrf_@hotmail.com

⁹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: elizeuaivery@hotmail.com

¹⁰ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: farmacotecnica@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

A oferta e o emprego de produtos baseados em insumos farmacêuticos de origem vegetal, vem experimentando grande crescimento nas últimas décadas, principalmente, a partir dos anos 90 (FERREIRA *et al.*, 1998; MARQUES; SOUZA, 2012; PINTO *et al.*, 2002). O uso de derivados vegetais, que podem ser definidos como produtos extraídos das plantas medicinais *in natura* ou de drogas vegetais na forma de extratos, tinturas, alcoolaturas, óleos essenciais (OEs) ou fixos, ceras, exsudatos entre outros, é objeto de inúmeras pesquisas acadêmicas e dos setores de desenvolvimento e inovação de empresas de cosméticos, medicamentos e alimentos, principalmente. Há uma demanda cada vez maior da sociedade, em todo o mundo, para a substituição de ingredientes sintéticos por derivados vegetais provenientes de fontes renováveis, associada ao interesse pelo que é considerado saudável; à entrada de grandes empresas dos setores alimentício, farmacêutico e cosmético neste segmento; e, ao marketing ecológico ou ambientalmente correto, que rende selos de certificações variados, como “amigo do meio ambiente”, “natural”, “orgânico” ou “vegano”, entre outros (PIRES; GRISOTTO; GRISOTO, 2017).

No cenário das plantas medicinais, compostos bioativos podem ser definidos como metabólitos secundários presentes nos derivados vegetais que exercem efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos, podendo ou não serem utilizados na forma isolada (CRAGG; NEWMAN, 2013). Além da ampla biodiversidade de fontes para obtenção dos compostos bioativos, estas são renováveis e os compostos são associados a um menor potencial tóxico, podendo causar menor dano ao organismo (ASHFORTH *et al.*, 2010; BORGES; SOUZA; BARBOSA, 2011; MUSHTAQ *et al.*, 2018). Assim, fitofármacos, plantas medicinais, fitocosméticos e medicamentos fitoterápicos têm sido cada vez mais utilizados não somente no âmbito da saúde e bem-estar em humanos bem como nos animais (NASCIMENTO *et al.*, 2021; OZAKI; DUARTE, 2006).

Neste contexto, o objetivo deste capítulo é apresentar algumas plantas medicinais e seus principais compostos bioativos a partir dos quais são preparados produtos comerciais de uso veterinário, desenvolvidos para garantir o bem-estar dos animais, que estão disponíveis comercialmente. Entre as plantas medicinais de interesse foram selecionadas as seguintes: *Aloe vera L.* (babosa); *Azadirachta indica* (neem); *Calendula officinalis* (calêndula); *Cymbopogon citratus* (capim-limão); *Cymbopogon schoenanthus* (capim-camelo); *Cymbopogon nardus* (citronela); *Lavandula angustifolia* (lavanda); *Matricaria chamomilla* (camomila); *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Syzygium aromaticum* (cravo da índia) e *Origanum vulgare L.* (orégano).

2 PLANTAS MEDICINAIS EM PRODUTOS VETERINÁRIOS

2.1 *Aloe vera* L.

Aloe vera L., conhecida popularmente por babosa, é uma espécie vegetal pertencente à família Xanthorrhoeaceae. A babosa é uma planta xerófita, conhecida como suculenta, que possui grande quantidade de tecido para armazenamento de água, com vistas a sobreviver em períodos de seca. A babosa tem folhas verdes, grossas e carnudas e o gel mucilaginoso interno é viscoso e incolor, constituído de 99% de água e 1% de substâncias ativas (HAMMAN, 2008; RADHA; LAXMIPRIYA, 2015). A planta contém mais de 200 componentes, incluindo vitaminas, enzimas, minerais, ácidos graxos, hormônios e outros como o ácido salicílico, a lignina e saponinas. Os principais compostos bioativos da babosa são alantoina, aloína, antraquinonas, glicoproteínas, acemanana, aminoácidos e outros compostos bioativos. As antraquinonas - aloesína, aloína e emodina, são os componentes majoritários. A estes componentes são atribuídas atividade anti-inflamatória, antineoplásica, antimicrobiana, imunomodulatória, hidratante, antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante. Ainda, a babosa possui ação hidratante em função da sua grande capacidade umectante, sendo incorporada em produtos de higiene e beleza (FREITAS.; RODRIGUES; GASPI, 2014).

Tradicionalmente, a babosa é empregada visando ação cicatrizante (FREITAS; RODRIGUES; GASPI, 2014). Oryan *et al.* (2016) avaliaram o efeito da aplicação tópica do gel de babosa na cicatrização de feridas cutâneas em ratos e observaram que a aplicação tópica favoreceu a cicatrização, reduzindo a infiltração de células inflamatórias, aumentando a proporção de linfócitos e aumentando a deposição de colágeno. Kamar *et al.* (2020), demonstraram a eficácia terapêutica da pomada feita a partir do gel de babosa no tratamento do pioderma estafilocócico em cães, causado principalmente por *Staphylococcus pyoderma*, no qual foram observados efeitos antibacterianos e anti-inflamatórios para o produto, o que apoiaria seu uso como coadjuvante na terapia medicamentosa.

Há uma gama de produtos contendo babosa disponíveis comercialmente, destinados ao uso veterinário. Cabe destacar as linhas de produtos para higiene de pele, pelos e patas dos animais (sabonetes, xampus, condicionadores, cremes e géis hidratantes). Soluções para limpeza rotineira dos ouvidos de cães e gatos também estão disponíveis no mercado. As formas farmacêuticas são as soluções aquosas, os géis, as loções e os cremes do tipo óleo em água (OUROFINO, 2021). A Figura 1 mostra imagens fotográficas das espécies *Aloe vera* L e *Calendula officinalis* L.



Figura 1 – Imagens representativas das espécies *Aloe vera* L. (A) e *Calendula officinalis* L. (B) (POWO, 2021).

Fonte: Os autores (Criada com o software gratuito BioRender.com).

2.2 *Calendula officinalis* L.

A *Calendula officinalis* L., pertencente à família Asteraceae, é conhecida popularmente como calêndula, malmequer ou maravilha dos jardins. Trata-se de uma planta anual, de flores amarelo-alaranjado, que pode chegar até 60 cm de altura (BORTOLO; MARQUES; PACHECO, 2009).

Inúmeros usos medicinais e farmacêuticos são atribuídos à calêndula, podendo citar seu consumo em infusões, tinturas e extratos in natura ou incorporados em formas farmacêuticas, sendo a flor a de maior interesse. Os principais componentes são os compostos polifenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides e saponinas, sendo o ácido oleanólico, quercetina, isoquercitrina e rutina, os majoritários. São atribuídas à calêndula as seguintes atividades: imunomodulatória, antimutagênica, antiviral, antimicrobiana, antisséptica e digestiva (CITADINI-ZANETTE; NEGRELLE; BORBA, 2012). Outros componentes de interesse são o faradiol e o taraxasterol, aos quais são atribuídas ação antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e angiogênica, favorecendo a cicatrização de lesões tópicas, gástricas e orais (BOSCARATO *et al.*, 2020).

Boscarato *et al.* (2020) avaliaram a eficácia de um creme não iônico contendo extrato hidroalcolólico das flores de calêndula a 2% p/v sobre a cicatrização de uma ferida lacerante extensa na região peitoral de uma *Quarter Horse* tratada no setor de grandes animais do Hospital Veterinário da Universidade Paranaense. O creme foi aplicado 2 vezes ao dia até a cicatrização completa da ferida, demonstrando eficácia significativa, com ação antimicrobiana e favorecendo a epitelização.

No mercado existem vários produtos veterinários baseados na calêndula para uso como cicatrizante, principalmente, disponíveis nas formas de soluções, pomadas, cremes e géis (OUROFINO, 2021).

2.3 *Azaditacha indica*

A espécie *Azaditachta indica*, popularmente conhecida como neem, nim ou árvore da vida, vem sendo utilizada para a fabricação de medicamentos e produtos de higiene e beleza de uso humano e animal, bem como para o desenvolvimento de fitossaneantes - produtos para auxiliar o controle de pragas na agroindústria. O neem é uma espécie pertencente à família Meliaceae, sendo uma árvore que pode alcançar 20 metros de altura (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

As folhas, os frutos e as sementes do neem são utilizadas para obtenção de derivados vegetais que contém compostos bioativos de uso na medicina e cosmética humana e animal e, na agroindústria, no controle de pragas (MARTINEZ, 2002). Entre os derivados vegetais do neem, o OE extraído das sementes merece destaque. Além dos ácidos oléico, palmítico, esteárico, linoléico e araquídico, o óleo de semente de neem é rico em compostos bioativos sendo a azadiractina - um limonoide triterpênico, o principal. As principais ações relatadas para os óleos de neem são repelente, inseticida, acaricida, fungicida e nematicida (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

Na área veterinária, há inúmeros relatos do uso de produtos contendo o OE de neem administrados por pulverização no dorso de animais para controle de carrapato, mosca-do-chifre e sarna. Deleito e Borja (2008) avaliaram os efeitos inseticidas do óleo de neem a 0,6% p/v aplicado no solo para o controle de moscas das espécies *Cochliomyia hominivorax*, *Chrysomya megacephala*, *Lucilia cuprina* e *Musca domestica*, com o objetivo de minimizar a utilização de inseticidas sintéticos. Os resultados foram satisfatórios, com redução da emergência das moscas de 95,6% em condições de laboratório e 94,5% quando aplicado no solo de onde os animais descansam. Fernandes *et al.* (2012) prepararam uma emulsão de óleo de neem à 10% p/v e avaliaram a capacidade acaricida da formulação para controle de ácaros (*Psoroptes ovis*) no conduto auditivo de 12 animais. Após administração da formulação por 7 dias, os autores observaram redução de ácaros vivos. Em um estudo preliminar, Fernandes *et al.* (2010), avaliaram a eficácia do extrato aquoso de neem a 10% p/v no controle da sarna otodécica em cães naturalmente infestados e observaram eficácia superior a 80% na morte dos ácaros, sem a ocorrência de efeitos adversos.

Inúmeros produtos contendo OE de neem são comercializados nas formas de pó, solução oleosa, pomada oleosa e sistemas emulsionados água em óleo, para controle de parasitos e como repelente, principalmente. Soluções, xampus, sabonetes, loções, tanto para administração tópica em animais de rebanho, equinos, cães e gatos, entre outros, quanto no habitat, estão disponíveis no mercado (OUROFINO, 2021).

2.4 *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, *Cymbopogon schoenanthus* L. e *Cymbopogon nardus* L.

O gênero *Cymbopogon* pertence à família Poaceae e compreende cerca de 180 espécies e subespécies. Entre as muitas espécies do gênero *Cymbopogon* que se destacam para uso veterinário cabe citar as espécies aromáticas *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, *Cymbopogon schoenanthus* L. e *Cymbopogon nardus* L. As três espécies são ricas em compostos bioativos mono e sesquiterpênicos e são plantas conhecidas como aromáticas. Os óleos essenciais de *Cymbopogon* são usados nas indústrias de alimentos, medicamentos e produtos de higiene e beleza com finalidades diversas (FATHIFAR *et al.*, 2021). A Figura 2 mostra imagens fotográficas das três espécies de *Cymbopogon* apresentadas no presente capítulo.



Figura 2 – Imagens representativas das espécies *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. (A), *Cymbopogon schoenanthus* L. (B) e *Cymbopogon nardus* (C) (POWO, 2021).

Fonte: Os autores (Criada com o software BioRender.com).

A espécie *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. é conhecida como capim-limão, capim-santo ou capim-cidreira e pertence à família Poaceae, da classe das gramíneas (NEGRELLE; GOMES, 2007). É uma planta ereta, perene, de cerca de 0,60 m a 3 m de altura, com caule curto, escuro e com muita ramificação. Além disso, possui folhas lisas, estreitas e largas, com florescimento durante a estação do inverno (AGNOLIN, 2012).

O óleo essencial de capim-limão é rico em citral, composto bioativo formado pela mistura natural de dois isômeros - geranial (trans-citral) e neral (cis-citral) e em mirceno, sendo explorado dentre outras, pelas propriedades antiespasmódica, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-helmítica, inseticida e larvicida. Ainda, os derivados vegetais do capim-limão

são usados com finalidade carminativa, sedativa, antitérmica, analgésica, calmante, antirreumática e repelente (PINTO *et al.*, 2014; SILVA; RECK; FONSECA, 2016).

Na clínica veterinária há relatos do uso de OE e do extrato das folhas do capim-limão no controle de parasitos, como carrapatos, em rebanhos leiteiros (GUIMARÃES *et al.*, 2011; HEIMERDINGER *et al.*, 2006). Azevedo *et al.* (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana do OE de capim-limão frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* entéricas isoladas de aves de postura. Os autores observaram que o óleo essencial de capim-limão apresentou atividade antimicrobiana na concentração de 160 µL/mL e atribuíram a atividade ao citral. A eficácia do OE de capim-limão sobre o crescimento de *Malassezia pachydermati*, levedura causadora da malasseziase em cães, foi pesquisada *in vitro* e os resultados do estudo mostraram que em uma solução de OE a 20% v/v apresentou efeito inibidor do crescimento da levedura. Segundo os autores, o potencial efeito antifúngico pode estar relacionado à presença do terpeno citral no OE, enquanto o mirceno potencializa seus efeitos antimicrobianos (BISMARCK *et al.*, 2019).

A espécie *Cymbopogon schoenanthus* L., conhecida popularmente como capim-camelo, é uma planta perene que mede de 30 a 120 cm de comprimento, com folhas do tipo lâminas filiformes ou lineares, planas ou envoltentes, com comprimento de 10 a 35 cm e, 1 a 4 mm de largura (HASHIM *et al.*, 2017). O óleo essencial da espécie é rico em limoneno, canfeno, mirceno, β-elemeno, piperitona e 2-undecanona, explorada por suas propriedades antissépticas, antibacteriana, antifúngica e repelente (TALAEI; MOUSAVI; JAHANDIDEH, 2019; YAGI *et al.*, 2016).

Bossou *et al.* (2013), avaliaram a viabilidade do uso inseticida de nove óleos essenciais, entre os quais, o do capim-camelo, como método natural de proteção contra o mosquito *Anopheles* - principal vetor dos parasitos causadores da malária aviária. O ensaio *in vitro* mostrou uma redução de 83% a 100% de mortalidade dos mosquitos quando usado nas concentrações de 2% e 4% p/v, respectivamente. Na veterinária, o OE de *Cymbopogon schoenanthus* L. vem sendo empregado em produtos de uso tópico, principalmente para higienização de pelos e patas e ação repelente, em função da ação dos seus componentes aromáticos (OUROFINO, 2021).

A espécie *Cymbopogon nardus* L., conhecida popularmente como capim-citronela ou simplesmente citronela, é uma planta perene de coloração verde clara, de raízes resistentes, e folhas de comprimento grande e muito fibrosas, podendo alcançar altura de 0,80 a 1,20 metros. Suas folhas são longas e retas (AGNOLIN, 2012; LOPES, 2019).

Os principais compostos bioativos presentes nas folhas da citronela são o limoneno, o eugenol, o geraniol e o citronelal. A principal atividade terapêutica explorada na citronela é a repelente, ação atribuída ao citronelal (OLIVO *et al.*, 2008). Outras ações farmacológicas relacionadas à esta espécie são a antifúngica e a antibacteriana (SCHERER *et al.*, 2009).

Estudos mostraram que o OE de citronela possui ação contra ectoparasitas em bovinos, ajudando a controlar a proliferação de carrapatos bovinos, da mosca-dos-chifres, da mosca-dos-estábulo e da mosca doméstica (AGNOLIN, 2012). Outros estudos relataram também que o óleo de citronela impediu o avanço da ferrugem e da cercosporiose no sistema cafeeiro, atuando como fitossaneante eficaz (PEREIRA, 2008).

Existe um grande número de produtos comerciais de uso veterinário baseados em compostos bioativos extraídos das diferentes espécies de *Cymbopogon*, cabendo destacar aqueles destinados ao uso em repelente de insetos, eliminador de odores e produtos para banho (OUROFINO, 2021).

2.5 *Lavandula angustifolia* Mill

A *Lavandula angustifolia* Mill, popularmente conhecida como lavanda ou alfazema, é uma espécie de planta pertencente à família Lamiaceae, arbustiva, com cerca de 20 a 60 cm de altura que apresenta um caule lenhoso e perene. Suas folhas são simples, geralmente lineares, opostas e alongadas. Possui inflorescências de cor arroxeada com uma estrutura semelhante a espigas (PRUSINOWSKA; ŚMIGIELSKI, 2014). O OE isolado de folhas e flores da alfazema é amarelo e tem um intenso perfume floral herbal, com um toque delicado de frutas e madeira (PRUSINOWSKA; ŚMIGIELSKI, 2014).

Os OEs de lavanda são amplamente utilizados no preparo de medicamentos e produtos de higiene e beleza em função das inúmeras propriedades biológicas a eles atribuídos, entre as quais se destacam as ações sedativa, analgésica, ansiolítica, antiespasmódica, anticonvulsivante, anticolinesterásica, antidepressiva, cicatrizante, anti-inflamatória, antioxidante, antisséptica e antimicrobiana, sendo recomendada para tratar insônia, agitação, estresse, tensão nervosa, dor de cabeça, dor reumática, câibras musculares, distúrbios dermatológicos (acne, dermatite, psoríase, cicatrizes) e infecções tópicas (CARDIA *et al.*, 2018; SMIGIELSKI *et al.*, 2018). Estudos fitoquímicos revelaram que os principais constituintes dos OEs da lavanda são linalol, acetato de linalila, cânfora, borneol, 1,8-cineol e α -terpineol (CANTOR *et al.*, 2018; CARDIA *et al.*, 2018). Assim como inúmeros OEs do

gênero *Cymbopogon*, os OEs de *Lavandula angustifolia* são amplamente utilizados na prática integrativa denominada aromaterapia (RAPPER *et al.*, 2013).

Os OEs de lavanda também são empregados na medicina veterinária. Em um estudo realizado por Nada *et al.* (2015) foi observado que o OE de lavanda, quando aplicado sob feridas tópicas de cães, acelerou o processo de cicatrização sem causar reações adversas. Segundo os autores, as feridas tratadas com o óleo não apresentaram sinais inflamatórios, exsudação, dor e de infecção, podendo ser atribuídas às propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e analgésicas dos compostos bioativos α -terpineol e 4-terpinenol e cânfora.

O manejo do ácaro vermelho (*Dermanyssus gallinae*) em aves utilizando acaricidas sintéticos vem se tornando mais problemático devido a relatos de resistência (MIGUEL, 2019). George *et al.* (2008) investigaram a toxicidade e a atividade de curta duração de seis OEs de lavanda provenientes de diferentes países utilizando placas de Petri lacradas para exposição dos ácaros à papéis de filtro impregnados com os OEs na concentração de 0,14 mg/cm³. Segundo os autores, quando foi avaliada o uso dos papéis imediatamente após a impregnação, a mortalidade dos ácaros variou de 66 a 90%, dependendo do óleo essencial usado.

Ferguson, Kleinman e Browning (2013) avaliaram o efeito da exposição de cavalos à aromaterapia mediante exposição ao ar umidificado com uma mistura de 20% de OE de lavanda (100% puro) durante 15 minutos, sobre a redução dos efeitos do estresse agudo. As frequências cardíacas e respiratórias foram registradas para cada cavalo antes e após ser tocada uma buzina de ar, por duas vezes, durante 15 segundos. Os parâmetros cardíaco e respiratório foram medidos após o período de 60 segundos. Os autores observaram que a aromaterapia com o OE de lavanda diminuiu significativamente a frequência cardíaca nos animais após a resposta ao estresse agudo, sinalizando uma mudança do controle nervoso do sistema parassimpático. Poutaraud *et al.* (2018) realizaram um trabalho semelhante e testaram o efeito do OE de lavanda sobre a redução do estresse em cavalos, utilizando um frasco *roll-on* para aplicar 2 mL OE de lavanda a 10% v/v diluído em óleo fixo de girassol. Os resultados mostraram que os parâmetros de estresse avaliados (frequência cardíaca, postura de alerta, defecações e presença de cortisol na saliva) foram mais baixos nos cavalos tratados com OE de lavanda quando comparados aos parâmetros dos animais do grupo controle (somente óleo vegetal). O OE de lavanda também modificou o cortisol salivar.

Atualmente, diversos produtos contendo o OE de lavanda estão disponíveis no mercado destinados a manutenção da saúde e bem-estar dos animais, tais como, sabonete, xampu, condicionador, desembaraçador de pelos, hidratante, lenço umedecido com ação repelente,

spray relaxante para o ambiente, géis cicatrizantes, entre outros. As principais ações exploradas são a repelente e a antiestresse (OUROFINO, 2021).

2.6 *Matricaria chamomilla* L.

A *Matricaria chamomilla* L. é uma espécie popularmente conhecida como camomila e matricária. Trata-se de uma planta herbácea com uma altura de 10 a 80 cm, de caule fortemente ramificado, folhas longas e estreitas e flores pequenas, com miolo amarelo-douradas e pétalas brancas (SINGH *et al.*, 2011). A planta é amplamente utilizada na medicina popular desde a antiguidade, com relatos do uso da camomila no antigo Egito, Grécia e Roma. Chás, extratos e óleos essenciais das folhas e flores da camomila são utilizadas com finalidades farmacológicas diversas, tais como: carminativa, sedativa, emenagoga, antidiarreica, antidepressiva, antiespasmódica, anti-inflamatória, antisséptica, anti-helmíntica, antimicrobiana, antisséptica, antioxidante, cicatrizante, entre outras (LIM, 2014; OZAKI; DUARTE, 2006; SANTOS *et al.*, 2019). As atividades farmacológicas da camomila são devidas à presença de vários grupos de compostos bioativos, entre eles, os terpenícos camazuleno e α -bisabolol (SINGH *et al.*, 2011).

Uma finalidade importante do uso da camomila na prática veterinária é a obtenção de controle da ansiedade e inibição da resposta de estresse, favorecendo o relaxamento dos animais (SINGH *et al.*, 2011). Essas propriedades da camomila foram demonstradas em um estudo realizado por Cassu *et al.* (2011), que avaliaram os efeitos da camomila sobre a resposta de estresse em cadelas em isolamento social e posteriormente submetidas à ovariossalpingohisterectomia. Foi administrado o medicamento homeopático *Matricaria chamomilla* CH12, por via oral, iniciando-se 15 dias antes do procedimento e continuando por 24 h após a cirurgia. Ao avaliar o comportamento do animal e a concentração sérica de cortisol, conclui-se que o tratamento com a camomila preveniu a resposta de estresse pós-cirúrgica imediata, mantendo estável a concentração sérica de cortisol.

Diversos produtos farmacêuticos contendo camomila para uso veterinário, preparados a partir de derivados vegetais da camomila estão disponíveis no mercado, entre eles, xampus, sabonetes, condicionadores, soluções e loções para remoção de manchas de lágrima ácida em cães, soluções de limpeza auricular e de higienização de feridas, entre outros (OUROFINO, 2021). Na Figura 3 são dadas imagens representativas da lavanda e da camomila.



Figura 3 – Imagens representativas das flores das espécies *Lavandula angustifolia* (A) e *Matricaria chamomilla* (B) (POWO, 2021).

Fonte: Os autores (Criada com o software gratuito BioRender.com).

2.7 *Rosmarinus officinalis* L.

O *Rosmarinus officinalis* L. é uma planta arbustiva e perene, que pertence à família Lamiaceae, muito empregada na culinária *in natura* e utilizada na fabricação de produtos de higiene, medicamentos e alimentos. É conhecida como alecrim, alecrim-de-cheiro ou alecrim-das-hortas. Suas flores apresentam dois lábios e podem ter a sua tonalidade em azul ou branca e seu caule cobertos de pelos glandulares (ÉVORA, 2015; MARCHIORI, 2004; PORTE; GODOY, 2001).

