

# Ciências Biológicas e da Saúde:

Investigação  
e Prática

Juan Carlos Cancino-Diaz  
(organizador)

VOL II

 EDITORA  
ARTEMIS  
2023

# Ciências Biológicas e da Saúde:

## Investigação e Prática

Juan Carlos Cancino-Diaz  
(organizador)

VOL II



**EDITORA  
ARTEMIS**  
2023



O conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons Atribuição-Não-Comercial NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0). Direitos para esta edição cedidos à Editora Artemis pelos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento, desde que sejam atribuídos créditos aos autores, e sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

A responsabilidade pelo conteúdo dos artigos e seus dados, em sua forma, correção e confiabilidade é exclusiva dos autores. A Editora Artemis, em seu compromisso de manter e aperfeiçoar a qualidade e confiabilidade dos trabalhos que publica, conduz a avaliação cega pelos pares de todos manuscritos publicados, com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

<b>Editora Chefe</b>	Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira
<b>Editora Executiva</b>	M. <sup>a</sup> Viviane Carvalho Mocellin
<b>Direção de Arte</b>	M. <sup>a</sup> Bruna Bejarano
<b>Diagramação</b>	Elisangela Abreu
<b>Organizador</b>	Prof. Dr. Juan Carlos Cancino-Díaz
<b>Imagem da Capa</b>	Pro500/123RF
<b>Bibliotecário</b>	Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

#### Conselho Editorial

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ada Esther Portero Ricol, *Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”*, Cuba  
Prof. Dr. Adalberto de Paula Paranhos, Universidade Federal de Uberlândia  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Amanda Ramalho de Freitas Brito, Universidade Federal da Paraíba  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Clara Monteverde, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Júlia Viamonte, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal  
Prof. Dr. Ángel Mujica Sánchez, *Universidad Nacional del Altiplano*, Peru  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela Ester Mallmann Centenaro, Universidade do Estado de Mato Grosso  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Begoña Blandón González, *Universidad de Sevilla*, Espanha  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carmen Pimentel, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Catarina Castro, Universidade Nova de Lisboa, Portugal  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cirila Cervera Delgado, *Universidad de Guanajuato*, México  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Neves, Universidade Aberta de Portugal  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Padovesi Fonseca, Universidade de Brasília-DF  
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos, Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof. Dr. David García-Martul, *Universidad Rey Juan Carlos de Madrid*, Espanha  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Deuzimar Costa Serra, Universidade Estadual do Maranhão  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dina Maria Martins Ferreira, Universidade Estadual do Ceará  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edith Luévano-Hipólito, *Universidad Autónoma de Nuevo León*, México  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eduarda Maria Rocha Teles de Castro Coelho, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal  
Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers, Universidade de São Paulo  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhoras, Universidade Federal de Roraima, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elvira Laura Hernández Carballido, *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, México

Prof.ª Dr.ª Emilas Darlene Carmen Lebus, *Universidad Nacional del Nordeste/ Universidad Tecnológica Nacional, Argentina*  
Prof.ª Dr.ª Erla Mariela Morales Morgado, *Universidad de Salamanca, Espanha*  
Prof. Dr. Ernesto Cristina, *Universidad de la República, Uruguay*  
Prof. Dr. Ernesto Ramírez-Briones, *Universidad de Guadalajara, México*  
Prof. Dr. Gabriel Díaz Cobos, *Universitat de Barcelona, Espanha*  
Prof.ª Dr.ª Gabriela Gonçalves, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal  
Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Gladys Esther Leoz, *Universidad Nacional de San Luis, Argentina*  
Prof.ª Dr.ª Glória Beatriz Álvarez, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*  
Prof. Dr. Gonçalo Poeta Fernandes, Instituto Politécnico da Guarda, Portugal  
Prof. Dr. Gustavo Adolfo Juarez, *Universidad Nacional de Catamarca, Argentina*  
Prof. Dr. Håkan Karlsson, *University of Gothenburg, Suécia*  
Prof.ª Dr.ª Iara Lúcia Tescarollo Dias, Universidade São Francisco, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Isabel del Rosario Chiyon Carrasco, *Universidad de Piura, Peru*  
Prof.ª Dr.ª Isabel Yohena, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*  
Prof. Dr. Ivan Amaro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil  
Prof. Dr. Iván Ramon Sánchez Soto, *Universidad del Bío-Bío, Chile*  
Prof.ª Dr.ª Ivânia Maria Carneiro Vieira, Universidade Federal do Amazonas, Brasil  
Prof. Me. Javier Antonio Alborno, *University of Miami and Miami Dade College, Estados Unidos*  
Prof. Dr. Jesús Montero Martínez, *Universidad de Castilla - La Mancha, Espanha*  
Prof. Dr. João Manuel Pereira Ramalho Serrano, Universidade de Évora, Portugal  
Prof. Dr. Joaquim Júlio Almeida Júnior, UniFIMES - Centro Universitário de Mineiros, Brasil  
Prof. Dr. Jorge Ernesto Bartolucci, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*  
Prof. Dr. José Cortez Godinez, Universidad Autónoma de Baja California, México  
Prof. Dr. Juan Carlos Cancino Diaz, Instituto Politécnico Nacional, México  
Prof. Dr. Juan Carlos Mosquera Feijoo, *Universidad Politécnica de Madrid, Espanha*  
Prof. Dr. Juan Diego Parra Valencia, *Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín, Colômbia*  
Prof. Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez, *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México*  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil  
Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil  
Prof.ª Dr.ª Livia do Carmo, Universidade Federal de Goiás, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Luciane Spanhol Bordignon, Universidade de Passo Fundo, Brasil  
Prof. Dr. Luis Fernando González Beltrán, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*  
Prof. Dr. Luis Vicente Amador Muñoz, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*  
Prof.ª Dr.ª Macarena Esteban Ibáñez, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*  
Prof. Dr. Manuel Ramiro Rodríguez, *Universidad Santiago de Compostela, Espanha*  
Prof.ª Dr.ª Márcia de Souza Luz Freitas, Universidade Federal de Itajubá, Brasil  
Prof. Dr. Marcos Augusto de Lima Nobre, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil  
Prof. Dr. Marcos Vinicius Meiado, Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Mar Garrido Román, *Universidad de Granada, Espanha*  
Prof.ª Dr.ª Margarida Márcia Fernandes Lima, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida José de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Maria Carmen Pastor, *Universitat Jaume I, Espanha*  
Prof.ª Dr.ª Maria do Céu Caetano, Universidade Nova de Lisboa, Portugal  
Prof.ª Dr.ª Maria do Socorro Saraiva Pinheiro, Universidade Federal do Maranhão, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Pato, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal



Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Maritza González Moreno, *Universidad Tecnológica de La Habana*, Cuba  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Mauriceia Silva de Paula Vieira, Universidade Federal de Lavras, Brasil  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Ninfa María Rosas-García, Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional, México  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Odara Horta Boscolo, Universidade Federal Fluminense, Brasil  
Prof. Dr. Osbaldo Turpo-Gebera, *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa*, Peru  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Patrícia Vasconcelos Almeida, Universidade Federal de Lavras, Brasil  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Paula Arcoverde Cavalcanti, Universidade do Estado da Bahia, Brasil  
Prof. Dr. Rodrigo Marques de Almeida Guerra, Universidade Federal do Pará, Brasil  
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares, Universidade Federal do Piauí, Brasil  
Prof. Dr. Sergio Bitencourt Araújo Barros, Universidade Federal do Piauí, Brasil  
Prof. Dr. Sérgio Luiz do Amaral Moretti, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Sílvia Inés del Valle Navarro, *Universidad Nacional de Catamarca*, Argentina  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Solange Kazumi Sakata, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo (USP), Brasil  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Stanislava Kashtanova, *Saint Petersburg State University*, Russia  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Teresa Cardoso, Universidade Aberta de Portugal  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Teresa Monteiro Seixas, Universidade do Porto, Portugal  
Prof. Dr. Valter Machado da Fonseca, Universidade Federal de Viçosa, Brasil  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Vanessa Bordin Viera, Universidade Federal de Campina Grande, Brasil  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Vera Lúcia Vasilévski dos Santos Araújo, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil  
Prof. Dr. Wilson Noé Garcés Aguilar, *Corporación Universitaria Autónoma del Cauca*, Colômbia  
Prof. Dr. Xosé Somoza Medina, *Universidad de León*, Espanha

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

C569 Ciências Biológicas e da Saúde: Investigação e Prática II [livro eletrônico] / Organizador Juan Carlos Cancino-Díaz. – Curitiba, PR: Artemis, 2023.

Formato: PDF  
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader  
Modo de acesso: World Wide Web  
Inclui bibliografia  
Edição bilíngue  
ISBN 978-65-87396-75-0  
DOI 10.37572/EdArt\_250223750

1. Ciências biológicas. 2. Saúde. I. Cancino-Díaz, Juan Carlos.  
CDD 570

**Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422**



## PRÓLOGO

Las ciencias biológicas abarcan diferentes disciplinas, entre ellas la medicina, la epidemiología, la biotecnología y hasta el medio ambiente; que se relacionan con otras ciencias que estudian la salud como la antropología médica. Estas aportan las bases científicas para el mejoramiento de la vida y la salud. En la actualidad, hay un gran interés sobre nuevas investigaciones en ciencias biológicas que ayudan a contestar diferentes inquietudes ocurridas en la vida cotidiana. En este libro, constituido por 16 capítulos, se enfoca en las disciplinas de la salud, la disciplina biotecnológica y la disciplina del medio ambiente.

En la disciplina “Salud y Prácticas”, dos artículos están vinculados a desafíos para los profesionales de la salud, uno sobre el manejo de la muerte y otro sobre la maternidad transnacional, en sus aspectos psicosociales y culturales. Estos trabajos son importantes porque demuestran la importancia de actitudes de humanización y empatía por parte de los profesionales de la salud, como parte de sus habilidades y competencias para un abordaje profesional de la muerte y de la maternidad transnacional.

Por otro lado, capítulos que abordan sobre el tópico neurológico están incluidos en esta área: uno de ellos está dirigido a los niños sordos y la aportación del sentido de su vista para el mejoramiento de su salud, y el otro artículo está relacionado con los masajes para el tratamiento de los pacientes con lumbalgia y cialgia. Finalizan esta sección trabajos sobre la rehabilitación motora para los pacientes con enfermedad de Huntington, así como un artículo sobre la cadencia musical en la hidrogimnasia y un estudio relacionado con el uso de cannabis para el tratamiento de las enfermedades crónicas. Sin duda, estas aportaciones son de gran interés para el área de la salud.

Un estudio de epidemiología sobre la enfermedad de Chagas en mujeres de edad fértil en el Centro de Atención Primaria de la Salud, en la Cañada (Argentina), demuestra que en algunos lugares la prevalencia de esta enfermedad es alta.

En biotecnología se reportan capítulos sobre el impacto de la malta hacia la actividad de proteasas, la producción de proteína de forraje en *Clitoria* spp, el aislamiento de bacterias celulolíticas y xilanolíticas en Cachiyacu de Lupuna en Perú, y por último una evaluación del efecto gastroprotector de *Anacyclus radiatus*. Estos trabajos aportan investigación nueva sobre aspectos biotecnológicos.

En la parte del medio ambiente, un estudio enfocado sobre la relación del cobre con la fotosíntesis de microalgas, otro capítulo sobre control biológico de *Spodoptera* sp. y dos trabajos sobre el uso de sensores remotos y aplicación en lagos de Chile y la identificación de tóxicos en efluentes urbanos.

El libro está dirigido a la comunidad médica y científica que aporta información relevante en el área de ciencias biológicas; el lector puede tener una visión general de la investigación de estas áreas y comprender la complejidad y diversidad de tópicos relacionados con la biología y la salud.