As folhas e as sumidades floridas da planta são utilizadas no preparo de extratos e OEs ricos em compostos bioativos dos tipos hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos e terpenoides, como linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona, acetato de isobornila, rosmanol, cânfora, α -pineno, 1,8-cineol e os diterpenos rosmaridifenol e rosmariquinona entre outros (PORTE; GODOY, 2001). Aos derivados vegetais do alecrim são atribuídas, entre outras, ação diurética, colerética, colagoga, antirreumática, antidepressiva, antidiabética, analgésica, antimicrobiana, antisséptica, antioxidante, anti-inflamatória, cicatrizante e repelente (AMARAL *et al.*, 2013; SAEIDI; MOHARRAMIPOUR, 2013).

Segundo Batista *et al.* (2013) a *Ctenocephalides felis felis* (pulga) e o *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato), são os principais ectoparasitas que acometem cães e gatos, podendo transmitir doenças, provocar pruridos intensos, coceiras e injúrias, que podem causar até anemia. Ungentos contendo OE de alecrim são utilizados como inseticidas, acaricidas e fungicidas. Estudos demonstram alta eficácia destes como pulgicida e em menor amplitude, como carrapaticida, contribuindo para uma melhor qualidade de vida dos animais (BATISTA *et al.*, 2013). Segundo Oluwatuyi, Kaatz e Gibbons (2004), o OE de alecrim associado a um antibiótico atuou sinergicamente no controle de piodermites cutâneas em cães, causadas,

principalmente, por *Pseudomonas aeruginosa*. De acordo com os autores, esta ação sinérgica pode levar a uma diminuição da dose do antibiótico tradicional, minimizando as chances de resistência.

Produtos de uso veterinário contendo derivados vegetais do alecrim são destinados ao uso como repelente e neutralizadores de odor e, para o controle de infestações não severas de pulgas, piolhos e ácaros (OUROFINO, 2021).

2.8 *Origanum vulgare L.*

O *Origanum vulgare L.*, conhecido popularmente como orégano ou oregão, é uma espécie vegetal aromática, pertencente à família Lamiaceae, que se caracteriza como uma planta herbácea, perene, ereta, de porte baixo (20 a 80 cm) de altura, com hastes arroxeadas e de folhas simples, esparso-pubescentes, de 1 a 2 cm de comprimento, de cor verde escuras ou ligeiramente acinzentadas, ovais, com bordos serrilhados. Possui flores esbranquiçadas, róseas ou violáceas, dispostas em glomérulos e reunidos em inflorescências paniculadas terminais. A parte de maior interesse da planta é a folha (ALBADO; SAEZ; GABRIEL, 2001).

Estudos descrevem que o OE de orégano possui inúmeros compostos bioativos, entre os quais, carvacrol, timol, γ -terpeno, p-cimeno, borneol, cineol, terpineol, terpineno, apigenina, luteolina, di-hidrocampferol e di-hidroquercetina. Outros componentes encontrados foram os ácidos coumárico, rosmarínico, ferúlico, cafeico, hidroxibenzóico e vanílico (MILOS; MARTELICK; JOSEVICK, 2000). Inúmeras pesquisas comprovam a eficácia terapêutica do orégano como agente antimicrobiano, antifúngico, antiparasitário, antioxidante, antiespasmódica, anti-inflamatório, antiparasitário, antitumoral, carminativa e tônica (COQUEIRO *et al.*, 2012; MILOS; MARTELICK; JOSEVICK, 2000).

Santin *et al.* (2014) avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a isolados clínicos de *Malassezia pachydermatis* provenientes de casos clínicos de otites e dermatites em cães que se encontravam estocados na micoteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. Os autores concluíram que o fungo foi sensível ao OE de orégano a baixas concentrações, sendo considerado promissor na bioprospecção de novos IFAs para o tratamento das otites e dermatites em cães. Waller *et al.* (2016) observaram que OE extraído de orégano comercial apresentou atividade anti-*Sporothrix* spp. *in vitro*, sendo considerado promissor para o tratamento da esporotricose humana e animal, inclusive em casos refratários ao itraconazol.

2.9 *Syzigium aromaticum* L.

O *Syzigium aromaticum* L. é conhecido popularmente como cravo da Índia, planta que pertence à família Myrtaceae e que possui odor marcante e sabor ardente (CERQUEIRA *et al.*, 2009; GHEDIRA; GOETZ; LE JEUNE, 2010). O cravo da Índia é uma planta arbórea e de copa alongada podendo atingir de oito a dez m de altura, de folhas ovais, com 7 a 11 cm de comprimento. Os frutos, por sua vez, são avermelhados de drupa elipsoide (AFFONSO *et al.*, 2012). A parte mais utilizada da árvore é a gema floral seca, que pode ser usada como condimento ou para obtenção dos derivados vegetais, especialmente, OEs (RAINA *et al.*, 2001).

O OE de cravo da Índia possui β -cariofileno, α -humuleno, 2-heptanona, calameneno, calacoreno, acetato de eugenila e eugenol. Ao alto teor de eugenol são atribuídas as propriedades antiviral, antiúlcera, antidiabética, afrodisíaca, antioxidante, antitumoral, anestésica, anti-inflamatória, antimicrobiana e inseticida. O α -humuleno contribui para as atividades anestésica e anti-inflamatória (AFFONSO *et al.*, 2012; MAZZAFERA, 2003; SILVA, 2010).

Óleos essenciais que possuem eugenol vêm sendo utilizados como promotores de crescimento na alimentação de aves, proporcionando a melhora da flora intestinal e o aumento do desempenho produtivo. O eugenol evita que bactérias patogênicas se multipliquem na mucosa intestinal das aves (OETTING *et al.*, 2006). Segundo a literatura médica veterinária, o eugenol é eficaz no tratamento da malasseziase em cães e gatos, apontando um potencial efeito terapêutico antimicrobiano e ausência de efeitos colaterais (SOUSA *et al.*, 2021).

Um fator limitante para a piscicultura são os surtos de doenças parasitárias e bacterianas, para os quais os produtores têm lançado mão do uso de antimicrobianos e desinfetantes, na tentativa de controlar a alta mortalidade e prejuízos econômicos. Neste cenário, o uso de derivados vegetais tem se mostrado promissor. Em um estudo realizado por RAJENDIRAN,; NATARAJAN; SUBRAMANIAN, (2008), verificou-se a existência de atividade antibacteriana do extrato das folhas de cravo para o tratamento de peixes ornamentais da espécie cabeceira manchada infectados pela bactéria *Aeromonas hydrophila*.

Outra importante aplicação do OE de cravo é como sedativo e anestésico para uso durante o manejo e transporte de peixes ornamentais, podendo aliviar as reações de estresse e reduzir a motilidade dos animais (ROSS; ROSS, 2008). Vidal *et al.* (2008) avaliaram o uso do eugenol previamente diluído em álcool etílico, formando uma solução estoque a qual posteriormente foi acrescida em aquário com água utilizado na imersão de juvenis de tilápia até

o estágio de sedação profunda. Em todas as concentrações utilizadas o eugenol se mostrou efetivo como anestésico e sedativo para tilápias do Nilo. Em um trabalho semelhante, Ribeiro *et al.* (2013) estudaram o efeito do eugenol como anestésico para juvenis de pacamã, imersos individualmente em aquários contendo diferentes concentrações de eugenol previamente diluído em álcool etílico. Para juvenis de pacamã, as maiores concentrações utilizadas neste estudo foram consideradas seguras, e atenderam melhor os requisitos de rápida atuação e curto tempo de recuperação, promovendo menor estresse ao animal e facilidade no manejo. Na Figura 4 são dadas imagens representativas do cravo-da-Índia e do orégano.



Figura 4 – Imagens representativas dos frutos do cravo-da-Índia (A), gema floral seca do cravo-da-Índia (B) e flor do *Origanum vulgare* (C) (POWO, 2021).

Fonte: Os autores (Criada com o software gratuito BioRender.com).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na atualidade há uma gama de produtos farmacêuticos destinados à manutenção dos cuidados com a saúde e bem-estar de todas as populações animais, quer sejam dos pets, de animais exóticos, de lazer ou para aqueles produtores de alimentos. Se por um lado os pets são tratados pelos cuidadores como membros da família, por outro, animais produtores de alimentos podem ter a produtividade aumentada em ambientes favoráveis, uma vez que situações de estresse impactam diretamente na redução na produção de carne, leite e ovos, por exemplo. É cada vez mais crescente a busca por produtos destinados aos cuidados dos animais baseados em derivados vegetais ricos em compostos bioativos, em substituição aos ingredientes sintéticos. A realização de uma busca rápida na internet, utilizando ferramentas de domínio público, aponta a existência de inúmeros produtos de uso veterinário, com registro para comercialização concedido pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) ou preparados em farmácias magistrais, com a finalidade de manter o bem-estar da população veterinária. Dada a importância deste mercado, a discussão do tema é de grande relevância para os segmentos farmacêutico e veterinário.

4 REFERÊNCIAS

AFFONSO, R. S. *et al.* Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.

AGNOLIN, C. A. **Avaliação de óleos essenciais de capim limão, citronela e eucalipto no controle do carrapato.** 2012. 83f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

ALBADO, P. E.; SAEZ, F. G. GABRIEL, A. S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). **Revista Médica Herediana**, v. 12, n.1, p. 16-19, 2001.

AMARAL, G. P. *et al.* Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 48-55, 2013.

ASHFORTH, E. J. *et al.* Bioprospecting for antituberculosis leads from microbial metabolites. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 11, p. 1709-1719, 2010.

AZEVEDO, I. L. *et al.* Eficácia *in vitro* do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* Steud. Wats.) frente a bactérias entéricas de origem avícola. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 1, p. 25-31, 2016.

BATISTA, L. C. S. O *et al.* *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae): atividade *in vitro* frente a ectoparasitas de importância veterinária. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, n. 2, p. 119-125, 2013.

BISMARCK, D. *et al.* Antifungal *in vitro* activity of essential oils against clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from canine ears: a report from a m a practice laboratory. **Complementary Medicine Research**, v. 27, n. 3, p. 143-154, 2019.

BORGES, L. M. F.; SOUZA, L. A. D; BARBOSA, C. S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira Parasitologia e Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 89-96, 2011.

BORTOLO, D. P. G.; MARQUES, P. A. A.; PACHECO, A. C. Teor e rendimento de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 435-441, 2009.

BOSCARATO, A. G. *et al.* Utilização de creme de extrato de calêndula em ferida lacerante em equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 48, n. 1, p. 6, 2020.

BOSSOU, A. D. *et al.* Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against *Anopheles gambiae*. **Parasites & Vectors**, v. 6, n.1, p. 1-17, 2013.

CANTOR, M. *et al.* The influence of distillation time and the flowering phenophase on quantity and quality of the essential oil of *Lavandula angustifolia* cv. 'Codreanca'. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 23, n. 6, p. 14146- 14152, 2018.

- CARDIA, G. F. E. *et al.* Effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil on acute inflammatory response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, n. 1, p. 1-10, 2018.
- CASSU, R. N. *et al.* Effect of the *Matricaria chamomilla* CH12 in stress response in dogs. **Colloquium Agrariae**, v. 7, n. 2, p. 01-07, 2011.
- CERQUEIRA, M. D. *et al.* Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.
- CITADINI-ZANETTE, V.; NEGRELLE, R. R. B.; BORBA, E. T. *Calendula officinalis* L.: aspectos botânicos, ecológicos e usos. **Visão Acadêmica**, v. 13, n. 1, p. 6-23, 2012.
- COQUEIRO, D. P. *et al.* Efeitos do chá de orégano (*Origanum vulgare*) no perfil bioquímico de ratos Wistar. **Scientia Medica**, v. 22, n. 4, p. 191-196, 2012.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.
- DELEITO, C. S.; BORJA, G. E. M. Nim (*Azadirachta indica*): uma alternativa no controle de moscas na pecuária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 293-298, 2008.
- ÉVORA, L. N. P. Atividades biológicas e citotoxicidade do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar) - Programa de Pós-Graduação em Segurança Alimentar, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2015.
- FATHIFAR, E. *et al.* Histopathological and biochemical toxicity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil in female mice. **Research Journal of Pharmacognosy**, v. 8, n. 1, p. 53-62, 2021.
- FERGUSON, C. E.; KLEINMAN, H. F.; BROWNING, J. Effect of lavender aromatherapy on acute-stressed horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 1, p. 67-69, 2013.
- FERNANDES, J. I. *et al.* Eficácia acaricida de uma emulsão contendo 10% de óleo de nim (*Azadirachta indica*) no controle de *Psoroptes ovis* em coelhos naturalmente infestados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1253-1256, 2012.
- FERNANDES, J. I. *et al.* Eficácia do nim (*Azadirachta indica*) no controle de *Otodectes cynotis* em cães. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 32, p. 55-58, 2010.
- FERREIRA, S. H. *et al.* **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998. 132 p.
- FREITAS, V. S.; RODRIGUES, R. A. F.; GASPI, F. O. G. Propriedades farmacológicas da Aloe vera (L.) Burm. f. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 299-307, 2014.

GEORGE, D. R. *et al.* Lack of prolonged activity of lavender essential oils as acaricides against the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) under laboratory conditions. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n.3, p. 540-542, 2008.

GHEDIRA, K.; GOETZ, P.; LE JEUNE, R. *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae): giroflor. **Phytotherapie**, v. 8, n. 1, p. 37-43. 2010.

GUIMARÃES, L. *et al.* Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011.

HAMMAN, J. Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1599-1616, 2008.

HASHIM, G. M. *et al.* Biological activity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 7, p. 1458-1464, 2017.

HEIMERDINGER, A. *et al.* Extrato alcoólico de capim-cidreira no controle do *Boophilus microplus* em bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 37-39, 2006.

KAMR, A. *et al.* The therapeutic efficacy of *Aloe vera* gel ointment on staphylococcal pyoderma in dogs. **Veterinary World**, v. 13, n. 11, p. 2371-2380, 2020.

LIM, T. K. *Matricaria chamomilla*. In: _____. **Edible medicinal and non-medicinal plants**. 7. ed. Dordrecht: Springer, 2014. p. 397-431.

LOPES, S. Z. B. **Influência do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon spp*) na repelência e mortalidade de *Sitophilus zeamais* mots.** 2019. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Agronomia) - Agroecologia, Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2019.

MARCHIORI, V. F. ***Rosmarinus officinalis***. 2004. 35 f. Monografia (Curso Fitomedicina) - Fundação Herbarium, Associação Argentina de Fitomedicina, Buenos Aires, 2004.

MARQUES, L. C.; SOUZA, C. M. Pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos: relatos de experiência em indústria farmacêutica nacional. **Revista Fitos**, v. 7, n. 1, p. 50-66, 2012.

MARTINEZ, S. S. **O nim, *Azadiractha indica*: natureza, usos múltiplos, produção.** Londrina: Iapar. 2002. 142p.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 231-238, 2003.

MIGUEL, R. F. **Eficiência de métodos não convencionais para o controle do ácaro vermelho *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) (Mesostigmata: Dermanyssidae).** 2019.45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas)- Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Santa Helena, 2019.

- MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). **Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 79-83, 2000.
- MOSSINI, S. A.; KEMMELMEIER, C. A árvore nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 139-148, 2005.
- MUSHTAQ, S. *et al.* Bovine mastitis: an appraisal of its alternative herbal cure. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p. 357-361, 2018.
- NADA, A. M. *et al.* Clinical and histopathological evaluation of the effectiveness of lavender oil compared with black seed oil, *ostrich oil* and cod liver oil on the second intention wound healing in dogs. **Alexandria Journal for Veterinary Sciences**, v. 46, n. 1, p. 57-65, 2015.
- NASCIMENTO, G. M. *et al.* Estudo do uso de plantas medicinais na medicina veterinária em plataformas virtuais. **Pubvet**, v. 15, n. 4, p. 1-13, 2021.
- NEGRELLE, R. R. B.; GOMES, E. C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 1, p. 80-92, 2007.
- OETTING, L. L. *et al.* Efeitos de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1389-1397, 2006.
- OLIVO, C. J. *et al.* Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 406-410, 2008.
- OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 2, p. 3249-3254, 2004.
- ORYAN, A. *et al.* Topical application of *Aloe vera* accelerated wound healing, modeling, and remodeling. **Annals of Plastic Surgery**, v. 77, n. 1, p. 37-46, 2016.
- OZAKI, A. T.; DUARTE, P. C. Fitoterápicos utilizados na medicina veterinária, em cães e gatos. **Infarma**, v. 18, n. 11/12, p. 17-25, 2006.
- PEREIRA, R. B. **Potencial de óleos essenciais no manejo da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro**. 2008.119 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras- Lavras, 2008.
- PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n.1, p. 45-61, 2002.
- PINTO, D. A. *et al.* Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 1, p. 54-61, 2014.

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

PORTE, A.; GODOY, R. L. de. O Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.

POUTARAUD, A. *et al.* Lavender essential oil decreases stress response of horses. **Environmental Chemistry Letters**, v. 16, p. 539-544, 2018.

POWO. Plants of the world online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <<http://www.plantsoftheworldonline.org/>> Acesso em: 08 out. 2021.

PRUSINOWSKA, R.; ŚMIGIELSKI, K. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.). A review. **Herba Polonica**, v. 60, n. 2, p.56-66, 2014.

RADHA, M. H.; LAXMIPRIYA, N. P. Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of *Aloe vera*: a systematic review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, n. 1, p. 21-26, 2015.

RAINA, V. K. *et al.* Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, n. 5, p. 334-336, 2001.

RAJENDIRAN, A.; NATARAJAN, E.; SUBRAMANIAN, P. Control of *Aeromonas hydrophila* infection in spotted snakehead, *Channa punctatus*, by *Solanum nigrum* L., a medicinal plant. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39, n. 3, p. 375-383, 2008.

RAPPER, S. de. *et al.* The *in vitro* antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n.1, p. 1-10, 2013.

RIBEIRO, P. A. P. *et al.* Efeito anestésico do eugenol em juvenis de pacamã. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 1136-1139, 2013.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3^a ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. 236p.

SAEIDI, M.; MOHARRAMIPOUR, S. Insecticidal and repellent activities of *Artemisia khorassanica*, *Rosmarinus officinalis* and *Mentha longifolia* essential oils on *Tribolium confusum*. **Journal of Crop Protection**, v. 2, n. 1, p. 23-31, 2013.

SANTIN, R. *et al.* Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 367-373, 2014.

SANTOS, D. S. dos. *et al.* Phytomedicines containing Matricaria species for the treatment of skin diseases: a biotechnological approach. **Fitoterapia**, v. 138, n. 1, p. 1-38, 2019.

OUROFINO. Ourofino saúde animal. Disponível em: <<https://www.ourofinosaudeanimal.com/>>. Acesso em: 03 jul. 2021.

SCHERER, R. *et al.* Composition and antioxidant and antimicrobial activities of clove, citronella and palmarosa essential oils. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SILVA, L. P.; RECK, R. T.; FONSECA, F. N. Desenvolvimento de formas farmacêuticas semissólidas a partir de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Saúde e Meio Ambiente**, v. 5, n. 2, p. 82-92, 2016.

SILVA, R. L. **Bactérias do gênero *Aeromonas* e indicadores de qualidade da água em pisciculturas da Região da Baixada Ocidental Maranhense**. 2010.75 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Jaboticabal, 2010.

SMIGIELSKI, K. *et al.* Biological properties and chemical composition of essential oils from flowers and aerial parts of lavender (*Lavandula angustifolia*). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 5, p. 1303-1314, 2018.

SINGH, O. *et al.* Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview. **Pharmacognosy Reviews**, v. 5, n. 9, p. 82-95, 2011.

SOUSA, C. A. *et al.* O uso de óleos essenciais no tratamento da malassezíase de cães e gatos: revisão. **Pubvet**, v. 15, n. 2, p. 162, 2021.

TALAEI, M. G.; MOUSAVI, Z.; JAHANDIDEH, M. Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil in animal models. **Research Journal of Pharmacognosy**, v. 6, n. 3, p. 61-68, 2019.

VIDAL, L. V. O. *et al.* Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 8, p. 1069-1074, 2008.

WALLER, S. B. *et al.* Effects of essential oils of *Rosmarinus officinalis* Linn. and *Origanum vulgare* Linn. from different origins on *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* complex. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 4, p. 991-999, 2016.

YAGI, S. *et al.* Chemical composition, antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from aromatic plants growing in Sudan. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 8, p. 763-770, 2016. 763-770.

Capítulo 16

Fenóis naturais como alternativa no controle parasitário



Natânia do Carmo Sperandio¹
Natália Assis Guedes²
Bianca de Oliveira Botelho³
Adilson Vidal Costa⁴
Vagner Tebaldi de Queiroz⁵
Isabella Vilhena Freire Martins⁶

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: natania.sperandio@ufes.com

² Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: nataliaassisg@hotmail.com

³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: biancabotelho93@hotmail.com

⁴ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: avcosta@hotmail.com

⁵ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: vagnertq@gmail.com

⁶ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: isabella.martins@ufes.br

1 INTRODUÇÃO

O tratamento de doenças parasitárias é frequentemente realizado com fármacos tradicionais, nos quais os mesmos ingredientes ativos vêm sendo utilizados ao longo dos anos. Entretanto, vários fatores, incluindo o surgimento de parasitos resistentes a antiparasitários, foram incentivando a busca por alternativas para esse controle (AL-SNAFI, 2016).

O Brasil em sua grande diversidade, climática e geográfica, permite abrigar uma enorme variedade de plantas e essas podem e devem ser exploradas em seu potencial visando o controle de agentes causadores e transmissores de doenças. Essas plantas produzem óleos essenciais (OEs) que são misturas de compostos odoríferos e voláteis, oriundos do metabolismo secundário, sendo essas conhecidas por suas atividades em diversos microrganismos como bactérias, fungos, vírus (AZEREDO; SOARES, 2013). Sua ação também foi comprovada em protozoários (MONZOTE; ALARCÓN; SETZER, 2012), helmintos (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006), ectoparasitos e vetores de doenças (URZÚA *et al.*, 2010). Assim, diante da diversidade de espécies de plantas encontradas no Brasil, da versatilidade de utilização, do fato de que os OEs são ambientalmente seguros e ativos contra uma grande variedade de microrganismos, esses tornam uma alternativa para o controle químico de parasitos (KUMRUNGSEE *et al.*, 2014)

O objetivo deste capítulo foi relatar o efeito de fenóis naturais, obtidos de óleos essenciais, como alternativa no controle parasitário e relatar estudos realizados com uso desses metabólitos em parasitos de importância na medicina veterinária.

2 ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas produzem uma grande variedade de metabólitos. Os que estão envolvidos nos processos vitais como crescimento e desenvolvimento são provenientes do metabolismo primário, um exemplo são os ácidos graxos, açúcares, aminoácidos, lipídeos e nucleotídeos (TAIZ *et al.*, 2017). Em geral, os metabólitos secundários não apresentam ação conhecida nos processos de assimilação de nutrientes, fotossíntese, respiração, transporte de solutos, síntese de carboidratos, lipídeos e proteínas (TAIZ; ZEIGER, 2004). Entretanto, muitos produtos derivados do metabolismo secundário, exercem funções importantes como alelopatia, proteção contra o ataque de patógenos e herbivoria, atração de polinizadores e dispersores de sementes. Além disso, apresentam também ação protetora contra estresses abióticos como limitação de

água, níveis de luz, exposição à UV, mudanças de temperatura e deficiências de nutrientes minerais (AUSTEN *et al.*, 2019; WOLFFENBUTTEL, 2011).

Um exemplo de substâncias provenientes do metabolismo secundário dos vegetais são os OEs. Estes apresentam composição química variada e podem conter, em diferentes concentrações, álcoois, aldeídos, ácidos orgânicos, cetonas, ésteres, fenóis e hidrocarbonetos terpênicos (McMURRY, 2011). A ocorrência de OE é bastante difundida nas famílias Asteraceae, Lamiaceae, Apiaceae, Fabaceae, Myrtaceae, Rutaceae, Zingiberaceae, Pinaceae, Piperaceae e Burseaceae (BHATTACHARYA, 2016), podendo ser encontrados nas folhas, flores, caules, cascas, frutas, sementes, raízes ou rizomas (RÍOS, 2016).

Os OEs podem ser obtidos por diferentes técnicas de extração como, por exemplo, prensagem a frio, extração por solvente, método “Enfleurage”, destilação a vapor, extração de fluido supercrítico e extração assistida por microondas ou ultrassom. Atualmente, a técnica de destilação a vapor é a mais empregada para extração de OEs, nesse método o material vegetal é colocado em contato com água fervente ou vapor e OE é liberado do interior da planta por meio da evaporação (STRATAKOS; KOIDIS, 2016).

Para identificar e quantificar os compostos químicos presentes nos OEs, normalmente, é utilizada cromatografia gasosa (CG) acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) e detector de ionização de chama (CG-DIC). A CG é muito utilizada devido à sua eficiência, simplicidade e rapidez, tanto para a identificação quanto para a quantificação (CHAMORRO *et al.*, 2012).

Muitos compostos fenólicos são constituintes voláteis das plantas e estão presentes nos OEs de algumas espécies de plantas, entre eles, o eugenol, timol e carvacrol. Os fenóis naturais representam uma classe com alto potencial a ser explorado. A funcionalidade da hidroxila nos anéis aromáticos e os grupos laterais presentes nesses compostos de origem natural podem ser adaptados para produzir novas estruturas químicas com importantes atividades biológicas (LOCHAB; SHUKLA; VARMA, 2014).

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é o principal composto identificado nos OEs de *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia) (KALAISELVI *et al.*, 2019), *Cinnamomum verum* J. (canela) (FARIAS *et al.*, 2020), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca) (MELO *et al.*, 2019). Possui fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$ e seu peso molecular é $164,20 \text{ g mol}^{-1}$, é volátil e ligeiramente solúvel em água. Este composto pertence à classe dos fenilpropanóides que é caracterizada pela presença do grupo fenila (anel aromático) com seis átomos de carbono e uma cadeia lateral de três átomos carbonos (grupo propila) (DENG; LU, 2017) como pode ser observado na Figura 1.

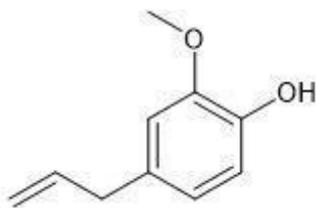


Figura 1 – Estrutura química do eugenol.

Fonte: Os autores

O timol (2-isopropil-5-metilfenol) e o carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) são isômeros constitucionais que podem ser encontrados nos OEs de *Origanum vulgare* L. (orégano) (MANCINI *et al.*, 2014) e *Thymus vulgaris* (tomilho) (LISI *et al.*, 2011). Ambos os compostos, são biossintetizados através da aromatização do γ -terpineno formando o *p*-cimeno e este, por sua vez, é hidroxilado dando origem aos isômeros (NOSTRO; PAPALIA, 2012). Estruturalmente, o timol e o carvacrol são muito semelhantes, como pode ser observado na Figura 2, diferindo apenas na posição do grupo hidroxila no anel fenólico.

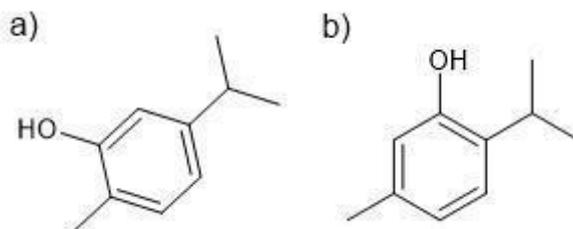


Figura 2 – Estrutura química do: a) carvacrol e b) timol.

Fonte: Os autores

Ambos possuem a fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$ e peso molecular de $150,22 \text{ g mol}^{-1}$. Porém, em temperatura ambiente, o carvacrol encontra-se na forma líquida e o timol apresenta-se na forma de cristais brancos (NIST, 2021). É importante destacar a importância dos compostos fenólicos presentes em OEs para a medicina veterinária, uma vez que esses compostos apresentam grande potencial para serem utilizados como agentes antiparasitários (ANTWI *et al.*, 2019)

3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FENÓIS NATURAIS EM PARASITOS E VETORES

3.1 ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA

A infecção por protozoários ocorre como resultado de uma interação complexa entre patógenos, vetores, hospedeiros vertebrados e o ambiente (WENY *et al.*, 2017). Elas constituem

uma das causas mais importantes de mortalidade e morbidade em seres humanos em grande parte do mundo, sendo responsáveis por pelo menos um milhão de mortes anualmente (CDC, 2016) e são apontados como a segunda causa etiológica mais frequente de mortalidade em menores de cinco anos no mundo todo. Globalmente, eles são responsáveis por 1,7 bilhão de casos de diarreia, o que leva a 842.000 mortes por ano (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017). Além disso, a maioria das doenças parasitárias causadas por protozoários são zoonóticas (KRAUSS *et al.*, 2003) e representam uma importante parcela entre as causas de perdas econômicas em animais de produção (WALTERS; TEMESVARI, 2021).

Doenças protozoárias como amebíase, giardíase, tricomoniase, leishmaniose e tripanossomíase, constituem um dos principais problemas de saúde pública em países da América Latina (PÉREZ *et al.*, 2012). Babesiose, leishmaniose eimeriose, criptosporidiose, neosporose, tripanossomose, erliquiose, hepatozoonose e toxoplasmose estão entre as doenças parasitárias que causam significativa ameaça à saúde dos animais domésticos (AUBERT; FAVENNEC, 2017; THEKISOE, 2020).

O tratamento dessas doenças é dificultado pela capacidade dos parasitos de formar cistos ou oocistos latentes, desenvolver mecanismos para alterar a expressão de genes do hospedeiro e desenvolver resistência aos medicamentos (WALTERS; TEMESVARI, 2021). Além desses problemas relacionados ao parasito. Os medicamentos usados atualmente para tratar essas doenças têm efeitos colaterais graves, portanto a descoberta de novos agentes antiprotozoários de alta eficácia e baixa toxicidade é necessária (PÉREZ *et al.*, 2012).

Os OEs e seus constituintes podem ser agentes antiprotozoários promissores, permitindo o desenvolvimento de fármacos de origem vegetal mais eficazes para o tratamento das doenças causadas por esses agentes. Os principais constituintes dos OEs com atividade antiprotozoária são monoterpênóides (linalol, terpinen 4-ol, timol, carvacrol, citral, limoneno, α -pineno, γ -terpineno, α -felandreno e p-cimeno), sesquiterpenos (β -cariofileno, nerolidol, α -copaeno, cipereno e germacreno D) e fenilpropanóides (eugenol, metil chavicol e cinamaldeído), que são responsáveis por seus efeitos biológicos (MONZOTE; ALARCÓN; SETZER, 2012).

De acordo com Santoro *et al.* (2007), o timol possui atividade tripanocida contra o *Trypanosoma cruzi*, produzindo a lise de epimastigotas e tripomastigotas. Além disso, o composto apresentou resultados semelhantes aos obtidos *in vitro* com o tratamento com a molécula de referência (benzinidazol). Borges *et al.* (2012) e Juan, Olga e Mirian (2015) também relataram a atividade tripanocida do timol *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

O eugenol também apresenta atividade inibitória contra epimastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e possui baixa citotoxicidade para macrófagos (TELES *et al.*, 2021).

Azeredo e Soares (2013) analisaram o efeito da combinação de citral, eugenol e timol sobre *T. cruzi* e observaram um efeito sinérgico na atividade inibitória de crescimento dos tripanossomatídeos.

Mahmoudvand *et al.* (2017) demonstraram em testes com camundongos que o óleo essencial de *Satureja khuzestanica*, também conhecida como segurelha, que contém entre seus principais constituintes o carvacol, timol, p-cimeno, β -cariofileno e linalol possui atividade contra o parasito *Toxoplasma gondii*. Oliveira *et al.* (2016) também descrevem o timol como um bom agente anti-*Toxoplasma in vivo* e destacam seu uso seguro em animais.

Youssefi *et al.* (2019) avaliaram a atividade leishmanicida do carvacrol, timol e linalol em promastigotas de *Leishmania infantum* e em hamsters infectados. O linalol não apresentou atividade em nenhuma das concentrações testadas, o timol e carvacrol apresentaram atividade leishmanicida, no entanto o timol teve um efeito inibitório mais forte sobre o crescimento *in vitro* e *in vivo* dos parasitos em comparação com o carvacrol. De acordo com os autores, ambos são candidatos promissores para o desenvolvimento de drogas eficazes e de baixa toxicidade que podem ser usadas sozinhas ou em associação a outras drogas contra leishmaniose visceral.

Silva *et al.* (2017) e Xavier *et al.* (2016) confirmaram que o timol tem atividade anti *Leishmania* em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Tasdemir *et al.* (2019), relataram que o timol teve um efeito leishmanicida *in vitro* maior do que o carvacrol em *Leishmania donovani*. Em um estudo comparativo, o OE de *Satureja bakhtiarica* contendo timol e p-cimeno teve maior atividade contra promastigotas de *Leishmania major* do que o glucantime (fármaco de referência para controle de leishmaniose) (MOHAMMADPOUR; MARZONY; FARAHMAND, 2012).

Ueda-Nakamura *et al.* (2006) observaram a atividade leishmanicida do OE de *O. gratissimum* e componente majoritário o eugenol, o óleo inibiu o crescimento de promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Também houve redução dos índices de associação entre promastigotas e macrófagos, seguido por um aumento da produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos infectados após o tratamento com o OE.

Dominguez-Uscanga *et al.* (2021) avaliaram os efeitos do timol e de um éster de timol, octanoato de timol, contra *Cryptosporidium parvum in vitro*. Os resultados indicaram que a esterificação reduziu significativamente a citotoxicidade do timol, o que significa que ele poderia ser utilizado com maior segurança em células de mamíferos, tornando-se mais adequado para diversas aplicações como agente antiparasitário.

Gaur *et al.* (2018) examinaram o efeito do OE de orégano e carvacrol (seu componente majoritário) na inibição da infectividade de *C. parvum in vitro*. Os compostos reduziram a

infecciosidade relativa de *C. parvum* de maneira dose dependente, portanto são potenciais bioativos para inibir a infecção por *C. parvum*.

Greathead e Kamel (2006) investigaram o impacto da suplementação de timol e carvacrol em frangos de corte. Aves com 28 dias de idade foram infectadas experimentalmente com oocistos esporulados do coccidio *Eimeria acervulina*. Concluiu-se que a suplementação com esses compostos para aves infectadas aumentou a integridade intestinal, reduzindo as lesões causadas pela coccidiose. Da mesma forma, o estudo de Teichmann *et al.* (2012) mostraram a eficácia do timol no alívio dos sintomas da coccidiose causada por *Eimeria spp.* quando o timol foi adicionado à dieta ou adicionado ao anticoccidiano lasalocida.

3.2 ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA

Os helmintos constituem um grupo vasto de exemplares, podendo ser de vida livre ou parasitos de plantas e animais. Dentre os helmintos que parasitam animais estão os cestodas, os trematodas e os nematodas, sendo estes responsáveis por diversas doenças, com perdas econômicas estimadas em bilhões de dólares em animais de produção (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006).

O controle de helmintos tem se baseado principalmente no uso frequente de medicamentos anti-helmínticos comerciais. No entanto, a emergência de resistência aos medicamentos levou à investigação em abordagens alternativas, incluindo fitoterapia e plantas contendo compostos secundários (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006).

Neste contexto, André *et al.* (2017), avaliaram o efeito do timol e acetato de timolila (AT) sobre ovos, larvas e adultos de *Haemonchus contortus*, e obtiveram os seguintes resultados: no teste de inibição da eclosão de ovos, timol e AT inibiram a eclosão das larvas em 98% e 67,1%, respectivamente. Quanto ao desenvolvimento larval timol e AT inibiram 100%. A respeito da redução de motilidade dos nematóides adultos, timol e AT levaram a 100% e 83,4%, respectivamente. No teste de toxicidade aguda, a DL₅₀ do timol e AT foi de 1.350,9 mg kg⁻¹ e 4.144,4 mg kg⁻¹, respectivamente. Timol e AT reduziram a contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) dos ovinos em 59,8% e 76,2%, respectivamente.

Ainda sobre o timol, Ferreira *et al.* (2016) analisaram o potencial do OE de *T. vulgaris* e o componente majoritário, timol, responsável por 50,22% da composição do óleo, em *H. contortus*. E de fato, o óleo e o timol foram capazes de inibir a eclosão de ovos em 96,4 - 100%, o desenvolvimento larval em 90,8 - 100%, e a motilidade larval em 97 - 100%. Semelhante ao

controle positivo (levamisole), o óleo e o timol inibiram completamente a motilidade dos adultos *H. contortus* nas primeiras 8 horas do experimento.

Outros produtos naturais, terpenóides, foram encontrados por possuir atividade nematocida. Terpinen-4-ol, comumente isolado de coníferas e *Melaleuca alternifolia*, árvore de chá, conhecida por sua modesta atividade antimicrobiana, também demonstrou atividade contra *H. contortus* (GRANDO *et al.*, 2016).

O ácido cinâmico é um intermediário na biossíntese de outros compostos fenólicos naturais, como cumaratos, flavonóides e tanino (GARCIA-BUSTOS; SLEEBES; GASSER, 2019). *Acacia cochliacantha*, conhecida como acácia- amarela, contém uma alta porcentagem de ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido p-cumárico, e seus respectivos ésteres. As frações contendo estes derivados semelhantes ao ácido cinâmico ativos foram testados em ovos de *H. contortus*. Todos compostos testados exibiram uma inibição da eclosão dos ovos de 71-98%. De acordo com um estudo de campo realizado anteriormente, descobriram que cabras alimentadas com folha de *A. cochliacantha* excretavam menos ovos de *H. contortus* do que aquelas com uma alimentação diferente, sugerindo assim, após resultados laboratoriais, que a redução na contagem de ovos foi devida à presença de derivados do ácido cinâmico nesta planta (CASTILLO-MITRE *et al.*, 2017).

Nogueira *et al.* (2012) avaliaram três porções da *Musa* spp., a banana, sendo folha, pseudocaule e coração, *in vivo* e *in vitro*, sobre as larvas e os ovos de *H. contortus*. Concluíram que os resultados *in vitro* revelaram alta eficácia na inibição da eclosão dos ovos e os testes *in vivo* indicaram que a folha tem moderada atividade anti-helmíntica. A análise fitoquímica revelou que as três porções contêm flavonóides, saponinas, catequinas, taninos condensados e gálicos. A atividade anti-helmíntica pode estar relacionada aos fenóis componentes, especificamente os taninos condensados. Na literatura científica, existem outros relatos da diminuição da contagem média de ovos em ovelhas tratadas com plantas ricas em taninos condensados (LANGE *et al.*, 2006; NERY *et al.*, 2010).

Outros trabalhos buscaram avaliar propriedades anti-helmínticas dos OE para diferentes parasitos. Romero *et al.* (2012) analisaram o potencial de *Matricaria chamomilla*, conhecida popularmente como camomila, sobre *Anisakis simplex* e foi eficaz em 100% na mortalidade, após 7 e 14 horas de tratamento, respectivamente. Os principais componentes de *M. chamomilla* foram: timol (50%), linalol (7%), carvacrol (3%).

Os fenóis naturais, carvacrol e timol também foram avaliados quanto a eficácia contra o ascarídeo de suínos, *Ascaris suum*, *in vitro*. Ambos os compostos resultaram 80% de mortalidade em *A. suum* após o tratamento por 24 horas (LEI; LESER; ENAN, 2010).

Vieira (2017) avaliou a ação *in vitro* dos OEs de *S. aromaticum*, *C. verum*, *T. vulgari*, *O. vulgare* L. e dos componentes eugenol, carvacrol e timol sobre *Fasciola hepatica* e concluiu que os OE de *O. vulgare* L., *T. vulgaris* e os componentes carvacrol e timol apresentaram melhores efeitos em menor tempo em concentração. Os OEs de *O. vulgare* e *T. vulgaris*, assim como os componentes carvacrol e timol produziram danos severos em concentrações menores, indicando maior ação sobre a superfície tegumentar de *F. hepatica* quando em comparação com os demais tratamentos.

Ainda sobre a classe trematoda, Moraes *et al.* (2013) avaliaram o efeito *in vitro* de acetato de carvacril, um derivado do carvacrol, em adultos de *Schistosoma mansoni*. Dos resultados, o acetato carvacril mostrou atividade contra esse trematoda, afetando a motilidade e viabilidade do parasito. Além disso, imagens de microscopia de varredura revelaram alterações na morfologia da superfície tegumental, onde alguns tubérculos apresentavam-se inchados com pequenas bolhas emergindo do tegumento em torno dos tubérculos. Além disso, experimentos realizados com acetato de carvacril em concentrações sub letais mostraram um efeito inibitório na produção diária de ovos dos adultos.

3.3 ATIVIDADE ECTOPARASITICIDA E EM VETORES

Nos últimos anos, o uso de OEs de plantas aromáticas como inseticidas de baixo risco, reguladores de crescimento de artrópodes, inibidores de oviposição e repelentes tem aumentado. Em alguns cenários, devido a não eficácia dos produtos químicos sintéticos e/ou baixa especificidade, mas também devido à sua popularidade entre os agricultores orgânicos e consumidores ambientalmente conscientes (URZÚA *et al.*, 2010).

As constantes pesquisas, na busca por otimizar essa alternativa de controle, atualmente é crescente os trabalhos científicos com o uso de nanoemulsões como portadores adequados de OEs ativos, atraídos pelas características de fácil preparação, composição simples, baixo custo de produção, maior estabilidade termodinâmica e a possibilidade de produção em escala industrial (CAMPOS; RICCI-JÚNIOR; MANSUR, 2012; TROMMER; NEUBERT, 2006).

A descoberta de produtos capazes de inibir o seu desenvolvimento, que são menos prejudiciais ao meio ambiente, teriam um grande impacto no controle ao vetor (URZÚA *et al.*, 2010). Carvalho *et al.* (2019) avaliaram substâncias da castanha de *Anacardium occidentale*, o cajueiro: o ácido anacárdico, o cardanol e o cardol foram isolados e avaliados quanto à atividade larvicida e pupicida contra *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. As atividades do fenol, resorcinol, ácido salicílico e pentadecano, produtos químicos comerciais semelhantes em

estrutura aos derivados de casca de noz, também foram avaliados. Todas as frações extraídas do óleo exerceram efeitos larvicidas contra ambas as espécies de mosquitos, e dois dos acima mencionados (ácido anacárdico e o cardol) foram eficazes contra pupas.

Ghosh *et al.* (2013) demonstraram a atividade do OE nanoemulsionado de *Ocimum basilicum* L., o manjericão, contra larvas de terceiro instar do *A. aegypti*. A composição do EO mostrou ser 88% de metil chavicol (estragol), um fenilpropanóide com propriedade inseticida.

Em 2015, pesquisadores desenvolveram uma nanoemulsão com *Rosmarinus officinalis*, alecrim, OE como ativo constituinte contra larvas de 4º estágio de *A. aegypti*. A taxa de mortalidade foi avaliada após 24 horas e 48 horas de contato com a nanoemulsão, o que induziu 80 e 90% de mortalidade, respectivamente. 1,8-cineol foi o principal constituinte deste OE e mostrou potente atividade larvicida (DUARTE *et al.*, 2015). Em 2017, Ramar *et al.* (2017) avaliaram o efeito de diferentes nanoformulações de OE de *Ocimum sanctum*, o manjericão-real, em espécies adultas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* e obtiveram 98% (*A. aegypti*) e 100% (*C. quinquefasciatus*) de mortalidade.

A composição do OE obtido de folhas frescas de *Haplopappus foliosus*, espécie natural do Chile, conhecida como chifre de cabra, foram analisadas quanto à atividade inseticida contra *Musca domestica*, por Urzúa *et al.* (2010) e este se mostrou eficaz. De acordo com a análise, limoneno (28%); epi-bicyclosquiphellandrene (9,84%); acetato de bornyl (7,74%); 4-terpineol (6,36%); p-cimênio (6%); agarospirol (5,53%); α -muurolene (4,34%); δ -cadineno (3,98%) e cariofilina (3,97%) foram os principais componentes do *H. foliosus*.

Estudos realizados por Souza (2012), com o óleo de *Lippia sidoides*, o alecrim-pimenta, revelou uma eficácia de 100% *in vitro*, sobre a forma adulta de *Ctenophalides felis felis*. O mesmo resultado foi obtido nos testes *in vivo*, na formulação de xampu a 5%, no número de parasitos adultos.

Neste sentido, Batista *et al.* (2013), avaliaram a atividade de *R. officinalis* L. frente aos ectoparasitas *C. f. felis*, *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*. A análise fitoquímica revelou a presença de terpenos, flavonoides, taninos condensados e saponinas, como componentes. Os resultados mostraram que *R. officinalis* L. apresentou atividade *in vitro* de eficácia de 95% para *C. f. felis*; 45,33 % para *R. sanguineus* e 28,50% para *R. microplus*.

Costa-Júnior *et al.* (2016) conduziram um estudo com duas populações de *R. microplus*, uma suscetível e outras resistentes a organofosforados, e observaram que o carvacrol, composto encontrado no OE de *Lippia* spp. foi 3,2 vezes mais tóxico para a cepa resistente.

Sobre o composto (E)-cinnamaldeído, Senra *et al.* (2013a) em estudos mostraram que obteve taxas de mortalidade de 99,2; 98,5 e 100% foram alcançadas para larvas não alimentadas

de *R. microplus*, *Dermacentor nitens* e *R. sanguineus* (SENRA *et al.*, 2013b), respectivamente. Resultados satisfatórios também foram encontrados por Novato *et al.* (2015) de (E)-cinnamaldeído sob larvas não alimentadas de *Amblyomma sculptum* e *D. nitens*. Um comum ponto observado é que esses compostos são capazes de alterar a integridade da parede celular e membrana citoplasmática de fungos, bactérias e carrapatos, resultando em lise celular (TURGIS *et al.*, 2009).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações apresentadas destacam o potencial promissor dos fenóis naturais como agentes antiparasitários. Estas informações estimulam o desenvolvimento de trabalhos de pesquisas direcionados para novas alternativas terapêuticas e abrindo perspectivas à descoberta de novos fármacos alternativos para tratamento de doenças causadas e transmitidas por parasitos de relevância para a Medicina Veterinária. No entanto, testes em modelos *in vivo* para confirmar o potencial terapêutico e avaliações mais complexas de toxicidade devem ser realizados.

5 REFERÊNCIAS

- AL-SNAFI, A. E. Antiparasitic effects of medicinal plants (part 1) - a review. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 6, n. 10, p. 51-66, 2016.
- ANDRÉ, W. P. P. *et al.* Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 3, p. 323-330, 2017.
- ANTWI, C. A. *et al.* In vitro activity and mode of action of phenolic compounds on *Leishmania donovani*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007206, 2019.
- AUBERT, D.; FAVENNEC, L. *Eimeria* and *Cryptosporidium*: recent advances in the therapeutic field. In: MAYERS, D. L. *et al.* **Antimicrobial drug resistance**. Cham: Springer, 2017. p. 685-688.
- AUSTEN, N. *et al.* The regulation of plant secondary metabolism in response to abiotic stress: interactions between heat shock and elevated CO₂. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 1463, p. 1-12, 2019.
- AZEREDO, C. M. O.; SOARES, M. J. Combination of the essential oil constituents citral, eugenol and thymol enhance their inhibitory effect on *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi* growth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 5, p. 762-768, 2013.