Juan Carlos Cancino-Díaz

## SUMÁRIO

### SALUD Y PRÁCTICAS

#### **CAPÍTULO 1..... 1**

EDUCAÇÃO PARA A MORTE ENTRE PROFISSIONAIS DA SAÚDE: REVISÃO INTEGRATIVA DE LITERATURA

Wilians Robson da Silva

Luciana Xavier Senra

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2502237501](https://doi.org/10.37572/EdArt_2502237501)

#### **CAPÍTULO 2..... 15**

MATERNIDAD TRANSNACIONAL: UN DESAFÍO PARA LOS SERVICIOS SANITARIOS

Carolina Garzón-Esguerra

Lourdes Moro-Gutiérrez

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2502237502](https://doi.org/10.37572/EdArt_2502237502)

#### **CAPÍTULO 3.....27**

CONTRIBUTOS DA ATENÇÃO VISUAL NA PROMOÇÃO DA SAÚDE DE CRIANÇAS SURDAS

João Dele

Anabela Maria Sousa Pereira

Paula Ângela Coelho Henriques dos Santos

Paulo Jorge Pereira Alves

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2502237503](https://doi.org/10.37572/EdArt_2502237503)

#### **CAPÍTULO 4..... 36**

MASAJE NEUROREFLEJO EN EL TRATAMIENTO DE PACIENTES CON LUMBALGIA Y CIATALGIA

Marcos Elpidio Pérez Ruiz

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2502237504](https://doi.org/10.37572/EdArt_2502237504)

#### **CAPÍTULO 5..... 48**

PROGRAMAS DE REABILITAÇÃO MOTORA NA PESSOA COM DOENÇA DE HUNTINGTON: REVISÃO SISTEMÁTICA DE EFICÁCIA

Susana Marisa Loureiro Pais Batista

Hugo Rafael Moita dos Santos

Rosa Maria Lopes Martins

Carlos Manuel Sousa Albuquerque  
Alexandra Isabel Marques da Costa Dinis

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2502237505](https://doi.org/10.37572/EdArt_2502237505)

**CAPÍTULO 6..... 68**

THE INFLUENCE OF MUSIC CADENCE ON KINETIC VARIABLES DURING WATER FITNESS EXERCISES

Catarina Costa Santos  
Mário Jorge Costa  
Luís Manuel Rama

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2502237506](https://doi.org/10.37572/EdArt_2502237506)

**CAPÍTULO 7.....78**

USO TERAPÉUTICO DA *CANNABIS SATIVA* NO TRATAMENTO DE DOENÇAS CRÔNICAS

Vaneide Ediele Duarte Martins  
Marta de Oliveira Barreiro  
Ilka Kassandra Pereira Belfort  
Viviane Sousa Ferreira  
Vanessa Edilene Duarte Martins

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2502237507](https://doi.org/10.37572/EdArt_2502237507)

**EPIDEMIOLOGÍA**

**CAPÍTULO 8..... 90**

“PREVALENCIA DE CHAGAS MAZZA EN MUJERES EN EDAD FÉRTIL EN EL CAPS DE LA CAÑADA” LA RIOJA. ARGENTINA

Jesica Elizabeth Morey Herrera  
Heliana Hebe Valdez  
María José Cabral

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2502237508](https://doi.org/10.37572/EdArt_2502237508)

**BIOTECNOLOGÍA**

**CAPÍTULO 9..... 99**

EL TIPO DE MALTA IMPACTA EN EL PERFIL Y ACTIVIDAD DE PROTEASAS

Claudia Berenice López-Alvarado  
Jessica Giselle Herrera-Gamboa



Jorge Hugo García-García  
César Ignacio Hernández-Vásquez  
Esmeralda Pérez-Ortega  
Luis Cástulo Damas-Buenrostro  
Benito Pereyra-Alfárez

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2502237509](https://doi.org/10.37572/EdArt_2502237509)

**CAPÍTULO 10..... 116**

HORMESIS UNDER OIL-INDUCED STRESS IN *CLITORIA* SPP USED FOR FORAGE PROTEIN PRODUCTION IN SOUTHEASTERN MEXICO

María del Carmen Rivera-Cruz  
Mariana Valier-Mago  
Antonio Trujillo-Narcía

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_25022375010](https://doi.org/10.37572/EdArt_25022375010)

**CAPÍTULO 11.....138**

BACTERIAS CELULOLÍTICAS Y XILANOLÍTICAS AISLADAS DE LAS SALINAS DE CACHIYACU DE LUPUNA EN PERÚ

Elizabeth Liz Chávez Hidalgo

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_25022375011](https://doi.org/10.37572/EdArt_25022375011)

**CAPÍTULO 12 ..... 149**

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *ANACYCLUS RADIATUS*

Jaime Cardoso Ortiz  
Ana Isabel Alvarado Sandoval  
Saúl Eduardo Noriega Medellín  
María Argelia López Luna

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_25022375012](https://doi.org/10.37572/EdArt_25022375012)



**MEDIO AMBIENTE**

**CAPÍTULO 13..... 164**

INVESTIGAÇÃO SOBRE A RELAÇÃO DO COBRE COM A FOTOSÍNTESE EM MICROALGAS: ESTUDO DE CASO UTILIZANDO *SCENEDESMUS QUADRICAUDA*

Rafael Barty Dextro  
Jaqueline Carmo da Silva

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_25022375013](https://doi.org/10.37572/EdArt_25022375013)

<b>CAPÍTULO 14</b> .....	<b>174</b>
ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE <i>Spodoptera</i> sp.	
Ninfa María Rosas-García	
Jesús Manuel Villegas-Mendoza	
Maribel Mireles-Martínez	
Jorge Alberto Torres-Ortega	
 <a href="https://doi.org/10.37572/EdArt_25022375014">https://doi.org/10.37572/EdArt_25022375014</a>	
<b>CAPÍTULO 15</b> .....	<b>186</b>
USO DE SENSORES REMOTOS Y SUS APLICACIONES EN ESTUDIOS DE LAGOS CHILENOS	
Patricio R. de los Ríos-Escalante	
Ángel Contreras	
Gladys Lara	
Mirtha Latsague	
Carlos Esse	
 <a href="https://doi.org/10.37572/EdArt_25022375015">https://doi.org/10.37572/EdArt_25022375015</a>	
<b>CAPÍTULO 16</b> .....	<b>195</b>
IDENTIFICACIÓN DE FRACCIONES TÓXICAS EN EFLUENTES URBANOS LÍQUIDOS	
Ingrid Violeta Poggio Herrero	
Guido Mastrantonio Garrido	
Andrés Atilio Porta	
 <a href="https://doi.org/10.37572/EdArt_25022375016">https://doi.org/10.37572/EdArt_25022375016</a>	
<b>SOBRE O ORGANIZADOR</b> .....	<b>209</b>
<b>ÍNDICE REMISSIVO</b> .....	<b>210</b>

# CAPÍTULO 1

## EDUCAÇÃO PARA A MORTE ENTRE PROFISSIONAIS DA SAÚDE: REVISÃO INTEGRATIVA DE LITERATURA

Data de submissão: 13/01/2023

Data de aceite: 30/01/2023

### Wilians Robson da Silva

Psicólogo Clínico formado pela  
Universidade Católica de Petrópolis-UCP  
Rio de Janeiro, Brasil  
<https://orcid.org/0000-0002-9009-3129>

### Luciana Xavier Senra

Doutora em Psicologia  
Professora do Curso de Mestrado e da  
Graduação em Psicologia da  
Universidade Católica de Petrópolis-UCP  
Rio de Janeiro, Brasil  
<https://orcid.org/0000-0002-5058-1574>

**RESUMO:** Os profissionais da saúde lidam frequentemente com o tema e a experiência da morte, embora não se sintam seguramente preparados para enfrentar essa realidade quando ela se encontra diante deles. A pretensão ao estudar o tema foi compreender a forma como é abordado entre os profissionais da saúde; bem como alçar contribuições para atenuar os impactos traumáticos que, muitas vezes, são causados na vida de tantas pessoas; e identificar atitudes de humanização e empatia por parte dos profissionais de saúde, visto que estes são os primeiros a terem contato com os familiares que experienciam a morte em

detrimento da percepção de negação vigente entre eles. O texto ora apresentado envolveu um estudo teórico na modalidade de revisão integrativa da literatura, para a qual foram elencados livros publicados no período de 2000 a 2022 e artigos recuperados da base de dados SCIELO, em língua portuguesa e inglesa, cujo escopo abrangeu às estratégias de educação para a morte entre os profissionais de saúde. Entre o que foi apurado, destacaram-se sentimento de impotência, angústia, distanciamento e medo por parte dos profissionais ao terem que lidar com a realidade da morte, o que demonstra uma carência na formação destes profissionais de contato com esta realidade. Depreende-se desta revisão a necessidade de incluir disciplinas como Cuidados Paliativos e Tanatologia na formação técnico-científica em saúde para serem suscitadas discussões e a presença do tema no cotidiano; e que se promova o desenvolvimento de habilidades e competências para abordagem profissional do tema.

**PALAVRAS-CHAVE:** Profissionais da saúde. Educação para a morte. Revisão de literatura.

### DEATH EDUCATION AMONG HEALTH PROFESSIONALS: INTEGRATIVE LITERATURE REVIEW

**ABSTRACT:** Health professionals often deal with the theme and experience of death, although they do not feel confidently prepared to face this reality when it is before them.

The intention when studying the theme was to understand how it is approached among health professionals; as well as raising contributions to mitigate the traumatic impacts that are often caused in the lives of so many people; and to identify attitudes of humanization and empathy on the part of health professionals, since they are the first to have contact with family members who experience death to the detriment of the current perception of denial among them. The text presented here involved a theoretical study in the form of an integrative literature review, for which books published in the period from 2000 to 2022 and articles retrieved from the SCIELO database, in Portuguese and English, whose scope included the strategies of death education among health professionals. Among what was found, the professionals' feelings of impotence, anguish, detachment, and fear stood out when they had to deal with the reality of death, which demonstrates a lack of training for these professionals in contact with this reality. It appears from this review the need to include disciplines such as Palliative Care and Thanatology in the technical-scientific training in health to raise discussions and the presence of the theme in everyday life; and to promote the development of skills and competences for a professional approach to the subject.

**KEYWORDS:** Health professionals. Death Education. Literature review.

## 1 INTRODUÇÃO

Os profissionais da saúde lidam frequentemente com o tema da morte. Porém, muitos deles não se sentem preparados para enfrentar essa realidade no contexto em que atuam. Com isto, encontramos muitos que por não saberem elaborar para si mesmos, também não conseguem contribuir com as famílias que sofrem a perda, tendo em vista que são através desses profissionais que elas recebem o comunicado da morte de alguém. Segundo afirma Kovács (2021, p. 7), “a forma de encarar a morte é, portanto, para compreender rituais e formas de enfrentamento e é base também para a formação de profissionais da saúde e da educação no seu trabalho cotidiano com a morte”. Entretanto, vale ressaltar que, no ocidente, o tema da morte é oculto, tratado como se não existisse ou não se desejasse que seja percebido. Consequentemente, não é visto como parte do processo do desenvolvimento humano, mas como tabu. Logo, porque não se diz dele também não é parte da vida. Isso tende a ocasionar uma ruptura que, muitas vezes, traz prejuízo psicológico elevado para quem comunica ou testemunha a morte de alguém querido.

Face a isso, interessa o entendimento da morte como parte do desenvolvimento humano e como ferramenta de capacitação para os profissionais da saúde, partindo da hipótese de que essa compreensão poderá auxiliar na comunicação da morte e abordagem ao luto, bem como para uso de estratégias à não objetificação da pessoa implicada neste processo, com atitudes humanizadas e empáticas. Isso porque estes são os primeiros a terem contato com familiares que vivenciam esse processo e podem

atenuar os impactos traumáticos causados na vida de tantas pessoas. Nesse sentido, ao investigar o referido entendimento da morte como parte do desenvolvimento humano se assume a premissa de que a maior familiaridade com o tema, não o negariam e não o perceberiam como uma ameaça à capacidade para atuação profissional.

O presente estudo visou revisitar a literatura buscando o entendimento da morte como inerente ao curso de vida e, por isso, contribua para a melhor atuação em saúde. Objetivou ainda (a) elencar na literatura elementos para inovação das competências dos profissionais da saúde quanto a abordagem da morte e suas repercussões; (b) compreender a percepção de negação da morte pelos dos profissionais da saúde; (c) identificar alternativas ou estratégias para que o paciente seja visto como pessoa para além do tratamento protocolar.

## 2 MÉTODO

A pesquisa envolveu um estudo teórico na modalidade de revisão integrativa da literatura. Para viabilização da revisão integrativa adotou-se como escopo o tema referente às estratégias de educação para a morte entre os profissionais e estudantes da área de saúde, o qual permitiu elencar os livros (1) *Sobre a morte e o morrer*, (2) *Eutanásia, por que abreviar a vida?*; (3) *A morte é um dia que vale a pena viver*; (4) *A história da morte no ocidente*; (5) *Educação para a morte: quebrando paradigmas*; e, (6) *Crenças e padrões comportamentais no atendimento a pacientes sem possibilidade de cura*, os quais foram publicados entre os anos 2000 e 2022 e são fundamentais ou clássicos na abordagem do tema. Além disso, foi realizada uma busca de artigos e teses nas bases de dados ScieloBR e Google Acadêmico publicados no período de 2017 à 2022, em língua portuguesa e inglesa, por meio dos termos “educação para morte” e “profissionais da saúde e morte”. Esse procedimento permitiu levantar 88 (oitenta e oito) artigos para a primeira busca e 71 (setenta e um) para a segunda. Deste levantamento, foram selecionados 9 (nove) para análise. Para viabilizá-la foi empregada uma comparação dos relatos de experiências de profissionais e de estudantes da área de saúde, tendo como dimensões temáticas os desafios da atuação e/ou formação, os sentimentos, as crenças e tipos de interferência do contexto de inerentes às situações de morte e morrer para este público.