- BATISTA, L. C. S. O. *et al.* *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae): atividade *in vitro* frente a ectoparasitos de importância veterinária. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, n. 2, p. 119-125, 2013.
- BHATTACHARYA, S. Cultivation of essential oils. In: PREEDY, V. R. **Essential oils in food preservation**. London: Academic Press, 2016. p. 19–29.
- BORGES, A. R. *et al.* Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 123-128, 2012.
- CAMPOS, V. E. B. de; RICCI-JÚNIOR, E.; MANSUR, C. R. E. Nanoemulsions as delivery systems for lipophilic drugs. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.12, n.3, p. 2881–2890, 2012.
- CARVALHO, G. H. F. *et al.* Larvicidal and pupicidal activities of eco-friendly phenolic lipid products from *Anacardium occidentale* nutshell against arbovirus vectors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 6, p. 5514–5523, 2019.
- CASTILLO-MITRE, G. F. *et al.* Caffeoyl and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 204, n. 5, p. 125–131, 2017.
- CDC (Center For Disease Control and Prevention). U.S. Department of Health & Human Services. **About parasites**. 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/about.html>>. Acesso em: 15 de jun. 2021.
- CHAMORRO, E. R. *et al.* Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography. In: SALIH, B. **Gas Chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications**. London: IntechOpen, 2012. p. 307–324.
- COSTA-JÚNIOR, L. M. *et al.* Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 228, n. 7, p. 60–64, 2016.
- DENG, Y.; LU, S. Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 36, n. 4, p. 257–290, 2017.
- DOMINGUEZ-USCANGA, A. *et al.* Anti-protozoal activity of thymol and a thymol ester against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 15, n. 4, p. 126-133, 2021.
- DUARTE, J. L. *et al.* Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 189-192, 2015.
- EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J. E.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks—an update 2011-2016. **Water research**, v. 114, n. 5, p. 14–22, 2017.

FARIAS, A. P. P. *et al.* Chemical composition and biological activities of two chemotype-oils from *Cinnamomum verum* J. Presl growing in North Brazil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 9, p. 3176-3183, 2020.

FERREIRA, L. E. *et al.* *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 228, n. 7, p. 70-76, 2016.

GARCIA-BUSTOS, J. F.; SLEEBBS, B. E.; GASSER, R. B. An appraisal of natural products active against parasitic nematodes of animals. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-22, 2019.

GAUR, S. *et al.* Effect of oregano essential oil and carvacrol on *Cryptosporidium parvum* infectivity in HCT-8 cells. **Parasitology International**, v. 67, n. 2, p. 170-175, 2018.

GHOSH, V. *et al.* Cinnamon oil nanoemulsion formulation by ultrasonic emulsification: investigation of its bactericidal activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 13, n. 1, p. 114-122, 2013.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 308-320, 2006.

GRANDO, T. H. *et al.* *In vitro* activity of essential oils of free and nanostructured *Melaleuca alternifolia* and of terpinen-4-ol on eggs and larvae of *Haemonchus contortus*. **Journal of Helminthology**, v. 90, n. 3, p. 377-382, 2016.

GREATHEAD, H.; KAMEL, C. Encapsulated plant extracts to fight coccidiosis. **Feed Mix**, v. 14, n. 4, p. 18-21, 2006.

JUAN, R. A.; OLGA, P. A.; MIRIAN, P. P. Chemical composition and anti-*Trypanosoma cruzi* effect of *Thymus vulgaris* L. (Thyme) essential oil and Its main component, thymol, in mice. **American Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 21-27, 2015.

KALAISELVI, A. *et al.* Chemical composition of clove bud oil and development of clove bud oil loaded niosomes against three larvae species. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 137, p. 102-108, 2019.

KUMRUNGSEE, N. *et al.* Toxicity of essential oil compounds against diamondback moth, *Plutella xylostella*, and their impact on detoxification enzyme activities. **Journal of Pest Science**, v. 87, n. 4, p. 721-729, 2014.

KRAUSS, H. *et al.* **Zoonoses: infectious diseases transmissible from animals to humans**. 3. ed. Washington: American Society of Microbiology, 2003. 400p.

LANGE, K. C. *et al.* Effect of sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3-4, p. 273-278, 2006.

- LEI, J.; LESER, M.; ENAN, E. Nematicidal activity of two monoterpenoids and SER-2 tyramine receptor of *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical pharmacology**, v. 79, n. 7, p. 1062-1071, 2010.
- LISI, A. de *et al.* Chemical characterisation of *Thymus* populations belonging from Southern Italy. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1284–1286, 2011.
- LOCHAB, B.; SHUKLA, S.; VARMA, I. K. Naturally occurring phenolic sources: Monomers and polymers. **RSC Advances**, v. 4, n. 42, p. 21712-21752, 2014.
- MAHMOUDVAND, H. *et al.* Chemical composition and prophylactic effects of *Saturja khuzestanica* essential oil on acute toxoplasmosis in mice. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 14, n. 5, p. 49-55, 2017.
- MANCINI, E. *et al.* Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* from different areas in the southern apennines (Italy). **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, n. 4, p. 639-651, 2014.
- McMURRY, J. **Química orgânica**. 7. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 1344p.
- MELO, R.S. *et al.* Chemical composition and antimicrobial effectiveness of *Ocimum gratissimum* L. essential oil against multidrug-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 1-17, 2019.
- MOHAMMADPOUR, G.; MARZONY, E. T.; FARAHMAND, M. Evaluation of the anti-*Leishmania major* activity of *Satureja bakhtiarica* essential oil *in vitro*. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 1, p.133-136, 2012.
- MONZOTE, L.; ALARCÓN, O.; SETZER, W. N. Antiprotozoal activity of essential oils. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 77, n. 4, p. 167-175, 2012.
- MORAES, J. *et al.* Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 603-610, 2013.
- NERY, P. S. *et al.* Effects of *Anacardium humile* leaf extracts on the development of gastrointestinal nematode larvae of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 3-4, p. 361–364, 2010.
- NIST (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY) **NIST Livro de química na web, SDR 69**. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/>>. Acesso em: 01 jul. 2021.
- NOGUEIRA, F. A. *et al.* Anthelmintic efficacy of banana crop residues on gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* tests. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 317-323, 2012.
- NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 28-35, 2012.

- NOVATO, T. P. L. *et al.* Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 212, n. 3-4, p. 331-335, 2015.
- OLIVEIRA, C. B. S. *et al.* Anti-*Toxoplasma* activity of estragole and thymol in murine models of congenital and noncongenital toxoplasmosis. **The Journal of Parasitology**, v. 102, n. 3, p. 369-376, 2016.
- RAMAR, M. *et al.* Nano-insecticidal formulations from essential oil (*Ocimum sanctum*) and fabricated in filter paper on adult of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 5, n. 4, p. 1769-1774, 2017.
- PÉREZ G. S. *et al.* Antiprotozoa activity of some essential oils. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 15, p. 2901-2908, 2012.
- RÍOS, J. L. Essential oils: what they are and how the terms are used and defined. In: PREEDY, V. R. **Essential oils in food preservation**. London: Academic Press, 2016. p. 3–10.
- ROMERO, M. C. *et al.* Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil against anisakiasis. **Phytomedicine**, v. 19, n. 6, p. 520-523, 2012.
- SANTORO, G. F. *et al.* Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, v. 100, n. 4, p. 783-790, 2007.
- SENRA, T. O. S. *et al.* Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (E)-cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 4, p. 1461-1466, 2013a.
- SENRA, T. O. S. *et al.* Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 10, p. 3471-3476, 2013b.
- SILVA, A. R. S. *et al.* Leishmanicidal activity and structure-activity relationships of essential oil constituents. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 815-825, 2017.
- SOUZA, W. M. A. **Avaliação clínica e laboratorial do óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham em dermatites parasitárias de cães (*Canis familiares*)**. 2012. 90 f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.
- STRATAKOS, A. C.; KOIDIS, A. Methods for extracting essential oils. In: PREEDY, V. R. **Essential oils in food preservation**. London: Academic Press, 2016. p. 31–38.
- TAIZ; L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

- TASDEMIR, D. *et al.* Antiprotozoal activity of turkish *Origanum onites* essential oil and its components. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4421-4436, 2019.
- TEICHMANN, K. *et al.* Phytochemicals to prevent chicken coccidiosis. **Planta Medica**, v. 78, n. 11, 2012. p. 72.
- TELES, A. M. *et al.* GC-MS characterization of antibacterial, antioxidant, and antitrypanosomal activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, n. 6663255, p. 1-12, 2021.
- THEKISOE, O. M. M. *et al.* Parasites of veterinary importance from domestic animals in uMkhanyakude district of KwaZulu-Natal province. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 91, n. 0, p. E1-E11, 2020.
- TROMMER, H.; NEUBERT, R. H. H. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 106-121, 2006.
- TURGIS, M. *et al.* Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. **Food Control**, v. 20, n. 12, p. 1073-1079, 2009.
- UEDA-NAKAMURA, T. *et al.* Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology international**, v. 55, n. 2, p. 99-105, 2006.
- URZÚA, A. *et al.* Insecticide properties of the essential oils from *Haplopappus foliosus* and *Bahia ambrosoides* against the house fly, *Musca domestica* L. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 55, n. 3, p. 392-395, 2010.
- VIEIRA, F. P. R. **Efeitos *in vitro* e caracterização química dos óleos essenciais de *Cinnamomum verum*, *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e seus componentes majoritários sobre *Fasciola hepatica*.** 2017. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2017.
- WALTERS, H. A.; TEMESVARI, L. A. Target acquired: transcriptional regulators as drug targets for protozoan parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 8, p. 599-611, 2021.
- WENY, G. *et al.* Prevalence and risk factors associated with hemoparasites in cattle and goats at the Edge of Kibale National Park, Western Uganda. **Journal of Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 69-74, 2017.
- WOLFFENBUTTEL, A. N. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica.** 1. ed. São Paulo: Laszlo, 2011. 312p.
- XAVIER, F. J. S. *et al.* Synthesis and *in vitro* anti-*Leishmania amazonensis* biological screening of Morita-Baylis-Hillman adducts prepared from eugenol, thymol and carvacrol. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1483-1495, 2016.
- YOUSSEFI, M. R. *et al.* *In vitro* and *in vivo* effectiveness of carvacrol, thymol and linalool against *Leishmania infantum*. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 1-11, 2019.

Capítulo 17

A importância de compostos benzimidazólicos no controle de doenças parasitárias



Natânia do Carmo Sperandio¹
Lais Sperandio Cassani²
Adilson Vidal Costa³
Róbson Ricardo Teixeira⁴
Fabrício Marques de Oliveira⁵
Vagner Tebaldi de Queiroz⁶
Isabella Vilhena Freire Martins⁷

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: natania.sperandio@ufes.br

² Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lais_cassani@hotmail.com

³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: avcosta@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Viçosa, e-mail: robsonr.teixeira@ufv.br

⁵ Instituto Federal de Minas Gerais, Campus Ouro Branco, e-mail: fabricio.marques@ifmg.edu.br

⁶ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: vagnertq@gmail.com

⁷ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: isabella.martins@ufes.br

1 INTRODUÇÃO

Compostos heterocíclicos contendo átomos de nitrogênio são importantes estruturas químicas, sendo encontrados em vários produtos de origem natural e sintéticos (ARORA *et al.*, 2012; QUIN; TYRREL, 2010). Dentre estes compostos, os benzimidazóis (1*H*-benzimidazóis ou 1,3-benzodiazóis) e seus derivados, são, atualmente, uma das classes de heterocíclicos mais estudadas, por exibirem um vasto espectro de atividades biológicas, tais como: antimicrobiana, anticancerígena, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória, analgésica, antiprotozoária, anti-helmíntica entre outras (SALAHUDDIN; SHAHARYAR; MAZUMDER, 2017). O estudo desta classe se torna de grande relevância em função desses compostos estarem presentes na composição de muitos fármacos comercializados, como o Ricobendazole[®] (sulfóxido de albendazol), Fasinex[®] (triclabendazol), Platelmin[®] (mebendazol), Panacur[®] (fenbendazol), Albendazol[®] (albendazol), Panteq[®] (oxifendazol), Fungiterm[®] (Tiabendazol), dentre outros (SINDAN, [2021]).

Segundo Jaeger e Carvalho-Costa (2017) os compostos benzimidazólicos apresentam várias características importantes no controle de helmintos e por isso são amplamente utilizados em animais e humanos. Dentre essas características estão a elevada seletividade para os parasitos e, portanto, baixa toxicidade aos mamíferos, um amplo espectro de atividade, facilidade de administração, boa eficácia e baixo custo.

O presente trabalho teve como objetivo fazer uma revisão dos estudos da atividade parasitária e estrutural dos benzimidazóis no que tange ao controle dos principais helmintos e protozoários de importância em medicina veterinária.

2 HETEROCÍCLICOS NITROGENADOS

Os compostos de natureza heterocíclica, segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, 2006), caracterizam-se por possuírem um anel, do qual fazem parte pelo menos dois tipos diferentes de átomos. Estes compostos estão entre as mais abundantes substâncias orgânicas e desempenham papel importante em diferentes áreas tais como química, medicina e bioquímica (ARORA *et al.*, 2012; QUIN; TYRREL, 2010). Os chamados heteroátomos mais comuns que fazem parte da composição dos heterocíclicos são enxofre, oxigênio e nitrogênio (MELO *et al.*, 2006).

Dentre os heterocíclicos, os nitrogenados estão entre os de maior relevância. Eles são parte integrante das estruturas de diversos fármacos (KERRU *et al.*, 2020) e agroquímicos

(LAMBERTH *et al.*, 2013). Os heterocíclicos nitrogenados estão presentes nas estruturas dos aminoácidos prolina, histidina e triptofano que, por sua vez, são utilizados, juntamente com outros aminoácidos, para a biossíntese de proteínas. As proteínas estão envolvidas em uma miríade de transformações que são fundamentais para sobrevivência e reprodução das células (ARORA *et al.*, 2012). Os ácidos nucleicos DNA e RNA são constituídos de longas cadeias de subunidades nucleotídicas unidas por ligações fosfodiéster. Os nucleotídeos possuem na sua composição as bases nitrogenadas adenina, citosina, timina e guanina (Figura 1) que são compostos heterocíclicos nitrogenados (ARORA *et al.*, 2012).

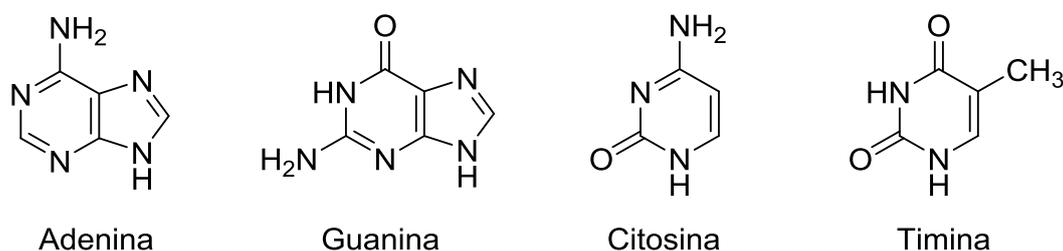


Figura 1 – Exemplos de purinas e pirimidinas: bases nitrogenadas constituintes do DNA.
Fonte: Os autores.

Os heterocíclicos nitrogenados aromáticos podem ser classificados de acordo com o número de átomos de nitrogênio bem como com o tamanho do ciclo. Por exemplo, aqueles contendo anel de cinco membros, constituídos por um ou mais átomos de nitrogênio, pertencem à classe de substâncias denominada genericamente de azóis, exemplificados na Figura 2 pelo pirrol, pirazol, imidazol, 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol e tetrazol (ARORA *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2006).

Em particular, o anel imidazol está presente nas estruturas de diferentes fármacos, da histidina e do hormônio histamina. Além disso, importantes derivados apresentam núcleos aromáticos fundidos com o anel imidazol, como é o caso da imidazo[1,2-*a*]quinolina, imidazo[1,2-*a*]piridina e do 1*H*-benzo[*d*]imidazol (Figura 2), entre outros (MELO *et al.*, 2006).

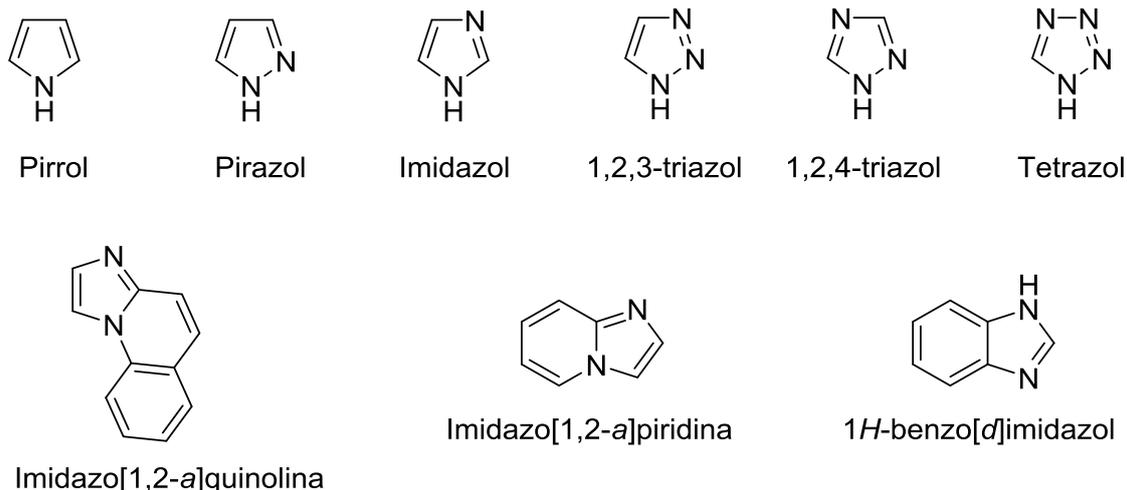


Figura 2 – Exemplos de heterocíclicos nitrogenados aromáticos e seus derivados fundidos.
Fonte: Os autores.

Os 1H-benzimidazóis, também conhecidos como 1,3-benzodiazóis, têm sido objeto de constante estudo há anos, sendo bem documentadas informações a respeito de suas estabilidade, reatividade, caráter anfótero e propriedades polares. Além disso, as estruturas dos benzimidazóis, com grupos NH não substituídos, existem em duas formas tautoméricas, nas quais o átomo de hidrogênio pode estar localizado em qualquer um dos dois átomos de nitrogênio, o que resulta em misturas de compostos substituídos de maneira não simétrica (Figura 3) (BELTRAN-HORTELANO *et al.*, 2020).

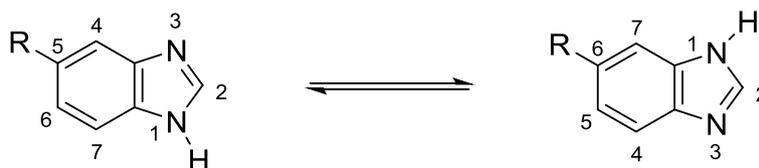


Figura 3 - Estruturas tautoméricas do 5 (ou 6) R-1H-benzimidazol.
Fonte: Os autores.

Adicionalmente, os 1H-benzimidazóis possuem características tanto ácidas quanto básicas. Eles apresentam $pK_a = 12$ e seu ácido conjugado $pK_a = 5$ sendo, deste modo, menos básicos que o imidazol que apresenta $pK_a = 14$. Destaca-se também o fato de que a presença desses núcleos nas estruturas de compostos pode contribuir para a melhoria de suas solubilidades em água. Além disso, devido à sua reatividade frente a nucleófilos e eletrófilos, esses heterocíclis podem se ligar a uma ampla gama de proteínas, enzimas e receptores em sistemas biológicos por meio de vários tipos de interações (Figura 4) (ALAMGIR; BLACK; KUMAR, 2007).

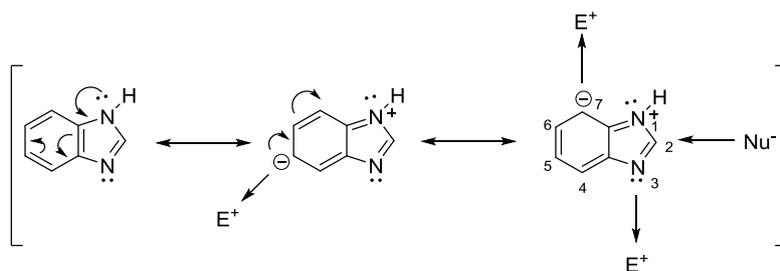


Figura 4 – Forma canônicas resultantes da deslocalização de elétrons non1*H*-benzimidazol e diferentes sítios reativos de sua estrutura frente a eletrófilos (E^+) e nucleófilos (Nu^-).

Fonte: Os autores.

Devido às suas propriedades, um grande número de compostos contendo o anel benzimidazol tem sido descritos e apresentando amplo espectro de propriedades farmacológicas, tais como ação antimicrobiana, anticancerígena, antiviral, anti-inflamatória, analgésica, antiprotozoária e anti-helmíntica (SALAHUDDIN; SHAHARYAR; MAZUMDER, 2017).

Dentre os compostos com ação antiprotozoária e anti-helmíntica, destacam-se o albendazol, o fenbendazol e o mebendazol. Outros compostos como tiabendazol, oxfendazol, oxibendazol, triclabendazol e o sulfóxido de albendazol possuem apenas ação anti-helmíntica (BOWMAN, 2010) (Figura 5).

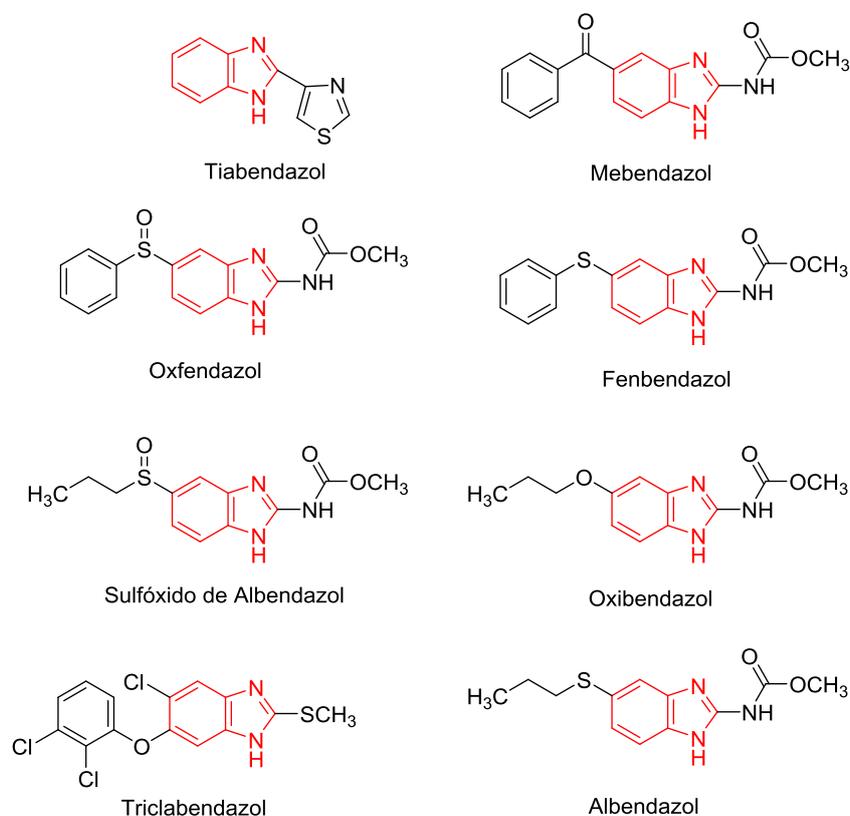


Figura 5 – Fármacos contendo o anel benzimidazólico.

Fonte: Os autores.

3 ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA

De acordo com Katiyar *et al.* (1994), acreditava-se inicialmente que os benzimidazóis tinham ação apenas em helmintos e fungos. Entretanto, artigos demonstraram a atividade dos compostos albendazol, mebendazol e fenbendazol (Figura 5) em alguns protozoários, principalmente *Giardia* e *Trichomonas vaginalis*. Salahuddin, Shaharyar e Mazumder (2017) destacam que derivados de benzimidazóis podem apresentar ação em protozoários dos gêneros *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Acanthamoeba*, *Giardia*, *Entamoeba* e *Trichomonas*.

Dentre as doenças parasitárias que acometem cães e gatos, a giardíase, causada por protozoários do gênero *Giardia*, é uma das mais frequentes na rotina clínica. O fenbendazol é indicado no tratamento, uma vez ao dia por três a cinco dias como terapia inicial para a giardíase. Albendazol foi associado à supressão da medula óssea em cães e gatos, por isso não deve mais ser usado para tratar pequenos animais com doenças parasitárias (TANGTRONGSUP; SCORZA, 2010).

Um estudo realizado por Villeneuve, Beugnet e Bourdoiseau (2000) analisou quatro canis para demonstrar a eficácia do oxfendazol na dose de 11,3 mg kg⁻¹ por dia durante três dias. Após o tratamento, nenhum cão eliminou cistos *Giardia* e não apresentou a clínica de diarreia, confirmando a eficácia da base no tratamento.

4 ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA

Os benzimidazóis agem se ligando a tubulina dos helmintos, inibindo a polimerização dos microtúbulos. Isto causa uma despolarização dos microtúbulos gerando a perda de função em várias partes da célula dependentes desta estrutura, incluindo a função dos neurotransmissores e outros mensageiros intracelulares, eliminação de produtos de degradação, absorção de nutrientes pela célula, divisão celular, organização intracelular e outras interações vitais do tipo proteína-proteína que levam à morte celular (BOWMAN, 2010).

Devido a esse modo de ação ocorre um desequilíbrio da manutenção da homeostase celular, promovendo morte de diversas formas evolutivas dos helmintos, resultando assim em ação ovicida, larvicida e adulticida. Para uso animal, os benzimidazóis tem sido amplamente utilizado, conforme tabela abaixo adaptada de Bowman (2010).

Tabela 1- Fármacos benzimidazólicos, seu espectro de ação e indicação para uso veterinário.

Fármacos	Espectro de ação	Animais	Dose utilizada
Albendazol	Nematoides (larvas e adultos) e Cestoides	Ovinos	7,5 mg kg ⁻¹
		Bovinos	10 mg kg ⁻¹
Fenbendazol	Nematoides (larvas e adultos)	Suínos	9 mg kg ⁻¹ (3 a 12 dias)
		Equinos	5 a 10 mg kg ⁻¹
		Bovinos	5 a 10 mg kg ⁻¹
		Caninos	50 mg kg ⁻¹ (3 dias)
Oxfendazol	Nematoides e Cestoides	Bovinos	4,5 mg kg ⁻¹
Oxibendazol	Nematoides	Equinos	10 mg kg ⁻¹

Fonte: Adaptada de Bowman (2010).

4.1 ATIVIDADE NEMATOIDICIDA

Em geral, os benzimidazóis têm elevada eficácia contra nematódeos adultos e imaturos em desenvolvimento ou inibidos, tendo também descrição de ação ovicida. Sua principal ação é em nematoides gastrintestinais e pulmonares de ruminantes. Entretanto, alguns estudos foram conduzidos em animais de companhia e em humanos, e os benzimidazóis são considerados os principais compostos no controle de nematoides (BOWMAN, 2010).

Quanto à terapia em humanos, Nery *et al.* (2018) avaliaram a eficácia do albendazol, por meio do PCR quantitativo, contra *Necator americanus* e *Ascaris* spp. no distrito de Manufahi, Timor-Leste e verificou-se que o albendazol é altamente eficaz contra *Ascaris* spp., com taxa de cura de 91,4% e taxa de redução da intensidade da infecção de 95,6%. O fármaco foi menos eficaz contra *N. americanus* com taxa de cura de 58,3% e taxa de redução da intensidade da infecção de 88,9%, mostrando que o fármaco continua sendo eficaz. Esse fato foi confirmado também por Horton (2000), que afirma que o albendazol é seguro e de fácil administração, podendo ser indicado tanto no tratamento de indivíduos quanto no tratamento de comunidades.

Keiser e Utzinger (2008) em um estudo da eficácia dos medicamentos atuais contra infecções por helmintos, concluíram que o albendazol oral de dose única e o mebendazol, para

infecção com *Ascaris lumbricoides*, resultaram em taxas de cura de 88% e 95%, respectivamente; e as taxas de cura para infecção com *Trichuris trichiura* foram de 28% e 36%, respectivamente.

Segundo Shalaby *et al.* (2009) em seu experimento utilizando formas adultas de *Toxocara canis* incubados durante 48 horas com albendazol foi possível observar uma redução na motilidade, sendo essa diminuição suficiente para expulsar os vermes do intestino do animal parasitado, e também alterações microscópicas. Sob essa ótica, foram identificadas, de forma detalhada, deformidades externas nos vermes, como a ruptura da cutícula e das papilas sensoriais, inchaço na hipoderme e lesões irregulares espalhadas sobre a superfície dos lábios, ou seja, possivelmente a cutícula foi a estrutura ativa pelo qual ocorreu a absorção do anti-helmíntico levando a toda essa desorganização estrutural.

Em nematoides de equinos, os benzimidazóis mais utilizados são o fenbendazol e o oxibendazol, entretanto, a maioria dos artigos atuais relatam apenas casos de resistência dos principais parasitos de equinos, os estrogilídeos, a esses fármacos (FLORES *et al.*, 2020)

Enquanto em nematoides parasitos gastrintestinais de ruminantes, diversos são os compostos benzimidazólicos usados rotineiramente. Bowman (2010) cita diversos trabalhos mostrando atividades de albendazol, fenbendazol e oxfendazol no controle desses parasitos, entretanto, estudos recentes mostram diversas populações desses nematoides no Brasil resistentes a diferentes substâncias (JAEGER; CARVALHO-COSTA, 2017).

4.2 ATIVIDADE CESTOIDICIDA

A eficácia dos compostos benzimidazólicos no controle de cestódeos é variável, sendo dependente da dosagem e do regime de aplicação. Os mais eficazes do grupo são os compostos com meia-vida mais longa (tais como oxfendazol, fenbendazol, albendazol, sulfóxido de albendazol), pois eles não são metabolizados rapidamente em produtos inativos (BOWMAN, 2010).

Estudos vem demonstrando mais detalhadamente a ação do uso dos benzimidazóis nesse grupo de parasitos. Experimentos com a *Taenia crassiceps in vitro* relatam o impacto metabólico dos compostos benzimidazólicos, em destaque para o albendazol, como a visualização de alterações morfológicas do tegumento e o comprometimento da obtenção de glicose, aminoácidos e de lipídios. Ademais, também pode ser observado um aumento significativo nas vias energéticas alternativas. O aumento dessas vias energéticas pode ser justificado devido à inibição da malato desidrogenase citosólica e mitocondrial, sendo descrita

tanto em vermes redondos quanto planos, e assim conseqüentemente acarretando em uma possível acidose metabólica dentro da célula parasitária (VINAUD; AMBROSIO, 2020).

Trejo-Chávez *et al.* (2011) relatam outro impacto enzimático importante ao utilizar sulfóxido de albendazol em cisticercos de *T. crassiceps*. Os autores observaram prejuízos na via de desintoxicação da glutatona, sendo o responsável por tal função um complexo de enzimas presentes na mitocôndria.

Vários agentes quimioterápicos são avaliados para o tratamento da cisticercose. A eficácia do oxfendazol foi estudada por Gomez-Puerta *et al.* (2015), em metacestodeos de *Cysticercus tenuicollis* e larvas do cestoda *Taenia hydatigena*, que tem como hospedeiro intermediário os ruminantes e suínos. Os suínos tratados (n = 506) receberam uma única dose de 30 mg kg⁻¹ de oxfendazol e a avaliação ocorreu seis meses após o tratamento, sendo a prevalência de *C. tenuicollis* de 27,5% nos controles e 2,0% nos animais tratados. Todos os cistos encontrados no grupo tratado apresentaram degeneração, com uma membrana espessa, e continham fluído leitoso e tecido fibroso.

Em outro estudo, Vargas-Calla *et al.* (2016), avaliaram a eficácia do triclabendazol e oxfendazol, em 18 suínos naturalmente infectados com *Cysticercus cellulosae*. Os animais foram tratados por via oral com dose única de triclabendazol (30 mg kg⁻¹) ou oxfendazol (30 mg kg⁻¹) e após 17 semanas os animais tratados com oxfendazol tinham apenas cistos degenerados em suas carcaças, enquanto que para o triclabendazol não houve efeito.

A eficácia de vários benzimidazóis e de outros cestoidicidas estão relatadas no trabalho de Mkupasi *et al.* (2013) para o controle de *C. celulllosae* em suínos. Segundo os autores, apenas o oxfendazol se mostrou eficaz e seguro contra a cisticercose suína. A equinococose cística é um problema de saúde pública causado pelo *Echinococcus granulosus*. Gavidia *et al.* (2009) determinaram a eficácia do nitazoxanida e oxfendazol em diferentes protocolos, em ovelhas naturalmente infectadas com a fase larval. Num total de 151 ovelhas, os grupos com oxfendazol por 11 semanas e o oxfendazol associado a nitazoxanida foram mais eficazes no controle em uma faixa de 49,6% a 61,2% para cistos pulmonares e entre 91,8% e 100% para cistos hepáticos. Em contraste, nitazoxanida isolada não foi eficaz contra cistos de hidáticos.

O estudo de Juszczak *et al.* (2017) analisou 45 bovinos de corte da raça Limousine da região da Pomerânia Ocidental e identificou que 97,8% dos animais estavam com cestoides do gênero *Moniezia* sp. O tratamento foi realizado com o produto comercial de base albendazol e 21 dias após a dose inicial verificou-se a eficácia de 100% do produto.

4.3 ATIVIDADE TREMATOIDICIDA

Apenas alguns compostos benzimidazólicos possuem ação trematoidicida, em especial o albendazol, o sulfóxido de albendazol e o triclabendazol em estudos com trematódeos de importância veterinária. No que tange a humanos, Ben e Useh (2017) avaliaram comparativamente o praziquantel e o albendazol no controle de *Schistosoma haematobium* e concluíram que o albendazol pode ser útil no controle da esquistossomose urinária.

Especialmente contra *Fasciola hepatica*, o derivado halogenado triclabendazol é o mais eficaz por causa de sua excelente atividade contra helmintos adultos e formas larvares. Por isso, atualmente há registros de populações resistentes a triclabendazol em vários países. O albendazol é o único metilcarbamato recomendado para o controle da fasciolíase em animais domésticos, apesar de sua atividade ser restrita a adultos. Fenbendazol, um metilcarbamato semelhante e amplamente utilizado na medicina veterinária como um nematodocida, não é tão eficaz quanto albendazol contra *F. hepatica*, mas apresenta relatos de eficácia na literatura (ALVAREZ *et al.*, 2009).

Stitt e Fairweather (1996) em seu estudo utilizando o triclabendazol em *F. hepatica* observaram algumas alterações a partir de seu metabólico sulfóxido ativo, *in vitro*, por microscopia eletrônica. Após 12 horas de contato com esse princípio ativo, as células vitelínicas se apresentavam vacuolizadas e totalmente anormais. Além disso, também se visualizou a ruptura dessas estruturas.

A eficácia de uma única dose oral de 30 mg kg⁻¹ de oxfendazol contra *F. hepatica* foi avaliada por Gomez-Puerta *et al.* (2012) em estudo em ovelhas naturalmente infectadas. Nenhum dos animais do grupo de tratamento apresentou ovos de *F. hepatica* em fezes após 10 dias de tratamento, diferente do grupo controle, que se manteve infectado.

Apesar do albendazol ser indicado no tratamento de fasciolose hepática em bovinos e ovinos como agente adultocida, alguns estudos mostram a eficácia em ovinos (CARNEIRO *et al.*, 2019) e outros mostram eficácia baixa desse fármaco em bovinos (LEÃO *et al.*, 2012).

5 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA AOS BENZIMIDAZÓIS

O sucesso do emprego dos benzimidazóis no controle de helmintos e seu uso constante promoveu uma pressão de seleção em diferentes espécies de helmintos, potencializando os casos de populações resistentes a esses compostos em diversas partes do mundo. Segundo

Fortes e Molento (2013), a resistência aos benzimidazóis está associada a mutações do gene da β -tubulina.

Furtado, Bello e Rabelo (2016) publicaram um estudo da resistência dos benzimidazóis em helmintos de humanos e animais, com foco nas propriedades dos fármacos, mecanismos e diagnóstico dessa resistência. Segundo esses autores, a resistência aos benzimidazóis foi relatada em animais de todos os continentes e não está restrito a helmintos de importância veterinária, sendo uma realidade em helmintos que acometem humanos. Segundo Rashwan *et al.* (2016), o uso prolongado e frequente de fármacos como albendazol e mebendazol em helmintos intestinais humanos pode levar a emergência de resistência anti-helmíntica como ocorre para nematoides de animais de produção.

Em ruminantes e equinos, diferentes estudos relatam populações resistentes de helmintos a diferentes compostos do grupo dos benzimidazóis (JAEGER; CARVALHO-COSTA, 2017; KAPLAN; VIDYASHANKAR, 2012). Entretanto, os estudos em helmintos de animais de companhia são mais raros, apesar de haverem relatos em cães no Brasil (FURTADO *et al.*, 2014).

Apesar da resistência anti-helmíntica ser uma realidade no controle de helmintoses em animais de produção e embora sejam crescentes o desenvolvimento e a adoção de métodos alternativos de controle parasitário visando à redução da aplicação de compostos químicos, as atuais medidas de controle ainda dependem fortemente do uso de anti-helmínticos e, portanto, o uso racional desses compostos é desejável (FORTES; MOLENTO, 2013).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os benzimidazóis representam uma classe de compostos com excelente atividade biológica, em especial em helmintos, em que sua característica de amplo espectro confere o sucesso do tratamento para o controle das helmintoses em humanos e em animais de companhia e produção.

7 REFERÊNCIAS

ALVAREZ, L. *et al.* Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 211-216, 2009.

ALAMGIR, M.; BLACK, D. S. T. C.; KUMAR, N. Synthesis, reactivity and biological activity of benzimidazoles. In _____. **Topics in heterocyclic chemistry**. 9. ed. Berlin: Springer, 2007. p. 87-118.

- ARORA, P. *et al.* Importance of heterocyclic chemistry: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 9, p. 2947-2954, 2012.
- BELTRAN-HORTELANO, I. *et al.* The role of imidazole and benzimidazole heterocycles in Chagas disease: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 206, p. 112692-112706, 2020.
- BEN, S. A.; USEH, M. F. A comparative study on the efficacy of praziquantel and albendazole in the treatment of urinary schistosomiasis in Adim, Cross River State, Nigeria. **International Health**, v. 9, n. 5, p. 288-293, 2017.
- BOWMAN, D. D. **Georgis parasitology for veterinarians**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 432p.
- CARNEIRO, M. B. *et al.* Alterações microscópicas em *Fasciola hepatica* de ovelhas tratadas com albendazol. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 1, p. 33-39, 2019.
- FLORES, A. G. *et al.* Multiple resistance in equine cyathostomins: a case study from military establishments in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 29, n. 3, p. 3820-3829, 2020.
- FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1391-1402, 2013.
- FURTADO, L. F. V.; BELLO, A. C. P. P.; RABELO, E. M. L. Benzimidazole resistance in helminths: from problem to diagnosis. **Acta Tropica**, v. 162, p. 95-102, 2016.
- FURTADO, L. F. V. *et al.* First identification of the F200Y SNP in the β -tubulin gene linked to benzimidazole resistance in *Ancylostoma caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 15, p. 313-316, 2014.
- GAVIDIA, C. M. *et al.* Evaluation of nitazoxanide and oxfendazole efficacy against cystic echinococcosis in naturally infected sheep. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 3, p. 367-372, 2009.
- GOMEZ-PUERTA, L. A. *et al.* Efficacy of a single oral dose of oxfendazole against *Fasciola hepatica* in naturally infected sheep. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 3, p. 486-488, 2012.
- GOMEZ-PUERTA, L. A. *et al.* Oxfendazole as successful treatment of *Taenia hydatigena* metacestodes in naturally infected pigs. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 11, p. 971-973, 2015.
- HORTON, J. Albendazole: A review of anthelmintic efficacy and safety in humans. **Parasitology**, v. 121, n. 1, p. 113-132, 2000.
- IUPAC (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY). **Compendium of chemical terminology**, 2. ed. ("Gold Book"). Compilado por A. D.

McNaught e A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Versão online: "heterocyclic compounds" (2006) criado por M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; atualizações compiladas por A. Jenkins. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Composto_heteroc%C3%ADclico> Acesso em: 2 jun. 2021.

JAEGER, L. H.; CARVALHO-COSTA, F. A. Status of benzimidazole resistance in intestinal nematode populations of livestock in Brazil: a systematic review. **BMC Veterinary Research**, v.13, n.358, p. 1-10, 2017.

JUSZCZAK, M. *et al.* The evaluation of efficacy of valbazen (pflizer) in the treatment of gastro-intestinal tract parasite invasions in beef cattle of west Pomerania. **Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis**, v. 336, n. 3, p. 53–58, 2017.

KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 4, p. 70-78, 2012.

KATIYAR, S. K. *et al.* Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with beta-tubulin sequence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 9, p. 2086-2090, 1994.

KEISER, J.; UTZINGER, J. Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. **National Library of Medicine**, v. 299, n. 16, p. 1937-1948, 2008.

KERRU *et al.* A review on recent advances in nitrogen-containing molecules and their biological applications. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1909-1951, 2020.

LAMBERT *et al.* Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals **Plant Science**, v. 341, n. 6147, p. 742-746, 2013.

LEÃO, A. G. C. de *et al.* Efficacy of albendazole, albendazole sulfoxide and clorsulon in control of fasciolosis in dairy cattle. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 1, p. 11-14, 2012.

MELO, J. O. F. *et al.* Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 569-579, 2006.

MKUPASI, E. M. *et al.* Efficacy and safety of anthelmintics tested against *Taenia, solium* cysticercosis in pigs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n. 7, p. 1-7, 2013.

NERY, S. V. *et al.* Use of quantitative PCR to assess the efficacy of albendazole against *Necator americanus* and *Ascaris* spp. in Manufahi District, Timor-Leste **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 373-380, 2018.

QUIN, L. D.; TYRREL, J. A. **Fundamentals of heterocyclic chemistry: importance in nature and in the synthesis of pharmaceuticals.** New Jersey: Wiley, 2010. 327p.

RASHWAN, N. *et al.* Isothermal diagnostic assays for monitoring single nucleotide polymorphisms in *Necator americanus* associated with Benzimidazole drug resistance. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. 5113-5121, 2016.

- SALAHUDDIN, M.; SHAHARYAR, A.; MAZUMDER, V. Benzimidazoles: a biologically active compounds. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 157-173, 2017.
- SHALABY, H. A. *et al.* Comparative *in vitro* effect of artemether and albendazole on adult *Toxocara canis*. **Parasitology research**, v. 105, n. 4, p. 967-976, 2009.
- SINDAN (Sindicado Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal). **Compêndio de produtos veterinários**, [2021]. Disponível em: <https://sistemas.sindan.org.br/cpvs/default.aspx>. Acesso em: 1 jun. 2021.
- STITT, A. W.; FAIRWEATHER, I. *Fasciola hepatica*: disruption of the vitelline cells *in vitro* by the sulphoxide metabolite of triclabendazole. **Parasitology Research**, v. 82, p. 333-339, 1996.
- TANGTRONGSUP, S.; SCORZA, V. Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp. infections in dogs and cats. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 25, n. 3, p. 155–162, 2010.
- TREJO-CHÁVEZ, H. *et al.* *In vitro* evaluation of the effects of cysticidal drugs in the *Taenia crassiceps* cysticerci ORF strain using the fluorescent cell tracker CMFDA. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 294-299, 2011.
- VARGAS-CALLA, A. *et al.* Evaluation of activity of triclabendazole against *Taenia solium* metacestode in naturally infected pigs. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 1, p. 23-26, 2016.
- VILLENEUVE, V.; BEUGNET, F.; BOURDOISEAU, G. Efficacy of oxfendazole for the treatment of giardiasis in dogs. Experiments in dog breeding kennels. **Parasite**, v. 7, n. 3, p. 221-226, 2000.
- VINAUD, M. C.; AMBROSIO, J. Metabolic effects of anthelmintic drugs in the larval stage of the cestode *Taenia crassiceps*, cysticercosis experimental model—a review. **Acta tropica**, v. 206, p. 105448-105457, 2020.

Capítulo 18

Reações adversas a medicamentos de uso veterinário pela presença de excipientes



Vanessa Cola Thomazini¹
Débora Cantarin Neiva²
Lucas Henrique Cortat³
Théo Matos Arantes Moraes⁴
Carlos Alberto Moreira Junior⁵
Flávia Vieira Botelho Delpupo⁶
Natanael Roque da Silva⁷
Amanda Queiroz de Oliveira⁸
Vitória Ribeiro Mantovanelli⁹
Cristiane dos Santos Giuberti¹⁰
Janaina Cecília Oliveira Villanova¹¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: vanessathomazini01@gmail.com

²Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: deboranei@hotmail.com

³Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lucascortat@gmail.com

⁴Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: theomamoraes@gmail.com

⁵Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: carlosamj_moreira@outlook.com

⁶Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: flaviadelpupo123@outlook.com

⁷Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: natanaelrock17@gmail.com

⁸Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: amanda.q.oliveira@edu.ufes.br

⁹Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: vitoriarmantovanelli@hotmail.com

¹⁰Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: cgiuberti@yahoo.com.br

¹¹Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: farmacotecnia@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

O sucesso da farmacoterapia veterinária se baseia na utilização de medicamentos desenvolvidos tanto para uso exclusivo em animais como para uso em humanos, disponibilizando assim, um arsenal de produtos farmacêuticos com finalidades curativas, paliativas ou profiláticas (TANAKA, 2003). Medicamentos são produtos tecnicamente elaborados, formados pela mistura de um ou mais ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) com os excipientes. Em alguns produtos, a quantidade de excipientes utilizados é muito superior à quantidade de IFAs nas formulações (ALLEN JUNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2013; PIFFERI; RESTANI, 2003).

Por definição, excipientes são substâncias químicas que possuem segurança avaliada e são incluídos nas formulações com finalidades diversas (STEINBERG *et al.*, 2006). No entanto, é sabido que os excipientes não são substâncias química e farmacologicamente inertes, não sendo, portanto, totalmente desprovidos de efeitos adversos, podendo causar reações inesperadas (ARAUJO; BORIN, 2012). Há relatos de casos de reações adversas em animais relacionadas ao uso de substâncias utilizadas como excipientes, como por exemplo, o xilitol e o propilenoglicol (CLAUS; JANDREY; POPPENGA, 2011; LUCAS; HALLAGAN; TAYLOR, 2001; SCHMID; HOVDA, 2016).

No Brasil, a regulação sanitária acerca da fabricação em pequena ou grande escala de medicamentos de uso veterinário é definida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Empresas que compartilham suas linhas de produção para a manufatura de medicamentos de uso veterinário e humano estão sujeitas a inspeções regulares tanto da ANVISA quanto do MAPA, devendo cumprir integralmente todos os requisitos de Boas Práticas de Fabricação (BPFs) preconizadas por ambos os órgãos reguladores. Nestes casos, o registro dos medicamentos industrializados deve ser solicitado à ANVISA. Por outro lado, nos casos de produtos farmacêuticos de uso exclusivo em veterinária, não deve haver compartilhamento dos espaços produtivos, sendo os estabelecimentos inspecionados somente pelo MAPA, órgão que deterá também o registro dos produtos (BRASIL, 2012a; BRASIL, 2012b).

Contudo, ANVISA e MAPA divergem acerca de algumas normas, entre as quais, a indicação expressa dos excipientes que compõem os medicamentos nas bulas. Enquanto a ANVISA obriga que estas contenham a descrição qualitativa dos excipientes dos medicamentos, o MAPA não faz essa exigência (BRASIL, 2004; BRASIL, 2009a; BRASIL, 2009b). O objetivo do presente capítulo é reunir informações acerca de relatos de toxicidade

relacionados aos excipientes, ocorridos na população animal em geral. Tal abordagem é importante para evidenciar a importância da necessidade de informações acerca destes componentes nas bulas dos medicamentos de uso veterinário, com o intuito de auxiliar na identificação, relato e prevenção de reações adversas a estes nos animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EXCIPIENTES

No processo de desenvolvimento dos medicamentos, a etapa do delineamento das fórmulas farmacêuticas - dita etapa de formulação, é essencial para otimizar o desempenho e a qualidade dos produtos, o que pode ser feito mediante a seleção do tipo e da quantidade dos excipientes que compõem as formulações. Os excipientes constituem grande parte das formulações, sendo de notória importância para manutenção dos atributos de eficácia, segurança e qualidade dos medicamentos (AULTON; TAYLOR, 2016; PIFFERI; RESTANI, 2003).