## 3 RESULTADOS

Os resultados explicitam, respectivamente, a descrição dos principais temas, metodologias e resultados apurados nos artigos selecionados revisados; seguida

de apontamentos dos livros elencados como marcos fundamentais ou clássicos na abordagem acadêmico-científica referente ao tema ora proposto.

### 3.1 ARTIGOS

Vasques et al (2019) propuseram estudo qualitativo cujo objetivo foi compreender como os trabalhadores da equipe de enfermagem se percebem na inter-relação complexa do cuidado ao indivíduo enfermo e seu familiar cuidador no processo de morte e morrer. Inspirado na metodologia de Leininger, a qual reconhece na etnoenfermagem um método importante para obtenção de fatos, sentimentos, percepção de mundo sobre determinada vivência, como também dados que permitam a compreensão de situações e sentimentos reais, verdadeiros e modos de vida no seu cotidiano, a pesquisa foi desenvolvida no Hospital Universitário no interior do Rio Grande do Sul, especificamente na Unidade de Clínica Médica (UCM), de março a junho de 2016, Retrato a experiência entre a equipe de enfermagem, o familiar cuidador e o paciente diante do processo da morte, e contribuiu para o entendimento das inter-relações e dificuldades desse público diante do processo da morte e do morrer.

Tendo como objetivo identificar a importância dos cuidados paliativos para discentes da graduação em Medicina, Correia et al (2018), realizaram um estudo quantitativo, descritivo e transversal, com o qual discutiram o tema dos cuidados paliativos como uma oportunidade de desenvolver os profissionais da saúde ainda em formação (na graduação) e o quanto este conhecimento prévio pudesse contribuir para atuações.

Peixoto, Passos e Brito (2018) em pesquisa qualitativa, entrevistaram um grupo heterogêneo de 14 profissionais, com objetivo de analisar a constituição da responsabilidade no trabalho em saúde em uma unidade de terapia intensiva pediátrica. Este artigo relatou a experiência com crianças, destacando mudanças de comportamento entre o óbito de um adulto e o de uma criança. Porém, sobressairam-se muitos outros problemas, tais como: crenças culturais, problemas burocráticos, medos de processos judiciais levando a transferências de responsabilidades e culpabilizações entre a própria equipe diante da possibilidade de erros profissionais. Evidenciaram a falta de um trabalho multidisciplinar, da interação da equipe, o ambiente de trabalho percebido como um lugar de exigência de infalibilidade e que desumaniza as pessoas.

Souza et al (2020) realizaram uma revisão sistemática para identificar os sentimentos dos estudantes de Medicina e dos médicos residentes do Brasil ante o morrer e a morte, e assim compreender como eles vivenciam a própria formação durante a graduação e a especialização para esse enfrentamento. Basearam-se no protocolo

PRISMA para levantamento dos textos junto às bases de dados SCIELO e Portal Regional da BVS, no período de setembro a dezembro de 2019. Os autores, elencaram como critério, estudos que abordavam os sentimentos dos acadêmicos ou residentes de Medicina e a sua formação ante a morte. Entre os dados apurados, destacaram desconforto e dificuldades em lidar com a morte e o morrer.

Em estudo que consistiu em compreender percepções, os sentimentos e as dificuldades atribuídos pelos profissionais da saúde ao cuidado no processo de morte de pacientes, Monteiro, Mendes e Beck (2020) utilizaram metodologia qualitativa descritiva e exploratória. Os autores empregaram entrevistas e observações dos profissionais de uma unidade de clínica médica em um hospital de ensino do Rio Grande do Sul, para investigarem os sentimentos dos profissionais decorrentes das experiências vividas e o que tais sentimentos acarretam atitudes profissionais. Os principais sentimentos elencados foram frustração, impotência, tristeza e compaixão diante da morte dos pacientes.

Lima e Andrade (2017) em pesquisa qualitativa, fundamentada na hermenêutica fenomenológica ricoeuriana, cuja ideia é analisar o fenômeno, buscaram compreender a percepção do profissional de saúde residente diante da atuação na morte e no morrer; e investigar a formação, o aparato teórico e técnico sobre essa temática obtidos por eles na experiência de atuação. Participaram 14 profissionais residentes R1 e R2 da Residência Integrada em Saúde (RIS) com ênfase em pediatria do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), e profissionais da equipe médica preceptora. O estudo evidenciou como desafiadora a visão destes profissionais sobre a própria preparação.

A fim de descrever como a morte e o morrer são abordados na graduação médica no Brasil e suas repercussões para estudantes, Melo et al (2022) realizaram uma revisão integrativa de literatura de publicações referentes ao período compreendido entre 2008 e 2019, com análise de 36 artigos. Essa publicação reportou graves dificuldades na formação médica brasileira referentes ao processo da terminalidade.

Sobreiro, Brito e Mendonça (2021) em pesquisa qualitativa, com método do discurso do sujeito coletivo, visou conhecer os significados, percepções e sentimentos de estudantes de medicina sobre a morte e pacientes terminais. Foram entrevistados 60 alunos de uma universidade do Sul de Minas Gerais. Várias ações foram exaltadas para o assunto da terminalidade da vida.

Ferreira, Nascimento e Sá (2018), em estudo qualitativo com entrevistas a profissionais que cuidavam de pacientes em estado grave ou terminal, em um hospital-escola na cidade de Campinas, visaram apreender a percepção deles diante da morte de seu paciente ou da sobrevivência com sequelas e limitações. Reportaram a dificuldade

em discutir e lidar com a temática da morte e a distanásia como alternativa para os médicos, embora seja uma ilusão de amparo e um processo de obstinação terapêutica. Além disso, clara necessidade de formação profissional voltada para a discussão sobre a morte e a terminalidade como assuntos frequentes e menos desconfortáveis a pacientes e familiares. Há despreparo desde a formação, repercutindo significativamente nas atitudes profissionais.

### 3.2 LIVROS

No que se refere aos livros revisitados, inicialmente salienta-se Arantes (2016), autora do texto intitulado *A morte é um dia que vale a pena viver*. São relatadas experiências como médica geriátrica com o processo de finitude de alguns pacientes, bem como toda a transformação pessoal ao lidar com esse tema. Enfatiza a importância do enfrentamento desta realidade, que é absoluta na vida, e o quanto isso pode ser transformador para lidar com a morte quando ela se apresentar diante de todos. Apresenta-nos também os cuidados paliativos como alternativa de cuidado capaz de ajudar a amenizar sofrimento.

Kübler-Ross (2008), uma das pioneiras na temática da morte, no clássico *Sobre a morte e o morrer*, relata experiências reais com pacientes no processo de morte e morrer através de entrevistas realizadas com pessoas portadoras de doenças crônicas. Explicita a importância de uma conscientização sobre o processo natural da terminalidade e a necessidade de enfrentá-lo por parte do paciente, dos médicos e da família. Apresenta os estágios vivenciados por uma pessoa ao tomar consciência da morte, que são: negação, isolamento, raiva, barganha, depressão e aceitação. Mesmo inexistindo um padrão nas reações e o quão subjetivo seja o processo, este pode auxiliar muito aos envolvidos.

Pessini (2004) em *Eutanásia, por que abreviar a vida?*, propõe contextualização sobre o processo da morte e do morrer, trazendo questões éticas, religiosas, a presença da tecnologia na contemporaneidade, os desafios éticos diante da terminalidade. Nota-se que o autor foi impulsionado por Kübler-Ross, ao conscientizar sobre a importância de os médicos enfrentarem a realidade da morte sem deixar de olhar para a pessoa que está doente, para não objetificá-la ao cuidar apenas da doença. Com isso, também apresenta os cuidados paliativos como uma maneira de respeito a dignidade humana.

Ariès (2017), com *A história da morte no ocidente* mostra-se um autor de referência com um título clássico para todas as pessoas que pretendem aprofundar no tema da morte. Embora seja de fácil entendimento, é didático ao retratar o contexto histórico e as influências de cada época que contribuíram para que, ainda hoje, a morte seja vista como um tabu.



Kovács (2021) em *Educação para a morte: quebrando paradigmas* nos mostra, sobretudo por parte das equipes de saúde, a importância de compreender a morte. Demonstra que a tecnologia, fortemente presente na sociedade contemporânea, é insuficiente para viver melhor. Elucida a necessidade de saber lidar com a morte para viver melhor; de respeitar o ser humano em seu processo natural de vida, visando contribuir para a educação para este tema como mais um recurso da formação nas instituições de saúde, nas escolas, residências para idosos, e, para a sociedade.

Krüger (2016), em volume integrante de uma série universitária de publicações de temas de um curso de Mestrado em Psicologia da Universidade Católica de Petrópolis-UCP, aborda o que pensam os pacientes com doenças crônicas fora de possibilidade cura no ambiente hospitalar. Este livro contribui para a revisão aqui proposta em razão de sinalizar a definição do funcionamento do sistema de crenças para corroborar a ideia do quanto este influencia nas ações de cada pessoa.

#### 4 DISCUSSÕES

Na atualidade, devido aos progressos na área da medicina e da saúde, o conceito da morte, passou a ser definido como um fenômeno técnico e, diante das possibilidades contemporâneas, a medicina consegue manter funções vitais de um corpo bem mais do que permitiria o curso natural da doença. E aqui não é uma negação ao progresso, mas, ao contrário, uma reflexão porque se tornou tão distante a resignação perante a expressão “deixar a natureza seguir o seu curso”. O silêncio perante o tema da morte, o coloca como se não existisse. O doente é excluído da sua morte, a família que antes esgotava todas as possibilidades antes de ser enviado ao sistema hospitalar, hoje transfere essa tarefa para os profissionais da saúde e se retira para deixá-los fazerem o seu trabalho; situação que, por muitas vezes, desumaniza o doente (PESSINI, 2004).

Arantes (2016), relata que como profissional da saúde, para cuidar das pessoas que estão conscientes da sua morte, onde há um sofrimento que se instala nessa etapa da vida humana que clama por cuidados, é preciso anteriormente aprender a cuidar de si mesma, porém até chegar a esse entendimento, como muitos outros médicos, não deu a importância devida a essa informação tão relevante. Por muito tempo viveu gastando-se, e após viver um estresse pós-traumático secundário diante da perda de um paciente e, de somatizar dores por um tempo, encontrou sentido no seu trabalho ao entender que poderia cuidar do sofrimento do outro quando aprendeu a dedicar a cuidar dos seus próprios sofrimentos.

Não calar o tema da morte, argumentar sobre ele, permitir virem reflexões sobre o sentido de morrer, enfrentar a possibilidade de sentimentos difíceis, não subtrai em

nada a vida, mas possibilita uma melhor forma de vivê-la. Com ou sem amor, com ou sem responsabilidades, filhos, dinheiro ou posses a morte chegará; porém, não estamos preparados para ela por não conversarmos abertamente sobre essa única certeza (KÜBLER-ROSS, 2008).

Na Faculdade, conforme Arantes (2016), os alunos de medicina são preparados para não abandonar a doença dos seus pacientes, e quando não há mais tratamento para ela, é como se não tivessem mais condições de estar do lado da pessoa que a possui. Em muitas faculdades o ensino fica condicionado ao falso conceito de poder dado aos médicos, o que traz consigo uma “condenação ao fracasso” ao depararem-se diante de pacientes com doenças incuráveis. Já o profissional que expande o seu conhecimento empenhando-se também sobre o conceito de “cuidar” é um ser humano em constante realização.

Essa inabilidade de lidar com o processo da morte e do morrer, como afirmam Sobreiro, Brito e Mendonça (2021), está ligada a um modelo de ensino tecnicista no qual o ser humano é descrito somente por seus mecanismos: circulatório, digestivo, respiratório; fragmentado apenas no seu ser biológico, ignorando as dimensões psicológicas, sociais e espirituais. Esta fragmentação do ser humano, já no processo de formação destes profissionais, não trata da inflexibilidade da terminalidade para todo o ser humano, dificultando o entendimento da morte como parte do viver.

Não perder a visão do humano que está por trás de um diagnóstico, é uma aptidão contributiva para que os valores da pessoa não sejam diminuídos, pois ao entender todas as dimensões que possui, o sofrimento físico se torna parte e não o inteiro, podendo então ser alcançada em sua integralidade. Isso não diminui em nada toda a importância da técnica do saber médico, das suas habilidades de avaliações clínicas, remédios, interpretações de exames, controle de sintomas. O conforto será alcançado não somente pelo paciente que, mesmo em todo o sofrimento, não perderá a sua singularidade, mas também para todos os familiares envolvidos que, em um momento quando sentirem-se incapazes diante do sofrimento do ente, receberão atenção cuidadosa dos profissionais envolvidos neste processo (KÜBLER-ROSS, 2008).

Para o profissional da saúde, ter empatia, conforme nos afirma Arantes (2016), não é o adequado para que este cumpra o ideal de não objetificar o paciente e este seja visto como pessoa e não somente a doença que possui, pois a empatia é a habilidade de se colocar no lugar do outro, o que pode ser muito prejudicial ao se deparar com uma pessoa cujo momento da vida seja a terminalidade. O ideal, segundo a autora, é ter compaixão, pois esta permite ao profissional compreender o sofrimento do paciente sem

que seja, de certa forma, contaminado por ele. A compaixão não acaba, a empatia pode acabar, nesta o profissional da saúde pode aprofundar tanto em direção ao sofrimento alheio ao ponto de esquecer-se de si, enquanto na compaixão, faz-se necessário um conhecimento de si e de suas capacidades, para aí sim, ir ao encontro do outro.

Bloom (2016) em estudo sobre empatia como uma ferramenta de força motivacional, demonstrou que não há dúvidas sobre sua capacidade de gerar ações. Porém, alerta que esta força pode ser utilizada tanto para o bem quanto para o mal, pois assim como outras emoções ou sentimentos, ter empatia por alguém pode levar a ações prejudiciais e outros. Não eximindo a complexidade deste tema e deixando expressa a necessidade de maiores pesquisas sobre ele, apresenta evidências de que, ao menos em adultos, a empatia (afetiva/emocional) pode ser significativamente distinguida da compaixão. Isso foi possível através de análises fatoriais de um instrumento criado para mensurar o construto e diferenças neurais durante diferentes tipos de treinamento (empatia e compaixão). Além disso, houve também uma diferença prática, o treinamento em empatia (buscar sentir o que o outro está sentido) levou ao sofrimento empático, que é um fator de risco para o *burnout* onde a natureza desagradável de uma experiência pode levar as pessoas a evitar situações que desencadeiam tal aflição. Em contrapartida, o treinamento da compaixão (sentir pensamentos positivos e calorosos em relação aos outros sem experimentar o seu sofrimento) não apenas promove o comportamento pró-social, mas também aumenta o afeto positivo e a resiliência, o que, por sua vez, promove um melhor enfrentamento de situações estressantes.

Mediante as experiências e estudos dos autores Arantes (2016) e Bloom (2016), nota-se como estratégia e contribuição para que o paciente seja visto como pessoa e não como objeto a ser tratado protocolarmente pelos profissionais da saúde, o aprofundamento do conhecimento e da vivência da compaixão.

Dos estudos de Lima e Andrade (2017), depreende-se que poucos são os profissionais que aceitam o ato de cuidar como parte do tratamento para os pacientes diante do sofrimento decorrente da enfermidade; que entendem ser ético também acolher visando a qualidade de vida do enfermo e da sua família; não bastando somente a técnica profissional, mas responsabilizando-se pelo cuidado e a atenção devida, especialmente quando em uma situação de morte e morrer. Porém, a realidade é que, em sua grande maioria, por não saberem lidar com o tema, sentem-se despreparados, com sentimento de impotência e, conseqüentemente, se afastam da pessoa enferma.

Sobre o sentimento de impotência, vale ressaltar que ele aparece algumas vezes nos profissionais, tal como aparecem insegurança, tristeza, culpa e frustração. Logo, como

não sabem lidar com estes sentimentos e emoções negativas, a racionalização surge como uma defesa para que consigam estar com o enfermo, embora não olhando a pessoa, somente a doença, o corpo e o diagnóstico (MONTEIRO; MENDES; BECK, 2020).

Pessini (2004) aponta que por não saberem lidar com a terminalidade, e embora percebendo a cura não ser mais uma possibilidade para alguns pacientes, muitos profissionais permanecem obstinados em manter a vida e utilizam procedimentos excessivos, prolongando ao máximo o tempo de vida (distanásia), haja vista o combate à morte, em detrimento de proporcionar qualidade de vida. Isto é, para estes profissionais, a morte é um inimigo a ser combatido a todo custo, e esta forma de cuidado é o único recurso, mesmo com intenso sofrimento.

Para inovar as competências dos profissionais da saúde quanto a abordagem da morte e suas repercussões, os Cuidados Paliativos, há alguns anos, aparecem como ferramenta de educação para capacitação destes. O que parece ser ideal para minimizar a carência na formação dos profissionais da saúde sobre o tema da morte, é ter uma disciplina sobre o tema já na grade curricular da Graduação, sendo assim habituados ao tema da terminalidade, obtendo o aprendizado sobre os cuidados de fim de vida, aprimorando o entendimento da existência da morte e as possibilidades de permitir que ela aconteça de forma confortável, evitando o possível abandono do paciente diante do diagnóstico irreversível, sem cura por tratamento da doença. É levantado o interesse entre os estudantes, como também o da inclusão de disciplinas teórico-práticas de Tanatologia e Psicologia Médica (SOUZA et al., 2020). Contudo, a realidade encontrada nas faculdades é apenas a de não abandonar a doença, diminuindo a pessoa à sua dimensão biológica.

Para os profissionais já atuantes, a criação de protocolos de sensibilização dos princípios dos Cuidados Paliativos, nos diversos ambientes de trabalho, possibilitaria um auxílio para as intervenções. Viabilizar este conhecimento tornaria a finitude humana muito mais digna para a pessoa enferma, proporcionando qualidade de vida, e o saber da existência profissionais que se importam com o seu sofrimento, ofertam paz e maior conforto, se assim podemos dizer, tanto para quem está morrendo quanto para os familiares (PESSINI, 2004).

Dialogar sobre esta temática tende a favorecer a todos os envolvidos, pois ao terem contato com essa realidade, pode despertar a necessidade de rever as próprias crenças no processo de terminalidade, sendo capazes de confrontarem-se, auxiliando nas condutas diante de outras pessoas. Como destaca Krüger (2016) todas as crenças têm sua origem na experiência pessoal, e quando são acolhidas por mais de uma pessoa

tornam-se crenças socialmente compartilhadas. Entretanto, as crenças podem ser mudadas através de novas experiências que contradizem outras admitidas anteriormente, ou também através da influência de pessoas que se julgam competentes nos assuntos relacionados às crenças, podendo levar ao abandono das anteriores. Com este único ponto, podemos identificar a importância do diálogo não só na busca de conhecimento para a formação profissional, mas para a mudança de comportamento que pode influenciar a sociedade.

Neste contexto, a Psicologia muito tem a contribuir auxiliando no autoconhecimento, na inteligência emocional, no sistema de crenças, no entendimento das influências culturais, sociais e do ambiente que interferem na vivência do processo da morte e do morrer, já que este tema, há tanto tempo, se tornou é tabu na sociedade. Por fim, mas não menos importante, destaca-se a multidisciplinaridade como parte relevante para a criação de programas centrados na educação para a morte para os profissionais da saúde. Especialmente para pacientes no processo de terminalidade onde o trabalho de uma equipe multiprofissional pode fazer uma enorme diferença no cuidado de uma morte digna da pessoa enferma (FERREIRA; NASCIMENTO; SÁ, 2018).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Elucidar o tema da morte será quase sempre uma tarefa desafiadora, pois não é fácil lidar com a terminalidade. Porém, não tem como fugirmos dessa verdade absoluta de nossas vidas. O que se propôs com esse trabalho foi trazer à tona a temática por muitos silenciada ao ponto de parecer quase inexistente, gerando, com isso, inúmeras consequências ao vivenciá-la, ao passo que se fosse aceita com mais naturalidade no processo de existir de cada um de nós, inibiria boa parte de sofrimentos.

Constatamos que, quanto mais diálogo houver sobre esta temática, mais próximo ficaremos da realidade da morte como parte do desenvolvimento humano, e isso implicará em nossa maneira de viver, acarretando mudanças em nosso próprio comportamento e em como nos relacionamos com as outras pessoas. Para o profissional da saúde, especialmente o médico, que se depara muitas vezes com situações de morte e carrega consigo o estigma de ser o portador da cura e daquele que a impede de acontecer, o trabalho se torna uma responsabilidade para a qual não pode corresponder. O que pode ocasionar atitudes de não enfrentamento da realidade da terminalidade e distanciamento e objetificação da pessoa enferma. Logo, ter a oportunidade de aprofundar essa temática entendendo o seu papel, o do paciente enfermo e o do desenvolvimento humano, favorecerá a atuação profissional na assistência ao envolvidas neste processo.

Entender o cuidado da pessoa humana como parte do tratamento e não da doença, é algo indispensável na formação dos profissionais da saúde. Isso assegura que não se percam em meio a busca de resoluções ou negligenciem o desejo da pessoa enferma, desrespeitando sua subjetividade em um momento tão difícil como no processo de morte e morrer. Ademais, rompe com atuação que insiste em cuidar de um paciente com um diagnóstico irreversível como reversível, na tentativa de burlar a morte, ainda que sob sofrimento.

O tema da morte ao não ser abordado no processo de formação desses profissionais dá lugar ao entendimento de que é sempre possível a cura ou a reversão de uma doença. Estes profissionais em prática ao se depararem com pacientes que não tem cura, não sabem lidar com a terminalidade e continuam cuidando dos pacientes como se fossem “curáveis”. Essa prática, por sua vez, gera angústia para o profissional e sofrimento maior aos pacientes e familiares. Para sanar esses impactos, destaca-se a importância dos Cuidados Paliativos e Tanatologia na formação profissionais como estratégia para abordagem do tema na prática, demonstrando a importância da transparência com a pessoa enferma, valorizando os seus sentimentos e a forma como vai querer conduzir o seu processo de tratamento. Isto é, dando voz à pessoa que possui a doença e não o contrário, e que mesmo diante de um processo irreversível é possível haver conforto para o paciente e para sua família. Aliada a isso, a aprendizagem de uma atuação multidisciplinar para o tratamento de doenças crônicas, por exemplo, contribuindo para qualidade de vida mesmo em proximidade da morte.

Podemos verificar que a Psicologia, como parte de uma equipe multidisciplinar, muito tem a contribuir na desmistificação da vivência do tema, tanto para os profissionais da saúde, como para o paciente enfermo e para as famílias; sobretudo no que diz respeito a capacidade de ressignificar o protagonismo na vida inclusive na terminalidade e na morte. Ademais, salienta-se que esse tema não se esgota de estudo em quaisquer âmbitos do conhecimento ou modalidades de investigação, fazendo-o sempre relevante em novas pesquisas.

## REFERÊNCIAS

ARANTES, Ana Cláudia Quintana. **A morte é um dia que vale a pena viver**. Rio de Janeiro: Casa da Palavra, 2016.

ARIÈS, Philippe. **História da morte no Ocidente**: da Idade Média aos nossos dias. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2017.

BLOOM, Paul. Empathy and Its Discontents. **Trends in Cognitive Sciences**, [S.l.], v. 21, n. 1, p. 24-31. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364661316301930>. Acesso em: 4 nov. 2022.

CORREIA, Divanise Suruagy et al. Cuidados Paliativos: Importância do Tema para Discentes de Graduação em Medicina. **Revista Brasileira de Educação Médica**, [S.l.], v. 42, n. 3, p. 78-86. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-52712015v42n3RB20170105.r1>. Acesso em: 12 set. 2022.

FERREIRA, Julia Messina Gonzaga; NASCIMENTO, Juliana Luporini; SÁ, Flávio César de. Profissionais de saúde: um ponto de vista sobre a morte e a distanásia. **Revista Brasileira de Educação Médica**, [S.l.], v. 42, n. 3, p. 87-96. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-52712015v42n3RB20170134>. Acesso em: 19 out. 2022.