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA), agência reguladora dos medicamentos nos Estados Unidos, excipientes são definidos como quaisquer componentes de um medicamento, diferente do IFA, empregado com finalidades diversas, entre as quais, permitir a manipulação, facilitar o processo produtivo, conservar ou modificar a liberação, entre outras (PIFFERI; RESTANI, 2003). Para a Farmacopeia Brasileira (6ª ed.), complementarmente, os excipientes são as substâncias que são incorporadas às fórmulas farmacêuticas com o intuito de aperfeiçoar as características relacionadas à estabilidade e/ou à aceitação dos produtos (BRASIL, 2019a). Ainda, de acordo com o *International Pharmaceutical Excipients Council* (IPEC), excipiente é qualquer substância diferente do fármaco e do pró-fármaco, que tem sua segurança avaliada e é incluído nas formulações farmacêuticas com finalidades diversas, inclusive, melhorar a biodisponibilidade dos fármacos e fornecer propriedades diferenciadas, tais como, mucoadesividade (STEINBERG *et al.*, 1996). Para Allen Junior, Popovich e Ansel (2013), a importância da presença dos excipientes recai também sobre as características e atributos de qualidade desejadas para o produto final.

De acordo com Steinberg *et al.* (1996) e Pifferi e Restani (2003), os excipientes podem ser incluídos na forma farmacêutica, com as seguintes intenções: (1) possibilitar a preparação do medicamento; (2) permitir a administração de doses exatas dos fármacos; (3) fornecer estabilidade química aos fármacos e aos produtos finais; (4) assegurar a estabilidade física e

microbiológica das preparações; (5) garantir a biodisponibilidade dos fármacos; (6) contribuir para a aceitabilidade dos pacientes, por melhorar o odor, o sabor e a cor das preparações; (7) modificar os perfis de liberação dos fármacos; e, (8) melhorar ou promover qualquer outro atributo relacionado, não somente à segurança, mas, também, à qualidade e efetividade dos produtos durante os períodos de estocagem ou uso.

Os excipientes devem, além de possuírem baixo custo e de serem reprodutíveis lote-a-lote, devem ser estáveis, seguros e funcionais, atributo que pode ser entendido como a apresentação de propriedades físico-químicas, físicas e biofarmacêuticas que assegurem o desempenho desejado dos mesmos (Figura 1) (RAMOS; MORAIS, 2014).

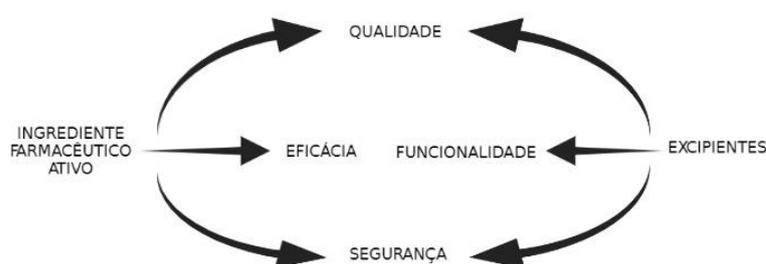


Figura 1 – Desenho esquemático representando os atributos requeridos para os IFAs e excipientes.

Fonte: Ramos e Morais (2014).

Entre os inúmeros documentos informativos disponíveis em compêndios oficiais e *guidelines* que instruem e recomendam o uso dos excipientes nos medicamentos, se destacam as monografias incluídas no *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, um manual internacional, que compila informações sobre os usos, propriedades e segurança dos excipientes farmacêuticos e reúne dados essenciais sobre as propriedades físicas e a potencial toxicidade dos mesmos (ALLEN JUNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2013). A última edição do manual é a nona e traz as monografias de mais de 420 excipientes farmacêuticos empregados no preparo de medicamentos (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Cada monografia traz as seguintes seções: nomenclatura comum, sinônimos, nome químico, fórmula empírica e peso molecular, fórmula estrutural, categoria funcional, aplicações em formulação farmacêutica ou tecnológica, descrição, especificações farmacopéicas, propriedades típicas, estabilidade e condição de armazenamento, incompatibilidades, método de fabricação, segurança, precauções de manuseio, status regulatório, substâncias relacionadas, comentários, referências específicas, referências gerais, autores e data de revisão.

2.2 SEGURANÇA DOS EXCIPIENTES

Assim como os IFAs, os excipientes devem apresentar segurança comprovada. De acordo com a RDC nº 34 de 7 de agosto de 2015, os fabricantes dos excipientes devem seguir protocolos que garantam a segurança e a qualidade dos mesmos, para que ao serem incorporados nas formulações, não comprometam a qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos, devendo informar em documentos de caráter técnico-científico, os procedimentos adotados para esta finalidade (BRASIL, 2015).

Os excipientes são substâncias quimicamente heterogêneas, se caracterizando como moléculas simples ou complexas, de origem natural, sintética ou semissintética (PIFFERI; RESTANI, 2003). Ainda da mesma forma que os IFAs, os excipientes são substâncias químicas e, portanto, possuem propriedades físico-químicas e termodinâmicas inerentes à composição de cada um, podendo sofrer reações de degradação ou instabilidades físicas e microbiológicas. Instabilidades nos excipientes podem comprometer a qualidade e a estabilidade dos produtos nos quais são incluídos, bem como podem induzir a reações adversas nos usuários (FACCI *et al.*, 2020). Araujo e Borin (2012) relatam que a ocorrência de reações de decomposição dos excipientes pode levar à formação de substâncias residuais tóxicas nos produtos bem como a redução na dose do fármaco disponível para a ação, uma vez que os produtos de degradação dos excipientes podem reagir quimicamente com as moléculas dos fármacos, desestabilizando-as.

De acordo com Steinberg *et al.* (1996) e Pifferi e Restani (2003), a desestabilização dos excipientes pode ser ocasionada por fatores intrínsecos ou extrínsecos, como temperatura, umidade ou luz. A presença de certos grupos funcionais tais como aminas, amidas, esterés, sulfitos, ácidos carboxílicos e álcoois, passíveis de sofrerem reações de oxidação, hidrólise ou fotólise, entre outras, influenciam na estabilidade química dos excipientes. Em outras palavras, a segurança dos excipientes para utilização em medicamentos está relacionada com as interações físicas e químicas e com o potencial de toxicidade dos mesmos (PESSANHA *et al.*, 2012). Alguns exemplos de relatos de toxicidade causada por excipientes são dados a seguir.

O aspartame é hidrolisado por esterases no intestino em ácido aspártico, metil éster de fenilalanina e metanol, podendo ser tóxico para fenilcetonúricos; o sorbitol e a lactose podem causar diarreia e flatulência, além de dificultar a absorção de fármacos no trato gastrointestinal; o cloreto de benzalcônio pode causar broncoconstrição e lesões de córnea; o corante amarelo de tartrazina e os parabenos, por serem estruturalmente semelhantes ao ácido acetilsalicílico,

são relacionados a reações alérgicas em indivíduos suscetíveis (ARAÚJO; BORIN, 2012; SILVA *et al.*, 2008; SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

O propilenoglicol (PPG) é um excipiente amplamente utilizado em formulações administradas por diferentes vias, tais como oral e tópica, com função solvente, cossolvente e umectante, principalmente (GELLER *et al.*, 2010; SENA *et al.*, 2014). Elevadas proporções de PPG pode comprometer os sistemas cardiovascular, renal e central, além de causar desequilíbrio ácido-básico e hiperosmolaridade. O PPG é metabolizado a ácido lático, podendo provocar acidose láctica e causar depressão respiratória, fato observado em crianças após a ingestão de medicamentos líquidos orais. O PPG não deve ser administrado em pacientes pediátricos com idade inferior a 4 anos (CATE; HEDRICK, 1980).

Os sulfitos são usados em medicamentos e produtos de higiene e beleza como antioxidante. Contudo, há inúmeros relatos de reações adversas à produtos administrados pelas vias oral, inalatória, parenteral ou oftalmológica, contendo metabissulfito de sódio. As principais manifestações, no entanto, são relacionadas ao trato respiratório, podendo provocar respiração ofegante e dificuldade para respirar (ARAÚJO; BORIN, 2012).

A sacarose é um excipiente utilizado em grandes proporções no preparo de formulações orais líquidas. É o excipiente principal do xarope simples, podendo ser utilizado em até 85% p/v de uma formulação. Contudo, além do potencial cariogênico, a sacarose não deve ser utilizada por pacientes diabéticos (BALBANI; STELZER; MONTOVANI, 2006).

Com relação ao sorbitol, a ingestão excessiva deste edulcorante é associada à diarreia osmótica, uma vez que este é pouco absorvido no intestino delgado e é fermentado no cólon. Em pacientes pediátricos com intolerância à frutose, pode haver danos hepáticos em função da ingestão de sorbitol, pois este é metabolizado à frutose. Produtos que contenham sorbitol devem conter em seus rótulos, um alerta sobre o efeito laxativo do mesmo (GRABITSKE; SLAVIN, 2009).

A lactose, amplamente utilizada como diluente em comprimidos e cápsulas, está associada a eventos gastrointestinais em pessoas intolerantes, dada à deficiência da enzima lactase, responsável pela hidrólise da lactose, causando produção de gases, dores de estômago, inchaço, flatulência e diarreia. Reabsorção da água e efeito laxativo podem ser observados (HE *et al.*, 2006).

2.3 REAÇÕES ADVERSAS AOS MEDICAMENTOS

Reações adversas a medicamentos (RAMs) podem ser definidas como qualquer resposta prejudicial ou indesejável e não intencional que ocorre com medicamentos em doses usualmente empregadas para profilaxia, diagnóstico, tratamento ou para modificação de funções fisiológicas (MODESTO *et al.*, 2016). Segundo Bryne *et al.* (2017), um evento adverso a medicamentos é a observação desfavorável ou não intencional que ocorre após o uso recomendado ou fora do rótulo de um medicamento veterinário em animais, seja ou não considerado relacionado ao produto.

A identificação de RAMs em função dos IFAs é mais facilmente identificada quando comparada às RAMs desencadeadas por excipientes, uma vez que a exposição a estes últimos é menos controlada. Os mesmos excipientes podem estar incluídos em diferentes medicamentos em uso por uma população e em quantidades variáveis, sendo de difícil observação, especialmente na população animal (STEINBERG *et al.*, 1996).

A partir da divulgação do relatório do *Institute of Medicine To Err is Human*, o tema segurança do paciente ganhou relevância. Esse relatório se baseou em duas pesquisas de avaliação da incidência de eventos adversos (EAs) em revisões retrospectivas de prontuários, realizadas em hospitais de Nova York, Utah e Colorado (BRENNAN *et al.*, 1991; GAWANDE *et al.*, 1999; KOHN *et al.*, 2000). Nessas pesquisas, o termo evento adverso foi definido como dano causado pelo cuidado à saúde e não pela doença de base, que prolongou o tempo de permanência do paciente ou resultou em uma incapacidade presente no momento da alta. Caso seja observada alguma reação adversa que possa ter sido ocasionada por um medicamento, devido a presença do IFA ou de um excipiente, é de suma importância a comunicação prontamente das suspeitas às autoridades de saúde por meio do Sistema Nacional de Farmacovigilância, conforme os protocolos vigentes de farmacovigilância (BRASIL, 2009c).

Na notificação espontânea de RAMs, o farmacêutico deve obter informação sobre a descrições das reações adversas (sinais e sintomas); duração, gravidade e evolução; relação dos sinais e sintomas com o medicamento suspeito; data de início e de suspensão do uso do medicamento suspeito; e, lote, via de administração e indicação terapêutica do medicamento (BRASIL, 2009c). Em muitos países, os veterinários têm a obrigação legal de relatar eventos adversos. No entanto, as práticas de notificação variam muito (BRYNE *et al.*, 2017).

Apesar de existir um grande número de relatos de casos de RAMs atribuídas a excipientes em humanos, os relatos acerca das RAMs por excipientes em animais, são

escassos (CABALLERO; QUIRCE, 2020). Relatos encontrados na literatura acerca do tema são apresentados a seguir.

2.4 RAMs POR EXCIPIENTES NA POPULAÇÃO ANIMAL

O xilitol é utilizado como excipiente em formulações farmacêuticas com funções diversas, tais como, agente de revestimento, diluente, umectante e diluente para comprimidos e cápsulas. Contudo, sua principal função é como edulcorante, inclusive, em dentifrícios. A ingestão de xilitol em cães está associada a hipoglicemia causada pela estimulação da secreção de insulina, podendo causar aumento de 2,5 a 7 vezes na secreção do hormônio em cães, em comparação com o mesmo volume de glicose. Em cães, os sinais clínicos típicos associados à ingestão de xilitol são vômitos, ataxia e convulsões. Além da hipoglicemia, há relatos da elevação das enzimas hepáticas ou insuficiência hepática cerca de 8 a 12 horas após a ingestão do xilitol por cães (DUNAYER; GWALTNEY-BRAND, 2006; LEE, 2013; TOOD; POWELL, 2007).

No estudo de Schmid e Hovda (2016), foi relatado um caso clínico relacionado à ocorrência de insuficiência hepática aguda e coagulopatia em um cão da raça Chihuahua, após ingestão de xilitol. O cão apresentou hipoglicemia e enzimas hepáticas aumentadas, indicativo do quadro de hepatotoxicidade. Após administração de medicamentos para desintoxicação hepática, observou-se que não ocorreu comprometimento da função do fígado.

Além do uso do PPG como IFA em formulações otológicas tópicas veterinárias com a finalidade de fluidificar e dissolver o cerúmen auditivo e, como glicogênico em ruminantes, o PPG é utilizado também como excipiente em formulações para uso oral, tópico, parenteral e pulmonar (NUTTALL; COLE, 2004). O PPG era comumente adicionado à comida semi-úmida e guloseimas para gatos, em concentrações de 5 a 10% p/p. No entanto, o FDA reconheceu que esse nível de exposição dos animais resultava em anemia, com formação de corpúsculos de Heinz, proibindo o uso do PPG em alimentos para gatos em 1996 (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). A intoxicação por propilenoglicol em lhamas pode resultar da administração de géis contendo propilenoglicol formulados e rotulados para uso em bovinos. Os sinais clínicos observados incluem desidratação, letargia e hiporexia progressiva, que aumenta a cetose estabelecida. O tratamento requer o restabelecimento de fluido estomacal e estimulação do apetite (NAVARRE *et al.*, 1999).

Há relatos na literatura de reações adversas em cães aos excipientes estearato de magnésio e/ou polivinilpirrolidona (PVP), utilizados como lubrificante e agente de

revestimento, respectivamente (LAVERGNE et al., 1996). Lavergne *et al.* (2016), relataram a ocorrência de reação adversa em um cão com histórico de ganho de peso associado ao hipotireoidismo e leve letargia, ao qual foi prescrito comprimidos de levotiroxina. Após 19 dias, o cão desenvolveu uma reação grave na pele, levando à suspensão do medicamento. Posteriormente, foi prescrito um comprimido de levotiroxina diferente e, novamente, observou-se o desencadeamento de RAMs. Após avaliação de ambos os medicamentos prescritos, foi identificada a presença dos excipientes estearato de magnésio e PVP em ambos. A reação adversa pela presença de um ou ambos os excipientes foi comprovada quando, depois de nove meses de descontinuação do tratamento com os produtos industrializados, foi prescrita uma formulação de levotiroxina, sem os excipientes, para a qual o animal não desenvolveu reações adversas.

A exposição ao etanol, por via oral ou através da pele, é uma fonte comum de toxicidade para animais domésticos e os sintomas mais comuns são relacionados à depressão do sistema nervoso central, tais como, sonolência, letargia, falta de coordenação e perda de consciência. Além desses, incontinência, diminuição da frequência cardíaca, hipersalivação e vômito (CORTINOVIS; CALONI, 2016; LEE, 2013). O álcool etílico é amplamente utilizado em medicamentos líquidos visando ação como solvente, cossolvente ou conservante. Alguns produtos de venda livre podem conter até 10% v/v de álcool, como os elixires. No entanto, a dose letal (LD₅₀) para o etanol em cães é de 5,5 a 6,5 mL/kg, podendo causar morte cerca de 12 a 24 horas após a ingestão. Após um período inicial de excitação, cães expostos ao etanol se tornam atáxicos e descoordenados, podendo ocorrer coma e morte por paralisia respiratória. Etanol e outros álcoois são tóxicos para gatos pelos mesmos mecanismos que são para cães (HOUSTON; HEAD, 1993; THRALL *et al.*, 1984).

O polissorbato é um tensoativo não iônico, usado como agente emulsificante, agente suspensor, agente molhante, agente solubilizante e umectante, em preparações líquidas e semissólidas, presente em medicamentos administrados pela via oral, tópica e parenteral (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Existem relatos da associação da presença deste excipiente com a ocorrência de reações anafiláticas não imunes típicas por indução da liberação de histamina e anticorpos IgE em cães. O estudo de Qiu *et al.* (2013), observaram alterações hematológicas e fisiológicas *in vivo* em cães após administração intravenosa de medicamentos contendo polissorbato e notaram que a presença do tensoativo provocou alterações na pressão pulmonar e sistêmica, o que pode causar depressão cardiopulmonar em cães. Somberg *et al.* (2005), realizaram ensaios clínicos controlados para observar a existência de relação entre o uso do medicamento amiodarona intravenosa com hipotensão e observaram que o efeito

adverso foi associado ao polissorbato 80 e o álcool benzílico, empregados para solubilizar o fármaco. Ambos os solventes apresentam potencial de desencadear sintomas de inotrópica negativa e reação de hipotensão.

O Cremophor[®] EL é um derivado polioxetilado do óleo de rícino, utilizado como agente solubilizante e emulsificante em formulações de uso oral, tópico e parenteral (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). O uso do Cremophor[®] EL pode aumentar a biodisponibilidade de vitaminas em rações e medicamentos veterinários, melhorando a eficácia. Contudo, existem relatos de alterações cardiovasculares e nefrotoxicidade em várias espécies de animais causadas pelo Cremophor[®] EL. RAMs cujos mecanismos precisos não são conhecidos, tais como, reações anafiláticas graves, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade e toxicidade pulmonar também foram observadas em humanos e animais após a administração parenteral de formulações contendo derivados de óleo de rícino polioxietileno (DYE; WATKINS, 1980; THIEL *et al.*, 1986).

O ácido benzóico é um excipiente utilizado como conservante em formulações líquidas e semissólidas administradas pelas vias oral, vaginal, endovenosa, intramuscular e tópica. Entretanto, o uso do ácido benzóico em alimentos para gatos é tóxico, sendo a dose recomendada como segura a de 0,2 g/kg por dia (BEDFORD; CLARKE, 1972; DAVIDSON, 2017).

Hipersensibilidade e reações anafiláticas em bovinos e equinos atribuídas à carboximetilcelulose sódica (CMC-Na) em formulações parenterais de vacinas e antibióticos penicilâmicos, foram relatadas (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). A CMC-Na é amplamente utilizada em formulações farmacêuticas orais e tópicas, principalmente, como agente espessante em soluções aquosas e suspensões, destinadas à aplicação tópica, oral e parenteral. É o principal espessante utilizado no preparo de pasta de dentes. Pode ser usada também como aglutinante e desintegrante em comprimidos e grânulos, como doadores de viscosidade em emulsões e como agentes gelificantes. O excipiente é usado também com finalidades específicas tais como obtenção de mucoadesividade e modificação da liberação de fármacos (HAY *et al.*, 2001; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

2.5 NORMATIZAÇÃO DAS INFORMAÇÕES ACERCA DOS EXCIPIENTES NAS BULAS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

Para Camapum *et al.* (2014), ao contrário do que ocorre para os medicamentos registrados na ANVISA, as informações disponíveis nas bulas de medicamentos veterinários

são insatisfatórias, comprometendo o valor informativo para prescritores e tutores. Ainda, para os autores, não há normatização clara acerca do tema, devendo as INs passarem por reformulações. Machado *et al.* (2017) avaliaram a adequabilidade das informações das bulas de medicamentos veterinários comercializados no Brasil a partir da realização de um estudo descritivo quantitativo, baseado em pesquisa bibliográfica. Os autores concluíram que as bulas se mostraram inadequadas quanto ao caráter informativo, além de não cumprirem o que determinava a legislação vigente.

Medicamentos de uso humano e veterinário devem possuir bulas que atendam a legislação vigente tanto da ANVISA quanto do MAPA, conforme o tipo de produto (uso humano e veterinário ou veterinário exclusivo) (BRASIL, 2012a; BRASIL, 2019b). Como dito anteriormente, o órgão que regulamenta as ações sanitárias relativas ao registro, produção e fiscalização dos estabelecimentos que produzem medicamentos de uso humano no Brasil é a ANVISA, cuja missão principal é a promoção da saúde humana. A indústria farmacêutica é um exemplo de segmento submetido às legislações da ANVISA (BRASIL, 2019b). De acordo com as resoluções sanitárias brasileiras que regulam os medicamentos, a bula é um documento sanitário cuja apresentação é exigida no pedido de licença de comercialização de um produto e é considerada um item obrigatório para a concessão do registro dos medicamentos. Para que as informações contidas nas bulas sejam úteis e cumpram sua finalidade principal, as mesmas devem ser apresentadas de maneira objetiva, atualizadas em concordância com a legislação vigente, devendo ser elaboradas a partir de conhecimento técnico-científico atualizado e fidedigno (CALDEIRA; NEVES; PERINI, 2008; CAMAPUM *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2002).

A Resolução RDC ANVISA nº 140 de 2003 regulamentou a forma e o conteúdo das bulas. Essa resolução prevê que as bulas deverão apresentar letra de tamanho mínimo 1,5 milímetros e apresentar, na sequência, as informações: descrição qualitativa e quantitativa dos princípios ativos, indicando a equivalência sal-base quando houver e, a composição qualitativa dos demais componentes, ou seja, dos excipientes das formulações (BRASIL, 2003).

Outras regulamentações da ANVISA tratam do tema excipientes em bulas de medicamentos. A Resolução RDC nº 10 de 2010 estabeleceu frases de alerta para princípios ativos e excipientes em bulas e rotulagem de medicamentos (BRASIL, 2010). Tendo em vista a importância da utilização dos excipientes na produção dos medicamentos, a ANVISA, por meio da Resolução RDC nº 34 de 2015, dispôs as Boas Práticas de Fabricação de Excipientes Farmacêuticos, abrangendo todas as etapas envolvidas na cadeia dos excipientes, desde sua

produção, testes de qualidade e pureza, instalações, embalagem, rotulagem, registro de lotes, entre outras (BRASIL, 2015).

Contudo a Resolução RDC nº 200 de 2017, que aprovou os requisitos mínimos para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, estabelece que no ato do protocolo de pedido de registro do medicamento, o solicitante deverá apresentar relatório técnico contendo, entre outras informações, aquelas sobre a compatibilidade do IFA com os excipientes; documentos com os detalhes de fabricação, caracterização, e controles com referência bibliográfica para suportar os dados de segurança para excipientes usados pela primeira vez em um medicamento ou em uma nova via de administração; e, as especificações, dos métodos e laudos analíticos para os excipientes, acompanhados de referência bibliográfica, feitos pelo fabricante do medicamento (BRASIL, 2017).

Por outro lado, o MAPA é o órgão responsável pela regulamentação e normatização das atividades ligadas ao setor agropecuário, propondo e gerindo políticas públicas com foco no fomento e desenvolvimento do segmento no país, inclusive, nas ações de registro, fabricação e fiscalização da produção de medicamentos de uso exclusivo em veterinária (BRASIL, 2012a; BRASIL, 2012b).