GOIS, A. L. B.; VERAS, R. P. Informações sobre morbidade hospitalar em idosos nas internações no Sistema Único de Saúde do Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.l.], v. 15, n. 6, p. 2859-2869. 2010.

KOVÁCS, M. J. **Educação para a morte**: quebrando paradigmas. Novo Hamburgo: Synopsys Editora, 2021.

KOVÁCS, M. J. Educadores e a morte. **Psicologia Escolar e Educacional**, [S.l.], v. 16, p. 71-81. 2012.

KRÜGER, Helmuth. Crenças e Padrões Comportamentais. In: FRANÇA, Niquélen B.M.; KRÜGER, Helmuth (org.). **Crenças e padrões comportamentais no atendimento a pacientes sem possibilidade de cura**. Curitiba: CRV, 2016. p. 9-14.

KÜBLER-ROSS, Elisabeth. **Sobre a morte e o morrer**: o que os doentes terminais têm para ensinar a médicos, enfermeiras, religiosos e aos seus próprios parentes. 9. ed. São Paulo: Editora WMF Martins Fontes, 2008.

LIMA, Maria Juliana Vieira; ANDRADE, Noeme Moreira de. A atuação do profissional de saúde residente em contato com a morte e o morrer. **Saúde e Sociedade**, [S.l.], v. 26, n. 4, p. 958-972. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-12902017163041>. Acesso em: 19 out. 2022.

MELO, Vinícius Leite et al. Morte e morrer na formação médica brasileira: revisão integrativa. **Revista Bioética**, [S.l.], v. 30, n. 2, p. 300-317. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-80422022302526PT>. Acesso em: 1 ago. 2022.

MONTEIRO, Daniela Trevisan; MENDES, Jussara Maria Rosa; BECK, Carmem Lúcia Colomé. Perspectivas dos Profissionais da Saúde sobre o Cuidado a Pacientes em Processo de Finitude. **Psicologia: Ciência e Profissão**, [S.l.], v. 40. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1982-3703003191910>. Acesso em: 13 out. 2022.

PAPALIA, Diane. **Desenvolvimento humano**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2013.

PEIXOTO, Tereza Cristina; PASSOS, Izabel Christina Friche; BRITO, Maria José Menezes. Responsabilidade e sentimento de culpa: uma vivência paradoxal dos profissionais de terapia intensiva pediátrica. **Interface - Comunicação, Saúde, Educação**, [S.l.], v. 22, n. 65, p. 461-472. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1807-57622016.0900>. Acesso em: 13 out. 2022.

PESSINI, Leo. **Eutanásia**: Por que abreviar a vida?. São Paulo: Editora do Centro Universitário São Camilo, 2004.

SCHRAMM, F. R. A questão da definição da morte, na eutanásia e no suicídio assistido. **Mundo da Saúde**, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 178-83. 2002.

SOBREIRO, Izaura Mariana; BRITO, Priscelly Cristina Castro; MENDONÇA, Adriana Rodrigues dos Anjos. Terminalidade da vida: reflexão bioética sobre a formação médica. **Revista Bioética**, [S.l.], v. 29, n. 2, p. 323-333. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-80422021292470>. Acesso em: 14 set. 2022.

SOUZA, Taísa Izabela Magalhães et al. Sentimentos dos Estudantes de Medicina e Médicos Residentes ante a Morte: uma Revisão Sistemática. **Revista Brasileira de Educação Médica**, [S.l.], v. 44, n. 4. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-5271v44.4-20200082>. Acesso em: 14 set. 2022.

VASQUES, Tania Cristina Schäfer et al. Equipe de enfermagem e complexidades do cuidado no processo de morte-morrer. **Trabalho, Educação e Saúde**, [S.l.], v. 17, n. 3. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-7746-sol00219>. Acesso em: 8 set. 2022.



## CAPÍTULO 2

### MATERNIDAD TRANSNACIONAL: UN DESAFÍO PARA LOS SERVICIOS SANITARIOS<sup>1</sup>

Data de submissão: 29/01/2023

Data de aceite: 17/02/2023

**Carolina Garzón-Esguerra**

Universidad de Salamanca

Magister en Antropología Aplicada,

Salud y Desarrollo comunitario

Salamanca, España

<https://orcid.org/0000-0003-2954-1372>

**Lourdes Moro-Gutiérrez**

Universidad de Salamanca

Departamento Psicología Social y

Antropología

Profesora Titular

Salamanca, España

<https://orcid.org/0000-0003-2009-0413>

**RESUMEN:** Objetivo: Identificar los itinerarios terapéuticos de las mujeres latinoamericanas que viven en Salamanca (España), a través de su proceso migratorio. Métodos: Estudio cualitativo etnográfico, realizado a partir de observación participante, grupos focales, entrevistas semiestructuradas a 14 mujeres latinoamericanas inmigrantes y 6 entrevistas abiertas a profesionales

<sup>1</sup> Artículo derivado de la tesis de Maestría, presentado en el VI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología: "Desafíos Emergentes. Antropologías desde América y El Caribe".

de instituciones públicas sanitarias y organizaciones no gubernamentales. La entrevista semiestructurada incluyó como temáticas principales: migración, adaptación, salud-enfermedad-atención; y las entrevistas a los profesionales: frecuencia de uso de los servicios, perfil epidemiológico, y seguimiento y evaluación de indicadores sanitarios. Resultados: Las mujeres definieron la salud y la enfermedad como multidimensional, asignando una simbología religiosa. Los determinantes del uso de los servicios sanitarios fueron: xenofobia, deshumanización del personal sanitario, calidad y enfoque de medicina familiar. La morbilidad sentida incluía enfermedades estacionales, y emocionales como la depresión, asociada a la ausencia de sus hijo(a)s y la constante preocupación por su bienestar. Los profesionales reconocen que las condiciones socio-laborales de las mujeres latinoamericanas, limitan el tiempo para acudir al médico. Conclusión: La maternidad transnacional es un desafío para los servicios de salud por: la diversidad de roles paralelos, las condiciones jurídicas para la obtención de derechos, la percepción de la atención sanitaria y la priorización del empleo sobre la salud. Para lo cual, se propone vincular el sector sanitario con el escenario educativo, laboral y político, e incluir las conexiones y dialécticas que limitan el acceso a la sanidad, en las políticas públicas.

**PALABRAS CLAVES:** Migración internacional. Morbilidad sentida. Atención sanitaria. Itinerarios terapéuticos.

## TRANSNATIONAL MATERNITY: A CHALLENGE FOR HEALTH SERVICES

**ABSTRACT:** Objective: To identify the therapeutic itineraries of Latin American women living in Salamanca, through their migration process. Methods: Qualitative ethnographic study, carried out from participant observation, focus groups and a semi-structured interview with 14 immigrant Latin American women and 6 open interviews with professionals from public health institutions and non-governmental organizations. The semi-structured interview included as main topics: the migration, adaptation, health-illness-care; and interviews with professionals: Frequency of use of services, epidemiological profile, and monitoring and evaluation of health indicators. Results: Women defined health and disease as multidimensional and through a religious symbolism. The determinants of the use of health services were: xenophobia, dehumanization of health personnel, quality and family medicine approach. The perceived morbidity included psychosomatic illnesses such as depression, associated with the absence of their children and the constant concern for their well-being. Professionals recognize the social and labor conditions of Latin American women, and their lack of time to go to the doctor. Conclusion: Transnational maternity is a challenge for health services because of: the diversity of parallel roles, the legal conditions for obtaining rights, the perception of health care and the prioritization of employment over health. Therefore, it is proposed to link the health sector with the educational, labor and political scenarios, including the connections and dialectics that limit access to health in public policies.

**KEYWORDS:** Migratory process. Perceived morbidity. Healthcare. Therapeutic itineraries.

### 1 INTRODUCCIÓN

La migración ha sido definida de diferentes maneras a través de enfoques discursivos que resaltan una u otra característica del proceso. La regulación del mercado, la estrategia motivacional, el desequilibrio económico, las redes de relaciones sociales; han permitido una pluralidad teórica que direcciona el análisis y las formas de interpretación. Las ciencias sociales y organizaciones de carácter internacional han utilizado el enfoque transnacional, para describir las interconexiones entre los aspectos sociales que complejizan este fenómeno (Carballo de la Riva, 2017). A partir de allí, Bash, Glick-Schiller & Blanc-Szanton (1994) señalan que:

La migración es un conjunto de múltiples relaciones (familiares, económicas, organizacionales, religiosas y políticas) que se extienden más allá de las fronteras de uno o más territorios estatales, proyectando lazos, imágenes y expectativas que igualmente las trascienden, y vinculan sus sociedades de origen y asentamiento. (López Hernández, 2013; 83).

Estas relaciones son fuertemente expresadas por las mujeres latinoamericanas que han liderado las olas migratorias hacia España, y que son potencializadas por su condición de madres, jefes de hogar, trasmisoras de tradiciones y fuente de sustento familiar. Al iniciar su proceso, transforman la estructura de sus familias apartándose

físicamente de sus hijo(a)s, afrontando una nueva maternidad en solitario. Lo que implica un cambio de la connotación de maternidad, que se reconfigura a través de sus expectativas, roles, e itinerarios migratorios. Estos cambios direccionan las formas de percibir su corporalidad y su lugar en la sociedad; siendo determinantes en la formulación de hábitos de cuidado y crianza.

La maternidad no solo incluye procesos biológicos (concepción, embarazo, parto, puerperio y, en algunos casos, la lactancia) sino que abarca prácticas y relaciones sociales no vinculadas al cuerpo femenino (cuidado y socialización, atención de la salud, alimentación, higiene, afecto y cariño). Todas estas prácticas se entrecruzan con representaciones acerca de lo socialmente aceptado, legitimado y naturalizado (Pedone, 2006).

Por otra parte, las mujeres inmigrantes enfrentan largos procesos de regularización que las categorizan, clasifican y objetivaban (sobre los cuales tienen poco control). A través de los cuales se asignan identidades particulares como: regulares, ilegales, asiladas, nacionalizadas; que se construyen activamente en el contexto social emergente (Shore, 2010). Además, la demanda de tiempo de los empleos de cuidados y servicio doméstico; se conjugan para generar una relación distante con los servicios de salud.

A partir de allí, surge una necesidad de cambio, en la interpretación y ejecución de los sistemas sanitarios. Redefiniéndolos como: sistemas sociales y culturales creados con el fin no solo de curar sino de entender la enfermedad, y los medios, que la población ha inventado para el control, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades (De Miguel, 1985).

Por lo anterior, la sanidad se presenta como un escenario que se deconstruye en la convergencia cultural de modelos diferentes al biomédico, y que propone un cambio de paradigma, que permita integración y pluralidad. A través de ella, es posible identificar las necesidades específicas de las mujeres inmigrantes, así como las condiciones que determinan el acceso a los servicios de salud. Igualmente visibiliza las desigualdades con la población autóctona, las barreras de acceso, las falencias estructurales del sistema, y las débiles competencias de los profesionales sanitarios.

## 2 MÉTODOS

Estudio cualitativo etnográfico, desarrollado en la ciudad de Salamanca (España) en el año 2019, que incluyó observación participante, grupos focales y una entrevista semiestructurada a 14 mujeres latinoamericanas inmigrantes y 6 entrevistas

abiertas a profesionales de instituciones públicas sanitarias y organizaciones no gubernamentales. La entrevista semiestructurada incluyó como temáticas principales: migración, adaptación, salud-enfermedad-atención, y las entrevistas a los profesionales: frecuencia de uso de los servicios, perfil epidemiológico, y seguimiento y evaluación de indicadores sanitarios.

**Selección de participantes:** Se realizó en dos sentidos: el primero dirigido a los profesionales y el segundo a las mujeres inmigrantes. Para el primero, los perfiles de elegibilidad fueron coordinadores de programas de salud pública o proyectos de intervención con población inmigrante y profesionales de contacto directo con mujeres inmigrantes tales como psicólogos, trabajadores sociales, educadores en salud. Para el segundo, se estableció como criterio de inclusión: el país de origen: Países Latinoamericanos (en donde se incluyen países de Sudamérica, Centroamérica y el Caribe, ya que es la agrupación utilizada en España para referirse a dicho colectivo). Otras variables como edad, número de hijo(a)s, y estar en gestación, se pusieron a consideración, siendo descartadas porque incurrían a sesgos.

**Muestra:** 14 mujeres con edades de los 19 y los 62 años, con distintas situaciones de regularidad administrativa: portadoras de permisos temporales de residencia, residentes de largo plazo, nacionalizadas y solicitantes de asilo, irregulares. Con una antigüedad en el país entre 7 meses y 18 años, y estado civil: solteras, divorciadas o viudas, que asumían la maternidad en solitario. Se utilizó muestreo por bola de nieve.

**Consideraciones éticas:** Las participantes fueron informadas de los objetivos del estudio verbalmente y se les garantizó la confidencialidad de la información.

**Categorías de análisis:** Se generaron categorías y subcategorías por temas, partiendo de la entrevista y los datos obtenidos de la observación participante, tomando las experiencias subjetivas de las participantes como principal foco de atención. Para el análisis se tuvieron presentes las variables históricas como determinantes de la migración, ya que permiten la interpretación de la singularidad cultural del problema antropológico y crean una relación estructural – funcional, que facilita la interpretación de las narrativas; teniendo claro que los resultados pertenecen al momento de la investigación, y que constituyen un *statu quo* etnográfico (Esteva Fábregat, 1973).

## **3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1 PERCEPCIONES SALUD-ENFERMEDAD**

La relación entre salud, vida, bienestar, y Dios, se mostró como una combinación necesaria para estar, y afrontar las dinámicas de su cotidianidad. Utilizaban expresiones

como “*Si Dios quiere*”, “*Dios lo puso en mi camino*”, “*Dios me dio una nueva oportunidad*”, para referirse a situaciones de tratamiento de enfermedades, diagnósticos oportunos, y curación. De igual forma, le asignaban a la salud atributos de necesidad básica.

Consideraban la enfermedad como: “*un estado emocional*”, y un desequilibrio asociado directamente a la edad. También se interpretó al igual que la salud, como una respuesta divina.

*Ósea el emigrar es duro, porque tú te chocas independientemente de que hablemos el mismo idioma es otra cultura, entonces si tú no tienes tu mente abierta y dispuesta a abrirte a lo que estás viendo es bastante duro, entonces yo pienso que hay gente que se puede enfermar emocionalmente de otra manera, a raíz de eso de que les cuesta integrarse, de que ven que nuestra cultura choca, si, entonces no solamente hay enfermedades físicas (Cecilia).*

Se identificó, un componente subjetivo que se relaciona no solo con la forma en la cual cada mujer asume la enfermedad, sino en cómo se asume en la realidad en la que se encuentra inmersa. Las participantes que llevan mayor tiempo de residencia, han transformado estas concepciones, incorporando elementos aprendidos en su itinerario migratorio. Tal como lo describe, Weizsäcker, (1986): “las enfermedades físicas y psíquicas no son solo el resultado de los conflictos personales del paciente, sino también de conflictos sociales y culturales, conflictos de la sociedad, de la iglesia, de las ideas” (Engelhardt, 2004, p. 70). No basta con realizar una aproximación a los atributos dados a la enfermedad a partir de la propia experiencia, sino que se complejiza en cómo dicha percepción también se construye, por medio de las situaciones recreadas durante su proceso migratorio. Estos criterios subjetivos son modulados por características particulares como la edad, el sexo, la raza, la situación histórica y social, la personalidad y la ocasión biográfica. Estos se conjugan con los socioculturales, dando lugar a una compleja relación cosmológica, que nos acerca en mejor medida a su realidad (Lain Entralgo, 1985).

### 3.2 DETERMINANTES DEL USO DE LOS SERVICIOS SANITARIOS

Los determinantes de uso de los servicios sanitarios fueron: xenofobia, deshumanización del personal sanitario, calidad y enfoque de medicina familiar.

Se identificó un trato diferencial, que lo asociaban directamente con su condición de inmigrantes y necesidad de atención médica. Formulaban suposiciones y generalizaciones negativas hacia el personal sanitario, a partir de sus vivencias de rechazo e itinerarios.

*Aquí hace falta más de consideración y humanidad con las embarazadas, porque uno tiene un cambio físico, biológico y emocional. Estuve 26 horas en trabajo de parto, ¡la pase fatal!, no tenía fuerza, nada. Creo que no he tenido suerte. Después de que la matrona estuvo encima 2 horas, la sacaron, ha sido un poco traumático (Clara).*

Esto coincide con estudios previos que describen que el cuidado de la salud se proporciona de manera irrespetuosa, reproduciendo los estereotipos negativos antiinmigrantes (Sargent 2005; Sargent & Larchanché, 2007). Además de una falta de: sensibilidad en la atención de los pacientes inmigrantes, conocimiento real sobre su situación social y cultural; y entrenamiento para atender necesidades específicas (Bermúdez, 2004).

La calidad de la atención fue evaluada a partir de los siguientes criterios: el trato, el tiempo de espera para la consulta, la resolución de su padecimiento y la prescripción de medicamentos y pruebas diagnósticas. El 78,5% (11) valoró positivamente el sistema sanitario español, al compararlo con los sistemas de sus países de origen.

*Voy al médico y me atienden bien, siempre están de lo que, en Colombia tenemos antes que ir y solicitar citas y todo para las mamografías y esto, aquí no, aquí me mandan la carta a casa para que vayas y te hagas los exámenes que necesitas, porque como están controlando tu edad, ya saben ya las cosas. En ese sentido es que yo digo que la seguridad social es buena (Marta).*

Resaltaban el enfoque de medicina familiar, en el cual el médico de cabecera notifica a su domicilio el momento para la realización de tamizajes para detección temprana de enfermedades de salud pública, tales como cáncer de mama, cuello uterino, diabetes, etc. Sin embargo, verbalizaban necesidades insatisfechas, relacionadas con el desconocimiento del sistema sanitario, los hábitos de salud y a la dureza del contexto migratorio: soledad, sentimiento de rechazo, búsqueda de trabajo, vivienda, e instituto para los niños, y trámites de documentos de identificación. Lo anterior confirma que las prácticas biomédicas reproducen procedimientos mecanicistas y estandarizados, lejanos de los contextos particulares e individuales (Moreno Preciado, 2010, p. 168). A partir de los cuales se genera una relación distante con el sistema sanitario, basada en el control; desatendiendo los acontecimientos vitales de la mujer migrante.

### 3.3 MORBILIDAD SENTIDA

La morbilidad sentida hacía referencia a enfermedades estacionales<sup>2</sup> y emocionales, desarrolladas posterior a la migración. Se consideraban personas sanas,

<sup>2</sup> Enfermedades causadas por los cambios climáticos y medioambientales de las estaciones de invierno y primavera. Las personas entrevistadas hacían énfasis en que sus países de origen no tenían estaciones, de tal forma que, al llegar a España, su cuerpo debía adaptarse a las nuevas temperaturas.

y expresaban que, en sus países de origen, los sistemas sanitarios no tenían cobertura universal, ni eran de carácter público. De manera tal, que estaban acostumbradas a no consultar o ir tardíamente al médico. También, se identificó la realización de un autodiagnóstico (en mujeres de escolaridad primaria), construido a partir de la conjunción de síntomas, experiencias de personas cercanas, información obtenida de medios de comunicación o internet, e imaginarios de familiares o amigos. Decían tener alguna enfermedad (a la que daban el nombre científico), sin haber tenido ningún contacto con un centro de atención sanitaria para un diagnóstico.

*Puesss, yo creo que, pues realmente no me enfermaba tanto allá, lo que si me ha surgido importante ahora esss que por el tema emocional, todo lo que he pasado, eso sí, estoy padeciendo de una diverticulitis, pero ya estando aquí fue que empecé a padecer de eso, es más por la parte emocional, seguro!. (Rosa).*

Como lo describen otros autores, las narrativas confirmaron que, con el tiempo, su salud se deteriora a causa del proceso de aculturación, barreras en el acceso a los servicios sanitarios, obstáculos administrativos, y condiciones laborales en el país de destino (EWSI, 2018; Hernández-Quevedo & Jiménez-Rubio, 2009).

En el caso de las mujeres cabeza de hogar<sup>3</sup> y sin la presencia de sus hijo(a)s, la depresión, apareció como enfermedad asociada a la migración. Manifestaban una constante preocupación por su bienestar y sentimiento de culpa por no verlos crecer.

*Yo no he sido enferma, gracias a Dios, siempre he estado bien, yo poco de enfermedades. Ahora me coge como una tristeza y ganas de llorar ¿será por la menopausia? (Luz).*

Quienes migraron en la década de los 90 's, estuvieron lejos de sus hijo(a)s por más de 10 años, y referían que trabajaban también para mantener la mente ocupada. Asociaban su continua tristeza a procesos biológicos y enfermedades orgánicas, con una negación discursiva de la causa emocional.

Los discursos de los profesionales suponían que el perfil epidemiológico y la carga de enfermedad no difería sustancialmente entre la población autóctona y la población inmigrante. Identificaron la movilidad como principal dificultad para hacer un seguimiento epidemiológico; enfatizando en que Salamanca era una ciudad de tránsito.

*Que yo sepa, consultan por cosas muy parecidas, cuando yo trabajaba en el hospital no veíamos diferencias entre la población española y ellos, que yo recuerde no, aunque puede ser que me equivoque, pero normalmente lo que se ha visto es que al llegar*

<sup>3</sup> Término utilizado para referirse a la mujer que tiene la responsabilidad del sostenimiento del hogar en solitario, por la ausencia permanente o abandono del hogar por parte de la pareja, o el incumplimiento de sus obligaciones como padre; bien sea por incapacidad física, sensorial, psíquica o mental o por muerte; teniendo a cargo hijo(a)s menores u otras personas de su familia, incapacitadas o dependientes.

*aquí la salud de las personas mejora, quizá por la alimentación, en caso de que muera es porque ya traía la enfermedad avanzada desde su país, como el caso de la mortalidad por Cáncer de útero que te comenté (Técnica Junta de Castilla y León).*

Es evidente una oposición entre la morbilidad sentida y la interpretada por los profesionales, quienes refieren procesos de mejoramiento de la salud. Los profesionales desconocen, que existe una relación sindémica entre las enfermedades desarrolladas por los inmigrantes, y sus procesos migratorios, lo que impide la reconstrucción de la morbilidad y la vigilancia en salud pública. Así como, las enfermedades psico emocionales, laborales y crónicas, necesarias para direccionar la atención sanitaria, las líneas de priorización de los servicios sociales, y el diseño de proyectos con enfoque multidimensional (Willen, Mulligan & Castañeda, 2011).

### 3.4 EL TRABAJO, LO PRIMERO

La disponibilidad de tiempo fue uno de los factores determinantes en sus itinerarios terapéuticos, que se presentó como un reto sanitario de difícil solución, asociado a sus extensas jornadas laborales, el cuidado de los hijo(a)s o nieto(a)s, y los trámites administrativos para la regularización de su situación jurídica. Los horarios laborales, de las mujeres que trabajaban al cuidado de niños o personas mayores (como internas), reducían el tiempo para asistir a chequeos y consultas médicas ambulatorias.

*En el momento tiempo no tengo. Tengo 36 horas libres a la semana y son para descansar. (Diana).*

*Yo tengo una agencia matrimonial y así puedo estar pendiente de las niñas, porque trabajo desde mi casa por internet... lo que veo es que todas las extranjeras tienen que integrarse y aprender a cocinar, planchar hacer servicios domésticos, cuidar personas, como si no valiéramos para otras cosas (Clara).*

Existe una relación ligada al proceso histórico laboral de las mujeres latinoamericanas que viajaban solas, las cuales en la década de los años 80's y 90's ocuparon los escenarios del servicio doméstico. Por tal motivo, la inserción laboral se hace en este sector y en algunos casos, a través del autoempleo o la creación de empresa (peluquerías, locutorios). Muchas de las cuales, pueden ser definidas como empresa-guardería, por "aprovechar el espacio para tener a los niños con ellas y poder así compatibilizar las horas de trabajo con el cuidado de los descendientes" (Oso Casas, 2010, p. 43).

Otras mujeres, al haber estado separadas de sus hijo(a)s por un periodo de tiempo prolongado, sienten una responsabilidad mayor sobre su cuidado, reflejando



una de las consecuencias de haber establecido relaciones de maternidad transnacional en el pasado; o simplemente por el rol de madre soltera que han ejercido desde su llegada. Quienes han estado en gestación en España, describen que, en sus países de origen, el proceso de parto es una experiencia llena de manifestaciones de protección y afecto, narrando sus sentimientos de soledad y de tristeza, al estar lejos; teniendo un gran impacto en el desarrollo emocional durante el posparto. Esto coincide con lo mencionado por Roger (2010): ante la ausencia de otras figuras femeninas como la madre, abuela, hermana, suegra (que son quienes transmiten los conocimientos durante esta etapa); viven situaciones de angustia al no saber qué hacer, recurriendo a la comunicación transnacional.