Apesar das regulamentações nos Decretos presidenciais 5.503 de 2004 e 8.840 de 2016, o MAPA não exige a presença da relação dos excipientes nas bulas dos medicamentos de uso exclusivo em veterinária. O Decreto Presidencial nº 5.053 de 2004 que aprovou o regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem ou comercializem somente prevê nas bulas, cartuchos ou cartuchos-bulas, a descrição dos ingredientes ativos e suas respectivas quantidades e, no caso de produtos biológicos, a composição dos mesmos (BRASIL, 2004). Ainda, o Decreto nº 8.840 de 2016, prevê a especificação da fórmula completa ou a composição dos medicamentos somente nos certificados de registro dos medicamentos, não havendo menção da inclusão dos mesmos nas bulas (BRASIL, 2016a). No entanto, a Instrução Normativa nº 26 de 2009 do MAPA (BRASIL, 2009b), apesar de descrever limites para alterações quantitativas de excipientes em formas farmacêuticas líquidas, sólidas e semissólidas de uso veterinário e, de que alterações qualitativa ou quantitativa dos excipientes em produtos de uso veterinário nas formas líquidas ou semissólidas, dependam de autorização prévia do MAPA e, que nos documentos de registros devem conter os dados toxicológicos dos excipientes, não regulamenta a necessidade de informar a lista dos excipientes nas bulas dos produtos veterinários (BRASIL, 2016b).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na formulação de medicamentos devem-se considerar dois componentes fundamentais: os IFAs e os excipientes, devendo estes últimos desempenhar funções variadas. As indústrias farmacêuticas e as farmácias magistrais que atendem aos regulamentos da ANVISA são obrigadas a discriminar nas bulas ou rótulos, respectivamente, a lista dos excipientes utilizados nas fórmulas dos medicamentos. Enquanto os estabelecimentos fabricantes de medicamentos exclusivos de uso veterinário, reguladas pelo MAPA, estão desobrigados de fornecer tais informações. A omissão e/ou a imprecisão das informações acerca dos excipientes empregados nas fórmulas farmacêuticas expõe os animais ao risco do desenvolvimento de RAMs, cujo desfecho pode ser o óbito, podendo ser considerada uma não conformidade. Neste cenário, fundamentado no conhecimento sobre a importância dos excipientes não somente para a eficácia e qualidade dos medicamentos, mas para a segurança dos mesmos, sugere-se que sejam feitas atualizações e adequações nas normas vigentes do MAPA, relacionadas à indicação expressa dos excipientes que compõem os medicamentos de uso exclusivo na farmacoterapia veterinária, com vistas a contribuir para a segurança dos animais.

4 REFERÊNCIAS

ALLEN JUNIOR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 716 p.

ARAÚJO, A. C. F.; BORIN, M. F. Influência de excipientes farmacêuticos em reações adversas a medicamentos. **Brasília Médica**, v. 49, n. 4, p. 267-278, 2012.

AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 261 p.

BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 3, p. 400-406, 2006.

BEDFORD, P. G.; CLARKE, E. G. Experimental benzoic acid poisoning in the cat. **Veterinary Record**, v. 90, n. 3, p. 53-58, 1972.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Decreto-Lei nº 5.053, de 22 de abril de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 abr. 2004. Seção 1, p. 28.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada nº 47, de 08 de setembro de 2009a. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 08 set. 2009. Seção 1, p.64.

_____. Decreto nº 8.840, de 24 de agosto de 2016. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 25 ago. 2016a. Seção 1, p. 2.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009b. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 jul. 2009. Seção 1, p.7.

_____. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.660, de 22 de julho de 2009. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 de julho de 2009c. Seção 1, p. 45.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa SDA nº 25, de 8 de novembro de 2012a. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 21 nov. 2012a. Seção 1, p.73.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 23, de 22 de dezembro de 2016. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 dez. 2016b. Seção 1, p. 88.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Nota Técnica Conjunta. **DFIP/SDA/MAPA – GGIMP/ANVISA/MS**. Brasília, 23 abr. 2012b.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília, ANVISA. 2019a. 477 p.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 10, de 09 de março de 2010. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 mar. 2010. Seção 1, p.2.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 34, de 7 de agosto de 2015. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 out. 2015. Seção 1, p. 41.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 140, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 mai. 2003. Seção 1, p.3.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Saniitária (ANVISA). Resolução RDC nº 200, de 26 de dezembro de 2017. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 jan. 2018. Seção 1, p. 63-71.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Saniitária (ANVISA). Resolução RDC nº 301, de 21 de agosto de 2019. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 22 ago. 2019b. Seção 1, p.64.

BRENNAN, T. A. *et al.* Hospital characteristics associated with adverse events and substandard care. **Journal of the American Medical Association**, v. 265, n. 24, p.3265-3269, 1991.

CABALLERO, M.L.; QUIRCE, S. Immediate hypersensitivity reactions caused by drug excipients: a literature review. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 30, n. 2, p. 86-100, 2020.

CALDEIRA, T. R.; NEVES, E. R. Z.; PERINI, E. Evolução histórica das bulas de medicamentos no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 4, p. 737-743, 2008.

CAMAPUM, J. L. R. *et al.* Bulas de medicamentos veterinários como ferramenta de informações técnicas e científicas. **Revista Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 715-725, 2014.

CATE, J. C. I. V.; HEDRICK, R. Propylene glycol intoxication and lactic acidosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 303, n. 21, p. 1230-1237, 1980.

CLAUS, M. A.; JANDREY, K. E.; POPPENG, R. H. Propylene glycol intoxication in a dog. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 21, n. 6, p. 679-683, 2011.

CORTINOVIS, C.; CALONI, F. Household food items toxic to dogs and cats. **Frontiers in Veterinary Sciences**, v. 3, n. 26, p. 1-7, 2016.

DAVIDSON, G. Veterinary compounding: regulation, challenges, and resources. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 1, p. 5-16, 2017.

BRYNE, N. *et al.* Veterinary pharmacovigilance in Europe: a survey of veterinary practitioners. **Veterinary Record Open**, v. 4, p. 1-11, 2017.

RAMOS, G.; MORAIS, D. C. M. Revisão de literatura sobre excipientes em farmácia de manipulação. **Foco**, 4, n. 5, p.11-26, 2013.

DUNAYER, E. K.; GWALTNEY-BRAND, S. M. Acute hepatic failure and coagulopathy associated with xylitol ingestion in eight dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 7, p. 1113-1117, 2006.

DYE, D.; WATKINS, J. Suspected anaphylactic reaction to Cremophor® EL. **British Medical Journal**, v. 280, n. 6228, p. 1353, 1980.

FACCI, J. *et al.* Evolução da legislação e das técnicas analíticas aplicadas a estudos de estabilidade de insumos e produtos farmacêuticos. **Química Nova**, v. 43, n. 7, p. 959-973, 2020.

GAWANDE, A. A. *et al.* The incidence and nature of surgical adverse events in Colorado and Utah in 1992. **Surgery**, v. 126, p. 66-75, 1999.

GELLER, M. *et al.* Avaliação imunodermatológica da resposta ao propilenoglicol e ao butilenoglicol - revisão bibliográfica sistemática. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, n. 7, p. 234-239,2010.

- GONÇALVES, S. A. *et al.* Bulas de medicamentos como instrumento de informação técnico-científica. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 1, p. 33-39, 2002.
- GRABITSKE, H. A.; SLAVIN, J. L. Gastrointestinal effects of low-digestible carbohydrates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 4, p. 327-360, 2009.
- HAY, W. P. *et al.* One percent sodium carboxymethylcellulose prevents experimentally induced adhesions in horses. **Veterinary Surgery**, v. 30, n. 3, p. 223-227, 2001.
- HE, T. *et al.* Colonic fermentation may play a role in lactose intolerance in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 1, p. 58-63, 2006.
- HOUSTON, D. M.; HEAD, L. L. Acute alcohol intoxication in a dog. **Canadian Veterinary Journal**, v. 34, p. 41-42, 1993.
- KOHN, L. T. *et al.* **To err is human: building a safer health system.** Washington: National Academy Press, 2000. 312 p.
- LAVERGNE, S. N. *et al.* Potential cutaneous hypersensitivity reaction to an inactive ingredient of thyroid hormone supplements in a dog. **Veterinary Dermatology**, v. 27, n. 1, p. 53-56, 2016.
- LEE, J. A. Emergency management and treatment of the poisoned small animal patient. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 43, n. 4, p. 757-771, 2013.
- LUCAS, C. D.; HALLAGAN, J. B.; TAYLOR, S. L. The role of natural color additives in food allergy. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 43, p. 195-216. 2001.
- MACHADO, T. S. *et al.* Adequabilidade das bulas veterinárias segundo a legislação, quanto instrumento técnico de caráter informativo. **Revista Biotecnologia & Ciência**, v. 6, n. 2, p. 28-37, 2017.
- MODESTO, A. C. F. *et al.* Reações adversas a medicamentos e farmacovigilância: conhecimentos e condutas de profissionais de saúde de um hospital da rede sentinela. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v. 40, n. 3, p. 401-410, 2016.
- NAVARRE, C. B. *et al.* Analysis of first gastric compartment fluid collected via percutaneous paracentesis from healthy llamas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 6, p. 812-815, 1999.
- NUTTALL, T.; COLE, L.K. Ear cleaning: the UK and US perspective. **Veterinary Dermatology**, v. 15, n. 2, p. 127-136, 2004.
- PESSANHA, A. F. V. *et al.* Influência dos excipientes multifuncionais no desempenho dos fármacos em formas farmacêuticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 2, p. 136-145, 2012.
- PIFFERI, G.; RESTANI, P. The safety of pharmaceutical excipients. **Il Farmaco**, v. 58, n. 8, p. 541-550, 2003.

- QIU, S. *et al.* Complement activation associated with polysorbate 80 in beagle dogs. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 1, p. 144-149, 2013.
- ROWE, R.; SHESKEY, P.; QUINN, M. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6. ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. 944 p.
- SCHMID, R. D.; HOVDA, L. R. Acute hepatic failure in a dog after xylitol ingestion. **Journal of Medical Toxicology**, v. 12, n. 2, p. 201-205, 2016.
- SENA, L. C. S. *et al.* Excipientes farmacêuticos e seus riscos à saúde: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, v. 5, n. 4, p.25-34, 2014.
- SILVA, A. V. A. D. *et al.* Presença de excipientes com potencial para indução de reações adversas em medicamentos comercializados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 397-405, 2008.
- SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Pharmacovigilance and adverse reactions to the medicinal plants and herbal drugs: a reality. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.
- SOMBERG, J. C. *et al.* Pharmacology and toxicology of a new aqueous formulation of intravenous amiodarone (amio-aqueous) compared with Cordarone IV. **American Journal of Therapeutics**, v. 12, n. 1, p. 9-16, 2005.
- STEINBERG, M. *et al.* A new approach to the safety assessment of pharmaceutical excipients: the safety committee of the international pharmaceutical excipients council. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 149-154, 1996.
- TANAKA, M. Multidisciplinary team approach for elderly patients. **Geriatrics and Gerontology International**, v. 3, n. 2, p. 69-72, 2003.
- THIEL, G.; HERMLE, M.; BRUNNER, F. P. Acutely impaired renal function during intravenous administration of cyclosporine A: a cremophore side-effect. **Clinical Nephrology**, v. 25, p. S40-2, 1986.
- TOOD, J. M.; POWELL, L. L. Xylitol intoxication associated with fulminant hepatic failure in a dog. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 17, n. 3, p. 286-289, 2007.
- THRALL, M. A. *et al.* Ethanol toxicosis secondary to sourdough ingestion in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 184, n. 12, p. 1513-1514, 1984.

Capítulo 19

Cultivo celular: aspectos gerais e aplicação em Medicina Veterinária



Théo Matos Arantes Moraes¹
Anderson Barros Archanjo²
Thaís Gonçalves Tavares³
Thais Stinghel Togneri⁴
Amanda Azevedo Assis⁵
Leonardo Oliveira Trivilin⁶
Jankerle Neves Boeloni⁷

¹Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: theomamoraes@gmail.com

²Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: andersonarchanjo@gmail.com

³Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: thastavares@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: thaisstingheltogneri@gmail.com

⁵Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: amandhaassis@hotmail.com

⁶Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: leotrivilin@gmail.com

⁷Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jankerle@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de células animais *in vitro*, existe há pouco mais de 100 anos, em que os primeiros pesquisadores contribuíram para o desenvolvimento da técnica e despertaram o interesse por mais pesquisas e trabalhos na área (BARBOSA *et al.*, 2015). O cultivo celular é definido por um conjunto de práticas que permitem o estudo e observação de células mantidas em sistema *in vitro*, constituído de nutrientes e condições de temperatura, pH e osmolaridade controladas, para preservar ao máximo suas características fisiológicas, bioquímicas e genéticas (MENDONÇA; BATISTA, 2015).

Os primeiros cultivos *in vitro* foram realizados a partir de fragmentos de tecidos imersos em substâncias próprias para o desenvolvimento das células, como plasma ou soro de origem animal, mantidos em frascos e, atualmente, apresenta diversas aplicações, desde pesquisas oncológicas até a fabricação de vacinas, seleção e melhoria de medicamentos, regeneração de tecidos e órgãos com algum tipo de dano biológico, produção de proteína recombinante, terapia genética, biologia de células tronco e tecnologia de fertilização *in vitro* (BARBOSA *et al.*, 2015). Muitos desses avanços só foram possíveis graças ao estabelecimento de linhagens celulares e a descoberta sobre as especificidades dos meios de cultivo para cada tipo celular, seguindo protocolos de assepsia e biossegurança laboratoriais (ALVES; GUIMARÃES, 2010; BARBOSA *et al.*, 2015).

Portanto, este capítulo tem como objetivo apresentar um breve histórico sobre o cultivo de células animais e sua evolução técnica, compreender sobre o cultivo *in vitro* e suas implicações, bem como conhecer as aplicações e perspectivas terapêuticas em medicina veterinária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO E EVOLUÇÃO TÉCNICA

Um breve histórico da evolução técnica do cultivo celular *in vitro* está apresentado na Figura 1.



Figura 1 – Cronologia sobre importantes eventos da história do cultivo celular. **1** Primórdios dos estudos que levaram a experimentação com células; **2** Estudos iniciais de cultivo celular; **3** Evolução das descobertas com cultivo celular.

Fonte: Os autores.

O avanço das pesquisas possibilitou, em 1981, os primeiros cultivos de células tronco embrionárias (CTE) a partir de embriões pré-implantados de camundongos, e cuja característica pluripotente origina qualquer tipo celular do organismo por meio da diferenciação *in vitro*. Desta maneira as CTE podem ser usadas não apenas para o crescimento de tecidos para implantes, mas também para teste de novas drogas para cura de enfermidades e identificar genes com potencial problemático (ROCHA *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, as pesquisas estão voltadas para o uso de células tronco, com maior notoriedade e ampliação, a fim de avançar no desenvolvimento de terapias que necessitam de rápida resolução. Irão evoluir ainda mais, inclusive no campo da medicina veterinária, tanto para produção de novas vacinas e desenvolvimento das existentes, quanto para possíveis novas aplicações terapêuticas (VOGA *et al.*, 2020).

2.2 CONCEITOS BÁSICOS DE CRESCIMENTO *IN VITRO*

A representação do crescimento das células em cultura exibe uma curva com padrão sigmoide de proliferação (ECACC; SIGMA-ALDRICH, 2018; LÉO *et al.*, 2008). Assim, é importante conhecer e registrar as características de uma linhagem celular antes de realizar qualquer experimento, pois a biologia celular é alterada em cada fase da curva e uma modificação no padrão de crescimento pode ocasionar prejuízos experimentais (ALVES; GUIMARÃES, 2010; ECACC; SIGMA-ALDRICH, 2018).

A curva de crescimento celular apresenta quatro etapas e cada uma delas representa uma fase do crescimento em cultura. Essas fases são (Figura 2): a fase de latência (lag), a de crescimento exponencial ou logarítmica (log), a estacionário ou platô e a fase de senescência ou morte (LÉO *et al.*, 2008). O crescimento celular pode ser matematicamente representado pela seguinte equação geral:

$$dX/dt = \mu.X$$

Onde μ se refere à taxa de crescimento celular específica, X é a concentração celular e t é o tempo de cultura (LÉO *et al.*, 2008).

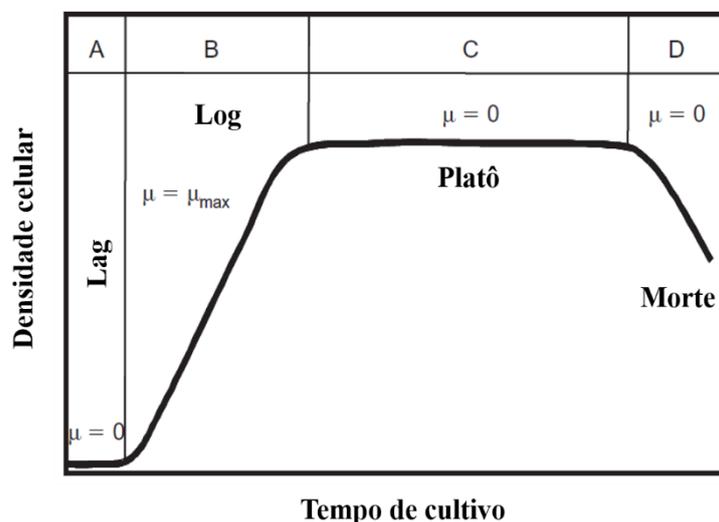


Figura 2 – Padrão normal da curva de crescimento da célula animal, em μ que é a taxa de crescimento celular específica. A fase lag (A) representa o período de adaptação à cultura, seguido por uma fase de crescimento celular exponencial (B) até a obtenção de uma fase estacionária ou platô (C), na qual não há aumento no número de células. A cultura atinge a fase de senescência (D) quando a porcentagem de células em divisão torna-se menor que a porcentagem de células morrendo.

Fonte: Adaptado de Léo *et al.* (2008).

A primeira etapa é a fase lag e ela ocorre imediatamente após a semeadura ou ressemeadura das células. Essa fase pode durar até 48 horas, sendo esse período essencial para a célula se recuperar do congelamento ou tripsinização, reconstruir o citoesqueleto e secretar uma matriz extracelular para facilitar a ligação entre as células e o substrato (ASSANGA *et al.*, 2013). Ou seja, é um período de adaptação em que não ocorre proliferação ou as taxas de proliferação são baixas e sua duração depende da densidade celular e do estágio de crescimento da cultura. Ocorre ainda uma intensa atividade metabólica para preparar as células para o novo ciclo celular (ALVES; GUIMARÃES, 2010; FRESHNEY, 2010).

Após a fase de latência, as células entram na fase logarítmica, na qual a proliferação está ativa e o número de células aumenta exponencialmente. Nessa fase, a porcentagem de células em divisão pode chegar a 100%, pois elas estão no seu melhor estado fisiológico (LÉO *et al.*, 2008). Esta é a melhor fase para estudo com drogas e agentes químicos que estimulam ou inibem o crescimento celular, bem como os efeitos imunomoduladores e de eliminação de radicais desses agentes (FRESHNEY, 2006). Cada linhagem celular apresenta um perfil cinético típico, no qual o tempo de duplicação da célula (td) pode ser determinado, uma vez que μ é constante e, nesta fase, atinge um valor máximo (μ_{max}), resultando na equação abaixo (LÉO *et al.*, 2008).

$$dt = \ln 2 / \mu_{max}$$

Na fase estacionária, ocorre a redução da taxa de crescimento celular devida às baixas concentrações de nutrientes e ao acúmulo de metabólitos inibitórios, podendo cessar quase completamente. Nessa fase, a divisão celular é equilibrada com a morte celular, e a porcentagem de células em divisão é de no máximo 10% (ALVES; GUIMARÃES, 2010; LÉO *et al.*, 2008). Quando as células atingem a confluência, o crescimento de células aderentes é inibido pelo contato célula a célula, em que a exposição da sua própria superfície de membrana ao meio de cultura é diminuída, podendo ocorrer aumento relativo na síntese de proteínas, bem como mudança na composição da superfície celular e modificação de carga (FRESHNEY, 2010).

Caso não ocorra o subcultivo e a renovação do meio nutricional, as células entrem no período de senescência no qual a morte celular não é compensada pelas células em proliferação, ou seja, ocorre uma redução drástica do número de células e o número de células mortas excede o de novas células (ALVES; GUIMARÃES, 2010; LÉO *et al.*, 2008).

2.3 VIDRARIAS E EQUIPAMENTOS

O material específico de cada laboratório de cultivo celular depende principalmente do tipo celular e da pesquisa que neles é realizada. No entanto, todos eles compartilham a necessidade de instrumentos básicos como recipientes de cultura celular (garrafas, placas de Petri ou placas multipoços); pipetas e pipetadores; seringas e agulhas; recipientes de descarte; ampla variedade de vidrarias e reagentes para preparo de meios de cultura e soluções; além das células para cultivo propriamente dito (ALVES; GUIMARÃES, 2010; EDUCATION, 2016).

Dentre os equipamentos necessários pode-se citar: (a) capela de fluxo laminar ou cabine de biossegurança que provavelmente é o equipamento mais importante, pois promove área de trabalho asséptica na manipulação das células e reagentes (ECACC; SIGMA-ALDRICH, 2018); (b) incubadora: promove ambiente apropriado para crescimento celular como controle de dióxido de carbono (CO₂) atmosférico, temperatura e grau de umidade (ECACC; SIGMA-ALDRICH, 2018); (c) contador de células (automatizado ou hemocitômetro): essencial para cinética de crescimento quantitativo (EDUCATION, 2016); (d) microscópio invertido: para examinar regularmente a morfologia das células, o estado saudável das células e inspecioná-las cada vez que forem manuseadas permitindo detectar quaisquer sinais de contaminação logo no início e contê-lo antes que se espalhe para outras culturas (EDUCATION, 2016); (e) centrífugas: necessárias para aumentar a concentração de células ou lavá-las de um reagente (FRESHNEY, 2010) ou para preparação de células para criopreservação (ECACC; SIGMA-ALDRICH, 2018); (f) outros equipamentos incluem: estufa e autoclave, para secagem e esterilização respectivamente, medidor de pH, deionizador de água, balança analítica de precisão, banho-maria, bomba de vácuo (ALVES; GUIMARÃES, 2010), geladeira e ultrafreezer (EDUCATION, 2016).

2.4 MEIOS DE CULTURA E SUPLEMENTAÇÃO

A manutenção e crescimento das células animais *in vitro* requerem condições similares *in vivo* com relação a temperatura, concentrações de oxigênio e dióxido de carbono, pH, osmolaridade e nutrientes (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008). Embora inicialmente tenha se usado meios naturais extraídos de tecidos e fluidos corporais como meio de cultivo, a necessidade de padronização da qualidade e aumento na demanda levaram ao desenvolvimento de meios de cultura quimicamente definidos (EDUCATION, 2016).

O meio de cultura é o componente mais importante do cultivo celular, pois fornece os nutrientes necessários, fatores de crescimento e hormônios para desenvolvimento das células, além de regular o pH e a pressão osmótica. Tais meios devem conter basicamente água, glicose, aminoácidos, vitaminas, sais minerais e soro (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008). A água é um componente importante na preparação de meios e soluções, mas representa uma fonte potencial de impurezas. Para evitar contaminação deve-se utilizar água com alto grau de pureza, como água ultrapura ou água deionizada (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Os meios frequentemente usados com linhagens celulares de mamíferos incluem: meio essencial mínimo de Eagle (MEM); meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM); meio RPMI 1640; meio CMRL 1066 e meio F12 de Ham. Para o cultivo de linhagens celulares aderentes, são adequados os meios CMRL 1066, MCDB 411, DMEM, F12, MCDB 301 e IMDM. Para células não transformadas, o meio DMEM, IMDM, MCDB 104, 105, 202, 401 e 501 são adequados. Cada uma dessas formulações basais pode ser suplementada com soro ou outras proteínas específicas (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008).