### 3.5 AUTOMEDICACIÓN: EL RETRASO DE LA CONSULTA AL MÉDICO

Se encontró que la consulta al médico, se reemplazaba por la automedicación, el uso de la medicina tradicional, y la consulta transnacional a su madre.

*A veces me duele mucho el cuerpo, y yo me tomo un ibuprofeno o paracetamol, lo que tenga (Amparo).*

La frecuencia de uso de los servicios mostró que asisten al médico de cabecera una o dos veces al año, y al servicio de urgencias solo en los casos en que lo consideran necesario: bocio tiroideo no diagnosticado, fracturas, alergias o reacciones anafilácticas, y tos seca de larga duración (mayor a un año). Algunas incluso refieren que no han consultado por urgencias, a pesar de llevar más de 5 años en España.

*Yo a los controles del embarazo, de resto no, yo la verdad no. Yo la verdad como no lo he necesitado solo cuando he estado embarazada y como hay que ir a los controles, no he estado mala no he necesitado de ir (Isabel).*

*5 o 6 veces en 18 años, a urgencias. Por el dolor de tripa y la alergia al frío. (Luz).*

Otra de las razones para aplazar la consulta al médico, es la enfermedad de otro miembro de la familia. Las mujeres referían una jerarquización de sus prioridades: 1. Hijo(a)s, 2. Padres y esposos, 3. Ellas y su condición de enfermedad o malestar. Convivían con dolores por años, que trataban con analgésicos y antiinflamatorios.

Estas conductas han sido descritas por otros autores, concluyendo que la familia representa la principal institución suministradora de asistencia, en las situaciones de dependencia: crianza, gestación, educación y cuidados entre otras (Comas d'Argemir, 2000). Lo que en el contexto transnacional otorga un protagonismo mayor, por la separación temporal de sus hijo(a)s, el distanciamiento físico con sus padres, el cuidado de otras personas como forma de trabajo, y la maternidad en solitario.

### 3.6 LA VIOLENCIA DE GÉNERO Y EL ROL DE LA MUJER

Las narrativas desvelaron los significados sociales de la mujer y como se normalizan y reproducen los comportamientos de agresión.

*Nada de eso, yo sé que me pegaba mi marido. Yo me cansé y me abrí. No denuncie a nadie por no tener rechazos por parte de mis hijos. Yo le dije a él solo quiero el divorcio, eso ya hace 8 años. Cuando tomaba, ahí me zarandeaba (Luz).*

*Porque al preguntar si su marido le agrede, responden: lo normal, como si se tolerara (Técnico Ayuntamiento).*

La agresión verbal y física ha sido normalizada de generación en generación, alimentada por la cultura de sus países de origen. Sin embargo, quienes migraron hace varios años modularon su autoconcepto y reconocieron que la frecuencia social de las agresiones, no significaba que fuera un comportamiento natural. En otros casos, el tiempo de tolerancia estaba mediado por su historia familiar, juicios de valor de sus madres, y solicitudes de sus hijo(a)s.

Estos resultados han sido categorizados por otros autores en 6 factores que incrementan el riesgo de sufrir violencia de género en grupos de inmigrantes: 1. Estatus sociocultural, 2. Aculturación, 3. Roles de género, 4. Tensiones y desafíos asociados al estatus de inmigrante, 5. Percepciones de las mujeres. 6. Tolerancia hacia la violencia de pareja (Gracia, Herrero, & Lila, 2010). Cada uno de ellos caracteriza la situación de la mujer, aportando información heterogénea de acuerdo a su nacionalidad, nivel de escolaridad, tiempo de permanencia, roles aprendidos, estatus socio jurídico en España, autoestima y relaciones familiares e interpersonales.

El rol de la mujer en el cuidado de la salud, es de proveedoras de conocimientos y cuidados, tanto para quienes tienen pareja como para quienes no.

*Ufff no solo en el cuidado de la salud desempeña un papel importante, yo veo que, en todo, nosotras somos la base de todo, la verdad... y la salud claro porque sea la mamá, sea la hija siempre está pendiente, abríguese, cuídese, tómese esto, si estas enferma, que tu caldito que... ¡ay yo extrañe a mi mama tanto cuando me dio mi primer resfriado! (Patricia).*

Situaciones como la violencia, enfermedades, y embarazo en la adolescencia, determinan su papel de madre de manera temprana, llevándolas a asumir un gran compromiso familiar. Esto hace que la mujer se reconozca como madre y cuidadora, estableciéndose estrechas relaciones con su progenitora e hijas; que se alteran con los procesos migratorios, provocando nuevos desplazamientos y conexiones transnacionales favorecidos por la dependencia emocional.

Otras investigaciones coinciden en que quienes no comparten la crianza y el cuidado de sus hijos con el padre, asumen la responsabilidad total. Así como la existencia de un vínculo entre el bienestar y la atención que proveen las madres; donde alimentos, infusiones, y manifestaciones afectivas, cobran un valor relacionado con la sanación (Moro Gutiérrez, Pena Castro & Fiol Ruiz, 2018).

## 4 CONCLUSIONES

La connotación de la salud y la enfermedad, supera lo orgánico, e incluye símbolos religiosos y subjetivos, en los que se intersectan otros condicionantes como el género, la edad, los itinerarios terapéuticos, y los imaginarios socio culturales.

La atención de las mujeres inmigrantes latinoamericanas requiere el análisis del perfil epidemiológico, la salud auto percibida y su rol como mujer cabeza de hogar, madre y cuidadora.

El sistema sanitario actual requiere una adaptación estructural y operativa, que elimine la xenofobia, la deshumanización, la automedicación, la ausencia de datos epidemiológicos y falta de formación de los profesionales en la prestación de los servicios a colectivos diferenciales.

La maternidad transnacional es un desafío para los servicios de salud por: la diversidad de roles paralelos, las condiciones jurídicas para la obtención de derechos, la percepción de la atención sanitaria y la priorización del empleo sobre la salud.

Es fundamental que el sector sanitario se aproxime a escenarios vinculantes con la maternidad transnacional, como: el sector educativo, laboral y político. Este último para determinar las prioridades de las agendas, e incluir las conexiones y dialécticas que limitan el acceso de las mujeres a la sanidad, en las políticas públicas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bermúdez, E. M. (2004). Imágenes de la salud y enfermedad de las mujeres colombianas inmigrantes en España. *Revista Gerencia y Políticas de Salud*, 3 (7), 78-100. Recuperado de <https://revistas.javeriana.edu.co>

Carballo de la Riva, M. (2017). La agenda de migración y desarrollo en el marco internacional de las Naciones Unidas: hacia un pacto mundial para las migraciones. *Revista del Ministerio de empleo y seguridad social*, 15-44.

Comas d' Argemir, D. (2000). Mujeres, familia y estado de bienestar. En T. Del Valle (Ed.), *Perspectivas feministas desde la antropología social* (pp. 187-204). Barcelona: Ariel.

De Miguel, J. M (1985). *La salud pública del futuro*. Barcelona: Ariel S.A.

Engelhardt, D. (2004). *El principio de la subjetividad en la antropología del siglo XX*. En D. von Engelhardt, J. A. Mainetti, L. Meyer, A. R. Cataldi. (Eds.), *Bioética y humanidades médicas* (pp. 65-74). Buenos Aires: Biblos.

- Esteva Fábregat, C. (1973). La Antropología Aplicada y su problemática. *Reunión de Antropólogos Españoles, Sevilla*, 253-321. Recuperado de <https://idus.us.es/>
- European Web Site of Integration (EWSI). (2018). *Migrant health across Europe: Little structural policies, many encouraging practices*. Recuperado de <https://ec.europa.eu/migrant-integration/feature/migrant-health-across-europe>
- Gracia, E., Herrero, J., & Lila, M. (2010). Percepciones y actitudes hacia la violencia de pareja contra la mujer en inmigrantes latinoamericanos en España. *Psychosocial Intervention*, 19(2), 135-144.
- Hernández-Quevedo, C., & Jiménez-Rubio, D. (2009). A comparison of the health status and health care utilization patterns between foreigners and the national population in Spain: new evidence from the Spanish National Health Survey. *Social Science & Medicine*, 69(3), 370-378. doi.org/10.1016/j.socscimed.2009.05.005
- Lain Entralgo, P. (1985). *Antropología médica para clínicos*. Barcelona: Salvat S.A.
- López Hernández, K. (2013). La Casa, un pedacito de Colombia en Paris. Etnografía de un espacio transnacional. En F.O. Esteban (Ed.), *Espacios transnacionales de la migración latinoamericana en Europa* (pp. 83-100). Buenos Aires: Antropofagia.
- Moreno Preciado, M (2010). Nuevos enfoques en el cuidado del “otro”. *Index de Enfermería*, 19(2-3), 167-171. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/>
- Moro Gutiérrez, L., Pena Castro, M. J., & Fiol Ruiz, M. (2018). Inmigrantes latinoamericanas en Salamanca: estudio de experiencias y casos. *Comunitania*, (15), 137-157. Recuperado de <http://www.comunitania.com/>
- Oso Casas, L. (2010). Movilidad laboral de las mujeres latinoamericanas en España y empresariado étnico. En Grupo Interdisciplinario de Investigadoras Migrantes [GIIM] (Coord.), *Familias, niños, niñas y jóvenes migrantes. Rompiendo estereotipos* (pp. 33-46). Madrid: IEPALA.
- Pedone, C. (2006). La maternidad transnacional: nuevas estrategias familiares frente a la feminización de las migraciones latinoamericanas. *Instituto de Infancia y Mundo Urbano (CIIMU)-Universidad Autónoma de Barcelona*.
- Roger, L. (2010). Voces y experiencias de mujeres migrantes. En Grupo Interdisciplinario de Investigadoras Migrantes [GIIM] (Coord.), *Familias, niños, niñas y jóvenes migrantes. Rompiendo estereotipos* (pp. 197-210). Madrid: IEPALA.
- Sargent, C. (2005). Counseling Contraception for Malian Migrants in Paris: Global, State, and Personal Politics. *Human Organization*, 64(2):147-156. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/44127250>
- Sargent, C., & Larchanché, S. (2007). The Muslim Body and the Politics of Immigration in France: Popular and Biomedical Representations of Malian Migrant Women. *Body and Society*, 13(3):79-102. doi.org/10.1177%2F1357034X07082253
- Shore, C. (2010). La antropología y el estudio de la política pública: reflexiones sobre la formulación de las políticas. *Antípoda. Revista de antropología y arqueología*, (10), 21-49. doi: 10.7440/antipoda10.2010.03
- Willen, S. S., Mulligan, J., & Castañeda, H. (2011). Take a stand commentary: how can medical anthropologists contribute to contemporary conversations on “illegal” im/migration and health? *Medical Anthropology Quarterly*, 25(3), 331-356. doi.org/10.1111/j.1548-1387.2011.01164.x

## CAPÍTULO 3

### CONTRIBUTOS DA ATENÇÃO VISUAL NA PROMOÇÃO DA SAÚDE DE CRIANÇAS SURDAS

Data de submissão: 13/01/2023

Data de aceite: 30/01/2023

**João Dele**

Universidade de Aveiro  
Aveiro – Portugal

<https://orcid.org/0000-0001-8672-500X>

**Anabela Maria Sousa Pereira**

Universidade de Évora  
Évora – Portugal

<https://orcid.org/0000-0002-3897-2732>

**Paula Ângela Coelho Henriques dos Santos**

Universidade de Aveiro  
Aveiro – Portugal

<https://orcid.org/0000-0001-7898-8731>

**Paulo Jorge Pereira Alves**

Instituto Piaget de Viseu  
Viseu – Portugal

<https://orcid.org/0000-0002-5028-2013>

**RESUMO:** A atenção visual é um processo cognitivo que permite a filtragem de informações provenientes do ambiente circundante, úteis para orientar o comportamento do sujeito. O cérebro humano gere os sentidos e, pelo fato de estes serem interligados, a ausência de um influencia,

de alguma maneira, o funcionamento do sistema sensorial, capitalizado pelo cérebro. Relativamente aos efeitos da ausência de um dos sentidos, as posições dos estudiosos não são unânimes, aparecendo na literatura a teoria deficitária, a compensatória e a integrativa. Numa sociedade dominada por ouvintes, a surdez, vista por muitos como uma deficiência, pode prejudicar o bem-estar social da criança surda e, conseqüentemente, a sua saúde integral. O objetivo do estudo é, a partir dos estudos feitos entre 2000 e 2019, perceber o contributo da atenção visual na promoção da saúde de crianças surdas, tendo em conta que o tempo de surdez e a idade cronológica, aliados a um ambiente estruturado, podem influenciar positivamente a atenção visual.