O MEM foi desenvolvido a partir do meio basal de Eagle (BME), aumentando o intervalo e a concentração dos constituintes. Por muitos anos, o MEM teve o uso mais geral de todos os meios. O DMEM foi desenvolvido para estudos de transformação de fibroblastos de camundongo e propagação viral. Ele tem o dobro das concentrações de aminoácidos do MEM, quatro vezes as concentrações de vitaminas e o dobro das concentrações de HCO_3^- e CO_2 para obter melhor proliferação. O RPMI 1640 foi desenvolvido para células linfóides. O meio CMRL 1066 foi desenvolvido para cultivar células L929 sem soro, mas tem sido usado sozinho ou em combinação com outros meios, como DMEM ou F12, para uma variedade de condições mais exigentes. O F12 de Ham foi desenvolvido para clonar células CHO em meio com baixo teor de soro e também é amplamente utilizado, particularmente para ensaios clonogênicos e culturas primárias, frequentemente combinados com DMEM. Muitas linhagens de células contínuas, culturas primárias de fibroblastos humanos, de roedores e aves e linhagens de células derivadas delas podem ser mantidas em meios relativamente simples, como o MEM, suplementado com soros (FRESHNEY, 2010).

Apesar da constituição química, os meios de cultivo normalmente são suplementados com 5% a 20% de soro. Atualmente, estão disponíveis comercialmente os soros de origem bovina, equina e humana. O mais comumente utilizado é o soro fetal bovino (ECACC; SIGMA-ALDRICH, 2018). O soro tem importância vital por possuir funções como: estimular o crescimento e outras atividades celulares por meio de hormônios e fatores de crescimento, aumentar a adesão celular por meio de proteínas específicas e fornecer proteínas para o

transporte de hormônios, minerais e lipídios (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008). As desvantagens são o custo, problemas com padronização, características específicas do soro e variabilidade, além da possibilidade de contaminação dependendo da sua procedência (EDUCATION, 2016).

Costuma-se também suplementar os meios com tampões e indicadores de pH, antibióticos e fungicidas. Estes dois últimos são utilizados nos meios de cultivo a fim de controlar a contaminação microbiológica, sendo os compostos mais utilizados gentamicina, estreptomicina, penicilina e anfotericina (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Seu uso, no entanto, deve ser calculado porque alguns antibióticos podem ter efeito citotóxico, mesmo quando altas concentrações de soro são utilizadas (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008).

Dentre os fatores de crescimento, destaca-se: (a) fator de crescimento de fibroblastos (FGF), agente mitogênico potente para vários tipos de culturas derivados de células mesodérmicas e neuroectodérmicas, bem como para várias linhagens de células transformadas; (b) fator de crescimento epidérmico (EGF), agente mitogênico potente para muitas culturas primárias e para células mesenquimais e epiteliais; (c) fator de crescimento do nervo (NGF), induz a diferenciação e aumenta a sobrevivência de neurônios simpáticos e células PC12 em cultura; (d) fator de crescimento transformador (TGF), induz crescimento celular independentemente da adesão em muitas células mesenquimais; (e) fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), tem ação sinérgica com EGF e IGF-1, sendo também um agente mitogênico potente; (f) fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1 e IGF-2), tendo o IGF-1 efeito em várias células mesenquimais e o IGF-2 efeito estimulador do crescimento; (g) insulina que ativa mitoses e promove metabolismo anabólico, oxidação, síntese de glicogênio e transporte de aminoácidos; e (h) interleucinas, especialmente IL-6 necessárias para algumas células como hibridomas, células tronco e hematopoiéticas (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008).

2.5 BIOSSEGURANÇA E CONTAMINAÇÃO DO CULTIVO CELULAR

Em todas as rotinas de laboratório, inicialmente deve-se planejar as atividades propostas e todo pessoal deve ser orientado sobre os possíveis riscos, de modo que sejam realizadas com segurança (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Sendo assim, o objetivo fundamental de qualquer programa de biossegurança é reduzir ou eliminar a exposição dos trabalhadores e do ambiente a agentes biológicos potencialmente perigosos. O elemento mais importante de segurança em

um laboratório de cultivo celular é a aderência fiel às práticas e técnicas microbiológicas seguras (EDUCATION, 2016).

A redução desses riscos envolve a avaliação das culturas de células trabalhadas, levando em consideração o tipo de manipulação e a implementação de medidas de contenção apropriadas, como os equipamentos de segurança e infraestrutura. Considera-se ainda, aspectos como a existência de terapias ou profilaxia eficazes. A avaliação desses critérios foi usada para classificar os patógenos em classes de risco biológico, distribuídos em quatro níveis de biossegurança. Esses níveis variam do 1, onde é improvável que um agente biológico cause doença humana, ao 4, onde o agente causa doenças humanas graves e apresenta risco sério para os trabalhadores com potencial de propagação para a comunidade. Ao contrário dos agentes de grupos de risco mais baixos, geralmente não há profilaxia ou tratamentos eficazes disponíveis para os agentes biológicos do nível 4 (PAUWELS *et al.*, 2007).

Esses níveis estão intimamente ligados às categorias de contenção. Com o aumento do risco, medidas organizacionais adicionais e equipamentos de laboratório especializados devem ser implementados. Diretrizes apropriadas foram desenvolvidas pela maioria dos países e são baseadas em diretrizes emitidas por organizações internacionais como a Organização Mundial de Saúde (DOBLHOFF-DIER; STACEY, 2006). No Brasil, são regulados e detalhados de acordo com a Resolução nº 50 de 21 de fevereiro de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2002).

Para a cultura de células animais, o nível de risco depende da linhagem celular utilizada e também se baseia na probabilidade de causar danos aos humanos. As diferentes classificações são: (a) baixo risco - linhagem contínua de célula não humana/não primata e algumas linhagens celulares humanas bem caracterizadas; (b) médio risco - linhagens celulares de mamíferos mal caracterizadas; e (c) alto risco - células primárias derivadas de tecido ou sangue humano/primata; linhagens celulares com patógenos endógenos e linhagens usadas após infecção experimental, nas quais a caracterização depende do agente infectante (ECACC; SIGMA-ALDRICH, 2018).

Os equipamentos de biossegurança incluem barreiras primárias como recipientes fechados e as cabines de biossegurança, o item mais importante na contenção de respingos ou aerossóis infecciosos gerados pelos procedimentos microbiológicos. Há também os equipamentos de proteção individual (EPI) que formam uma barreira entre a pessoa e o agente perigoso, são eles luvas de procedimento, jalecos, toucas, protetores de pé, botas e calçados fechados, máscaras, protetores faciais e óculos de proteção (EDUCATION, 2016).

Com relação a assepsia do cultivo celular, devem ser adquiridas medidas de controle e prevenção que evitem a contaminação das culturas (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Fatores como esterilização incorreta dos materiais, falta de higiene com as vestimentas, manipulação sem cuidado e falta de atenção na execução dos procedimentos, falha de higienização do laboratório e utensílios podem favorecer a contaminação das culturas (SATHYAJITH, 2018). Em casos de contaminação é importante identificar e eliminar os contaminantes para, se possível, contê-las e evitar que se espalhe para outras culturas do laboratório (ALVES; GUIMARÃES, 2010; SATHYAJITH, 2018).

Os principais contaminantes das culturas celulares são bactérias, fungos, leveduras, micoplasma e agentes químicos (BATES; WERNESPACH, 2018), podendo impactar adversamente as células em cultura, variando de destruição total da cultura, mutação, mudanças fenotípicas até mudanças relativamente pequenas na morfologia ou taxa de crescimento (NIMS; PRICE, 2017). As bactérias estão presentes no ar, nas superfícies, no trato digestivo de humanos e animais, dentre outros. A contaminação bacteriana na cultura celular inviabiliza a sua utilização, pois devido às suas altas taxas de crescimento, competem pelos nutrientes do meio, fazendo com que ocorra morte celular (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Principalmente em meios muito ricos, as bactérias podem ser detectadas em poucos dias de contaminação, seja por observação microscópica ou por seus efeitos diretos na cultura, como alterações de pH, turbidez e morte celular (BATES; WERNESPACH, 2018).

Com a introdução de antibióticos nos meios de cultura, os micoplasmas passaram a ser os contaminantes detectados com maior frequência em cultivo de células de animais *in vitro* (MIYAKI *et al.*, 1989). A contaminação por micoplasmas ocorre com facilidade, pois se encontram na via respiratória humana. Os laboratórios que testam de forma rotineira a contaminação por micoplasmas têm uma incidência muito menor desse problema, sendo importante testar pelo menos uma vez por mês (BATES; WERNESPACH, 2018). A descontaminação envolve a utilização de outros antibióticos no meio de cultura, como ciprofloxacina e kanamicina associada à tetraciclina, mas nem sempre são totalmente eficazes (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

As leveduras são fungos unicelulares, não-filamentosas e geralmente ovais, podendo apresentar morfologia alongada ou esférica. Enquanto os bolores são fungos pluricelulares, com crescimento característico de aspecto aveludado ou cotonoso (VIEIRA; FERNANDES, 2012). As leveduras geralmente fazem com que o meio de crescimento fique muito turvo, enquanto que os bolores produzem micélio ramificado, que ocasionalmente aparecem como aglomerados “peludos” flutuando no meio de cultura (BATES; WERNESPACH, 2018).

Os contaminantes químicos normalmente surgem do manuseio ou origem inadequada de reagentes de cultura de células, vidrarias ou outros de consumíveis. A ocorrência da contaminação química é amenizada por meio de adesão às melhores práticas de obtenção e manuseio dos materiais (NIMS; PRICE, 2017).

De modo geral, algumas recomendações envolvendo as boas práticas para segurança laboratorial incluem: conhecimentos básicos de microbiologia por parte dos operadores; uso constante dos EPIs e troca dos mesmos quando contaminados seguido de descarte em lixo apropriado; uso de roupas de trabalho adequadas; lavagem das mãos após procedimentos e ao sair do laboratório; não ter contato entre os materiais ou ferramentas no local de trabalho e a boca do operador; manusear com cuidado materiais perfurocortantes; ter cuidado e minimizar a criação de aerossóis e/ou respingos; descontaminar frequentemente bancadas e equipamentos; reportar quaisquer incidentes que possam resultar em exposição infecciosa ao pessoal responsável (DOBLHOFF-DIER; STACEY, 2006; EDUCATION, 2016).

2.6 APLICABILIDADE DO CULTIVO CELULAR EM MEDICINA VETERINÁRIA

Os avanços com o cultivo celular e suas inúmeras aplicações só foram possíveis devido ao estabelecimento de linhagens celulares estáveis e descobrimento de sistemas de cultivo específicos para cada tipo celular. Dentre as inúmeras aplicações destacam-se desde a produção biotecnológica de moléculas recombinantes, doenças degenerativas, traumas, anticorpos monoclonais, vacinas veterinárias e humanas (BARBOSA *et al.*, 2015). Assim como uma das vacinas contra a COVID-19, do laboratório chinês Sinovac, utiliza a plataforma de vírus inativado, com cultivo celular do vírus em células vero com posterior inativação (LIMA; ALMEIDA; KFOURI, 2021).

A terapia com células tronco tem sido alvo de intensas pesquisas básicas, como potencial auxiliar no tratamento de pacientes com COVID-19. Em estudo realizado com 10 pacientes acometidos por quadro de pneumonia decorrente da infecção pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), após aplicação de células tronco mesenquimais (em sete pacientes, três receberam placebo) todos os pacientes tratados apresentaram melhora clínica significativa. No acompanhamento observou-se diminuição da infiltração torácica, diminuição de citocina pró-inflamatória e aumento da taxa de linfócitos periféricos, além do aumento da expressão gênica de fatores anti-inflamatórios e tróficos. Apesar de serem necessários estudos com maior número de pacientes, os dados publicados sugerem que as

células tronco podem propiciar tratamento seguro e eficaz para os pacientes que apresentam quadro de pneumonia decorrente da infecção pelo SARS-CoV-2 (MAZZEO; SANTOS, 2020).

Na medicina veterinária as células tronco, que podem ser de origem embrionária ou de tecidos adultos vêm sendo utilizadas cada vez mais e apresentando resultados progressivamente mais relevantes (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Em estudos relacionados às lesões osteoarticulares, os pacientes apresentam uma melhora significativa na claudicação, dor e amplitude do movimento, e nas lesões tendíneas percebe-se melhor qualidade do tecido tendíneo reduzindo a taxa de recidivas. Em se tratando de aplasia mieloide, resultados promissores vêm sendo apresentados, gerando uma nova perspectiva de tratamento (SANTOS; WINCK; BRAGA, 2017).

Uma das lesões neuromusculares mais comuns em humanos e animais são as lesões da medula espinhal, que geralmente resultam em deficiências para toda a vida. Nos casos de lesão induzida por trauma ou hérnia de disco intervertebral em cães os tratamentos com células tronco foram testados com resultados benéficos (VOGA *et al.*, 2020). Quanto à cicatrização cutânea, para o tratamento de feridas crônicas com inflamação grave e resposta hiperplásica, as células tronco podem ser uma opção potencialmente viável devido ao seu potencial anti-inflamatório e regenerativo (OJEH *et al.*, 2015). Estudos em modelos animais mostraram o efeito benéfico na cicatrização de feridas em cabras, ovelhas, cavalos e cães, além do tratamento de dermatite atópica, uma das formas mais comuns de doença de pele em cães. A terapia com células tronco também é investigada na oftalmologia. Com base nos estudos publicados, possui ótimos resultados na medicina regenerativa dos olhos e apresenta soluções inovadoras para doenças oculares em animais, como úlceras de córnea, ceratite imunomediada e eosinofílica, uveíte recorrente e ceratoconjuntivite seca (VOGA *et al.*, 2020).

Estudos realizados em modelos animais representam uma referência para o uso de células tronco na regeneração do tecido orodental. No entanto, pesquisas ainda são necessárias para comprovar a eficácia e utilidade desses tratamentos, ainda que resultados encorajadores tenham sido obtidos no tratamento da gengivoestomatite crônica felina (VOGA *et al.*, 2020). Alguns cães são refratários aos tratamentos tradicionais para doença inflamatória intestinal (DII) e a aplicação única intravenosa de células tronco resultou em remissão clínica em 9 de 11 cães com DII grave 6 semanas após o tratamento, juntamente com aumento significativo nos níveis séricos de albumina, cobalamina e folato (PÉREZ-MERINO *et al.*, 2015). Sendo a doença renal crônica (DRC) uma condição médica comum em gatos geriátricos e tendo o transplante renal como única terapia possível de restaurar a função renal, terapias baseadas em

células tronco podem apresentar opções de tratamento menos agressivas, mas ainda necessitam de mais estudos (VOGA *et al.*, 2020).

Enquanto na medicina as terapias com células tronco cardíacas direcionadas ao reparo do miocárdio após infarto estão sendo usadas por vários anos, na veterinária (por essa condição similar ser rara), estuda-se tratamento para cardiomiopatia dilatada em cães grandes e gigantes (POGUE *et al.*, 2013). Além de patologias do sistema reprodutivo como problemas de fertilidade e endometriose (VOGA *et al.*, 2020), a terapia com células tronco também é investigada como potencial tratamento da mastite em animais de fazenda, mostrando efeito antiproliferativo contra a mastite mediada por *Staphylococcus aureus* em vacas (CAHUASCANCO *et al.*, 2019) e efeito reparador e antifibrótico na mastite crônica de cabras (COSTA *et al.*, 2019).

Outra aplicação é a técnica de produção *in vitro* de embriões, uma biotécnica importante para exploração do potencial genético de fêmeas bovinas e que tem sido utilizada em escala comercial no Brasil e no mundo. Além de ser muito importante na multiplicação dos animais, de forma mais rápida e com características de grande interesse econômico (MELLO *et al.*, 2016).

A terapia celular tem como objetivo restabelecer a função ou estrutura de um tecido por meio da utilização de células, e vem sendo utilizada nos casos de traumas, doenças degenerativas ou lesões teciduais. Para isso, é de extrema importância o conhecimento da célula em seu ambiente original (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Ainda que no passado estudos demonstraram que o uso de células tronco poderia, em raros casos, causar efeitos colaterais (JEONG *et al.*, 2011). Nos dias atuais, tem-se outros apontando a segurança que esse modelo de tratamento tem alcançado, chegando a ser aplicado cada vez mais na rotina das clínicas e hospitais veterinários (RAMOS, 2019). Esse avanço aliado a maior aceitação dessa forma de terapia, pode estar relacionado ao melhor entendimento dos efeitos adversos e dos mecanismos envolvidos na fisiologia sistêmica do animal após a terapêutica com células tronco (MARKOSKI, 2016).

Entretanto, outros desafios precisam ser contornados para um melhor cenário na utilização de células tronco na rotina da medicina veterinária, como a obtenção dessas células, pois os locais de coletas nos animais doadores podem gerar desconforto; a escolha da melhor via de administração, visando utilizar a via que gere menos efeitos secundários; reações inflamatórias adversas (KRIECK, 2019; MAIA, 2012).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância do cultivo celular é indiscutível, essa técnica é essencial tanto a nível de pesquisa quanto a nível de clínica. Muitos avanços na ciência foram necessários para chegar nos resultados que se têm atualmente, e muitos outros se farão necessários para o futuro. Mas o que se sabe é que independente da época, entender o conceito básico, os tipos de cultura, a variedade de vidrarias, equipamentos e meios de culturas são etapas essenciais para obtenção de bons estudos/experimentos com cultivo celular. Outro ponto importante é compreender a necessidade de avanços nos estudos e experimentos dessa técnica para a medicina veterinária.

4 REFERÊNCIAS

- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, v. 2. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. p. 215-253.
- ASSANGA, I. *et al.* Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 4, n. 4, p. 60-70, 2013.
- ASSIS, M. F. L. de. *et al.* Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em medicina e biologia. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 425-432, 2007.
- BARBOSA, B. S. de. *et al.* Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, n. 2, p. 334-347, 2015.
- BATES, M. K.; WERNESPACH, D. **Contaminação em cultura de células**: entendendo as causas e gerenciando riscos. São Paulo: Datamed, 2018. Disponível em: <<https://datamedweb.com.br/2018/08/contaminacao-em-cultura-de-celulas/>>. Acesso em: 18 mai. 2021.
- BRASIL. Resolução - RDC nº 50, de 21 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 21 fev. 2002.
- CAHUASCANCO, B. *et al.* Bovine fetal mesenchymal stem cells exert antiproliferative effect against mastitis causing pathogen *Staphylococcus aureus*. **Veterinary Research**, v. 50, n. 1, p. 1-10, 2019.
- CALDAS, C. Vida, morte e imortalidade: desvendando a história das células HeLa. **Ciência e Cultura**, v. 62, n. 2, p. 17-18, 2010.
- CALDERÓN, J. L. R. Vacunas, biotecnología y su relación con el aborto provocado. **Cuadernos de Bioética**, v. 19, n. 2, p. 321-353, 2008.

- COSTA, C. R. M. *et al.* Adipose stem cells in reparative goat mastitis mammary gland. **Plos One**, v. 14, n. 10, p. 1-19, 2019.
- DOBLHOFF-DIER, O.; STACEY, G. Cell lines: applications and biosafety. In: FLEMING, D. O.; HUNT, D. L. **Biological safety: principles and practices**. 4. ed. Washington: ASM Press, 2006. p. 221-240.
- ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures); SIGMA-ALDRICH. **Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook**. 4. ed. Darmstadt: Merck KGaA, 2018. Disponível em: <<https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/161749/ecacc-lab-handbook-fourth-edition.pdf>>. Acesso em: 22 mai. 2021.
- EDUCATION, G. **Cell culture basics handbook**. Massachusetts: Thermo Fisher Scientific, 2016. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1563-PJT1267-COL31122-Gibco-Cell-Culture-Basics-Handbook-Global-FLR.pdf>>. Acesso em: 22 mai. 2021.
- FRESHNEY, R. I. Basic principles of cell culture. In: VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; FRESHNEY, R. **Culture of cells for tissue engineering**. 7. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006. p. 3-22.
- _____. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 6. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 732 p.
- JEONG, J. O. *et al.* Malignant tumor formation after transplantation of short-term cultured bone marrow mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction and diabetic neuropathy. **Circulation Research**, v. 108, n. 11, p. 1340-1347, 2011.
- KRIECK, A. M. T. **Resposta de anticorpos à aplicação intra-articular de células tronco mesenquimais alo gênicas em equinos**. 2019. 46 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia Animal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2019.
- LÉO, P. *et al.* Animal cells: basic concepts. In: CASTILHO, L. R. *et al.* **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. 1. ed. New York: Taylor & Francis Group, 2008. p. 13-38.
- LIMA, E. J. F.; ALMEIDA, A. M.; KFOURI, R. A. Vacinas para COVID-19-o estado da arte. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 21, n. 1, p. 13-19, 2021.
- MAIA, L. **Coleta, processamento, caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais e sua viabilidade de aplicação por via intratecal em equinos**. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.
- MARKOSKI, M. M. Advances in the use of stem cells in veterinary medicine: from basic research to clinical practice. **Scientifica**, v. 2016, p. 1-12, 2016.

MAZZEO, A.; SANTOS, E. J. Mesenchymal stem cells in the treatment of coronavirus-induced pneumonia (COVID-19). **Einstein (São Paulo)**, v. 18, p.1, 2020.

MELLO, R. R. C. *et al.* Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 2, p. 58-64, 2016.

MENDONÇA, R. Z.; BATISTA, F. R. X. Meio de cultivo celular: conceito. In: RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. v. 1. São Paulo: Blucher, 2015. p. 57-88.

MIYAKI, C. *et al.* *Mycoplasma* como contaminante de culturas celulares mantidas em laboratórios de instituições particulares e oficiais. **Revista de Saúde Pública**, v. 23, n. 1, p. 39-44, 1989.

MORAES, A. M.; MENDONÇA, R. Z.; SUAZO, C. A. T. Culture media for animal cells. In: CASTILHO, L. R. *et al.* **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. New York: Taylor & Francis, 2008. p. 111-128.

NIMS, R. W.; PRICE, P. J. Best practices for detecting and mitigating the risk of cell culture contaminants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 53, n. 10, p. 872–879, 2017.

OJEH, N. *et al.* Stem cells in skin regeneration, wound healing, and their clinical applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 25476-25501, 2015.

PAUWELS, K. *et al.* Animal cell cultures: risk assessment and biosafety recommendations. **Applied Biosafety**, v. 12, n. 1, p. 26-38, 2007.

PÉREZ-MERINO, E. M. *et al.* Safety and efficacy of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: clinical and laboratory outcomes. **The Veterinary Journal**, v. 206, n. 3, p. 385-390, 2015.

POGUE, B. *et al.* Stem-cell therapy for dilated cardiomyopathy: a pilot study evaluating retrograde coronary venous delivery. **Journal of Small Animal Practice**, v. 54, n. 7, p. 361-366, 2013.

RAMOS, F. O. **Uso de célula tronco mesenquimal alógena derivada de tecido adiposo em cães com dermatite atópica: eficácia e segurança**. 2019. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

ROCHA, A. S. *et al.* Considerações sobre células tronco embrionárias. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 3, p. 303-313, 2012.

SANTOS, E. J. C.; WINCK, C. P.; BRAGA, C. L. Estudo eficácia e segurança terapêutica das células-tronco mesenquimais alogênicas no tratamento de felinos acometidos pela doença renal crônica e resistentes a eritropoetina sintética. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**. v. 1, n. 2, p. 296-309, 2017.

SATHYAJITH, D. **Common problems in cell culture**. News-Medical, 2018. Disponível em: <<https://www.news-medical.net/life-sciences/Common-Problems-in-Cell-Culture.aspx>>. Acesso em: 19 mai. 2021.

VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. **Microbiologia geral**. Goiás: Rede e-Tec Brasil, 2012. 100 p.

VOGA, M. *et al.* Stem cells in veterinary medicine—current state and treatment options. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. 278, p. 1-20, 2020.

WILMUT, I.; TAYLOR, J. Cloning after Dolly. **Cellular Reprogramming**, v. 20, n. 1, p. 1-3, 2018.



ISBN: 978-65-86981-19-3

CSL



9 786586 981193