**PALAVRAS-CHAVE:** Atenção visual. Criança. Surdez. Deficiência auditiva.

#### VISUAL ATTENTION CONTRIBUTIONS TO DEAF CHILDREN HEALTH PROMOTION

**ABSTRACT:** Visual attention is a cognitive process that allows surrounding environment information's filtering, useful to guide the subject's behavior. Human brain manages the senses and, because they are interconnected, absence of one influence, in some way, sensorial system functioning, capitalized by the brain. About effects of one sense absence, scholars' positions are not unanimous, appearing in the literature a deficit theory, a compensatory theory, and an integrative

theory. In a society dominated by hearing people, deafness, seen by many as a disability, can harm social well-being of deaf children and, consequently, their overall health. This study, based on studies carried out between 2000 and 2019, aims to understand visual attention contribution to promoting deaf children health, considering that deafness duration and chronological age, combined with a structured environment, can positively influence visual attention.

**KEYWORDS:** Visual attention. Child. Deafness. Hearing impairment.

## 1 INTRODUÇÃO

A atenção não é um conceito unívoco, é um processo multifacetado, pois existem vários tipos de atenção: alerta atencional, atenção sustentada, atenção orientada, atenção seletiva, atenção dividida (DYE; BAVELIER, 2013). O desenvolvimento da atenção é um processo complexo para as crianças, dada a natural dificuldade delas em prestar atenção (DYE; BAVELIER, 2010b). Para as crianças surdas, o desenvolvimento da atenção visual tem implicações na aprendizagem da leitura, no pensamento conceitual e no seu desempenho em sala de aula (DAZA; PHILLIPS-SILVER, 2013), sendo, deste modo, uma condição importante para o seu bem-estar.

Ao lado das duas posições teóricas antagônicas sobre os efeitos da surdez – a teoria da deficiência e a teoria compensatória – surge a teoria integradora, que considera muito específicas e selectivas (DYE; HAUSER; BAVELIER, 2006) as respostas do cérebro após a perda auditiva, não sendo, portanto, garantida uma reorganização cerebral de tipo claramente deficitário ou compensatório.

Para as crianças com um desenvolvimento típico, o sistema sensorial, composto pelos cinco sentidos – visão, audição, tato, paladar e olfato – funciona de maneira integrada, de tal forma que no exercício de uma tarefa central em que a atenção é requisitada, as outras informações são minimizadas, permitindo uma filtragem adequada das informações (DYE; BAVELIER, 2013). Na ausência de um dos sentidos, o desenvolvimento atípico resultante torna a relação com o ambiente circundante mais exigente. No tocante às crianças com perda auditiva severa a profunda, o desenvolvimento da atenção visual segue uma estratégia mais distribuída, dado que elas também devem usar a visão para monitorar o ambiente à sua volta (THARPE et al., 2008), o que torna o processo de atenção mais lento para elas (ROTHPLETZ; ASHMEAD; THARPE, 2003; SLADEN et al., 2005).

A presente revisão da literatura visa destacar o contributo da atenção visual na promoção da saúde de crianças surdas, com base em estudos feitos entre 2000 e 2019. Serão passadas em revista as posições teóricas sobre os efeitos da surdez na organização sensorial do cérebro humano, os conceitos de tempo e espaço para o

surdo, os efeitos da surdez no cotidiano do surdo e os desafios futuros da escola e da investigação para a promoção de um ambiente que favoreça o desenvolvimento da atenção visual em crianças surdas.

## 2 AS PERSPETIVAS DEFICITÁRIA, COMPENSATÓRIA E INTEGRADORA

Os sentidos são janelas pelas quais o sujeito humano entra em contato com o mundo e forma o seu sistema cognitivo (ROTHPLETZ; ASHMEAD; THARPE, 2003). A teoria da interação multimodal defende que os nossos sentidos são interdependentes, necessitando um do outro para formar as habilidades cognitivas (MONROY et al., 2019). Essa interdependência faz com que o comprometimento sensorial congênito numa modalidade possa levar a uma reorganização das conexões neurais (SLADEN et al., 2005) e, assim, o funcionamento atípico de um deles desde o nascimento resulte em efeitos generalizados em várias modalidades sensoriais e domínios cognitivos, razão pela qual existem diferenças nas habilidades cognitivas gerais entre crianças surdas e ouvintes (MONROY et al., 2019).

A literatura relativa ao estudo da atenção visual em surdos apresenta duas perspectivas concorrentes (DYE; BAVELIER, 2010a) e uma integradora, todas baseadas em princípios de neuroplasticidade, partindo do pressuposto de que o desenvolvimento da organização e função do cérebro muda como resultado da maior alteração na experiência ambiental que acompanha a surdez (DYE; BAVELIER, 2013):

- a) A perspectiva do *deficit* no funcionamento das estruturas sensoriais remanescentes, que sustenta a existência de efeitos adversos nos sistemas sensorial e perceptivo (PAVANI; BOTTARI, 2011; ROTHPLETZ; ASHMEAD; THARPE, 2003), propondo a necessidade do *input* auditivo para o desenvolvimento da atenção visual (DYE; BAVELIER, 2010a);
- b) A perspectiva de um aprimoramento das estruturas sensoriais remanescentes após a privação auditiva, que sustenta uma reorganização neural a favor da atenção visual para permitir que o indivíduo compense a falta de *input* auditivo (DYE; BAVELIER, 2010a; PAVANI; BOTTARI, 2011; ROTHPLETZ; ASHMEAD; THARPE, 2003). Assim, após a privação sensorial, as áreas do cérebro, que normalmente estão associadas ao sentido perdido, são recrutadas para realizar funções nas modalidades intactas remanescentes (VACHON et al., 2013);
- c) Uma terceira perspectiva, chamada integradora (DAZA; PHILLIPS-SILVER, 2013; DYE; BAVELIER, 2010a), defende uma trajetória de desenvolvimento em

que as fronteiras entre as duas perspectivas (de deficiência e compensatória) não são reciprocamente exclusivas, mas integradas. Segundo esta visão, os efeitos iniciais da privação auditiva na atenção visual não podem ser descritos simplesmente como deficiências ou aprimoramentos, isto é, a privação auditiva precoce não resulta em melhor ou pior atenção visual, porque os aspetos selecionados da atenção visual podem ser modificados de várias maneiras ao longo do percurso do desenvolvimento de um indivíduo (DAZA; PHILLIPS-SILVER, 2013; DYE; BAVELIER, 2010a) e são bastante específicos (DYE; BARIL; BAVELIER, 2007; SLADEN et al., 2005; THARPE et al., 2008), resultando em alguns momentos deficitários na perspectiva de um organismo em desenvolvimento e em outros aprimorados, numa perspectiva ecologicamente adaptativa (DYE; BAVELIER, 2013).

### 3 O ESPAÇO E O TEMPO NA ATENÇÃO VISUAL

Os estudos da atenção visual têm sido realizados a partir de determinadas perspectivas ou aspetos específicos da atenção, tais como o temporal, que dá lugar à hipótese de deficiência e o espacial, que dá lugar à hipótese compensatória, mas poucos estudos relevaram, de forma integrada, os vários aspetos da atenção visual (DAZA; PHILLIPS-SILVER, 2013; DYE; BAVELIER, 2010a).

A visão e a audição, apesar de serem dois sentidos distintos, são complementares no que toca à interpretação sensorial do espaço e do tempo. Se a visão tem por função o rastreamento do espaço para permitir o organismo colocar-se e navegar adequadamente nele, a audição processa a sequência temporal dos eventos e adverte a visão para os fenómenos que acontecem fora do arco visual. A audição e o olfacto, por exemplo, fornecem informações sobre regiões do ambiente que estão além dos limites da percepção visual ou estão longe. A audição fornece, assim, informações espaço-temporais de um estímulo não visível, completando o sentido da visão (PAVANI; BOTTARI, 2011). Desta forma, na ausência do *input* auditivo, a visão da pessoa surda é recrutada para assumir também a função da audição (DYE; BAVELIER, 2013; SLADEN et al., 2005), sendo, por isso, levada a desenvolver a sua ação pelo espaço periférico, por vezes com algum prejuízo do espaço ou da tarefa central (ROTHPLETZ et al., 2003; VERCILLO; JIANG, 2017), resultando, contudo, em vantagem na atenção visual em relação aos ouvintes (DYE; BAVELIER, 2013; DYE; HAUSER; BAVELIER, 2009; SEYMOUR et al., 2017). Ainda assim, alguns pesquisadores defendem que não existem déficits ou melhorias visuais generalizados em indivíduos surdos (ROTHPLETZ et al., 2003; THARPE et al., 2008).



Para compensar a falta de alerta auditivo e, deste modo, abordar objetos fora do foco de atenção, os indivíduos surdos desenvolvem a atenção periférica reforçada no espaço próximo bem como a atenção periférica e central no espaço distante, pois a estimulação do espaço distante, tanto periférico como central, são relevantes para a comunicação em língua gestual (CHEN et al., 2010). Durante a comunicação por língua gestual, os surdos fixam-se principalmente na região facial do emissor, para detectar pequenos movimentos detalhados associados à expressão facial e forma da boca, pois o rosto dá pistas sobre o significado dos gestos (MUIR; RICHARDSON, 2005). Muir e Richardson (2005), examinando a influência do conteúdo de vídeo em língua de sinais nos mecanismos de atenção de espectadores surdos e as implicações para o projeto de sistemas de comunicação por vídeo para pessoas surdas, concluíram que os participantes (surdos) não seguiam os movimentos das mãos ou movimentos detalhados dos dedos durante os períodos de digitação, sugerindo que a informação do sinal manual foi observada em visão periférica, pelo fato de serem gestos grandes e menos detalhados, passíveis de serem observados pelo recetor com baixa acuidade visual.

Relativamente à idade, as crianças, por natureza, advertem maiores dificuldades na atenção, o que se reflete também na componente temporal da atenção visual, e isso é tanto mais forte quanto mais tardia for a exposição da criança à língua, tanto falada como de sinais (DYE, 2014).

O tempo de exposição à surdez precoce e, conseqüentemente, a idade cronológica, parecem ser fundamentais na reorganização neural, favorecendo a atenção seletiva (DYE; HAUSER, 2014; DYE; HAUSER; BAVELIER, 2009), o que faz com que as crianças surdas, a partir dos 9 anos, tenham cada vez menos dificuldades na atenção seletiva (DYE; HAUSER, 2014) e, a partir da pré-adolescência, desenvolvam um melhor campo de visão útil (DYE; HAUSER; BAVELIER, 2009; DYE; BAVELIER, 2013). Em vários estudos utilizando o *Continuous Performance Test* (CPT), foram demonstrados déficits na atenção sustentada em populações de crianças surdas (DYE; BAVELIER, 2013). Ainda em crianças, a reorganização da atenção visual seletiva é acionada por estímulos ambientais, mormente formais e estruturados (DYE; HAUSER; BAVELIER, 2009), sugerindo que a escola, que é um ambiente formal, se estiver bem estruturada, pode favorecer a reorganização da atenção visual em crianças surdas.

#### **4 O DIA-A-DIA DO SURDO: VANTAGENS OU DESVANTAGENS?**

Uma questão que não se cala, voltada para as implicações práticas do estudo da atenção visual em crianças surdas, é se o aprimoramento nas habilidades visuais confere vantagens na vida quotidiana do surdo (DYE; HAUSER; BAVELIER, 2009).

A resposta a essa questão não é fácil, dada a etiologia complexa da surdez, pois a maior parte da literatura que sustenta deficits ou aprimoramentos baseou os seus estudos incluindo indivíduos surdos com origens heterogêneas ou focando a atenção em amostras pequenas da população surda, geralmente filhos de surdos (DYE; HAUSER; BAVELIER, 2009). Por outro lado, seja qual for a resposta cerebral à ausência do sentido de audição (ou outro sentido), é importante que tal resposta seja associada a uma melhoria comportamental do sujeito (PAVANI; BOTTARI, 2011), sem a qual ficaria tudo ao nível de compreensão teórica e não contribuiria para eventuais propostas de intervenção a favor da criança surda.

Dye, Hauser e Bavelier (2009), estudando a atenção seletiva em adultos e crianças surdos e ouvintes, concluíram que após a perda auditiva precoce, os recursos de atenção visual para a periferia aumentam lentamente, resultando em vantagem comportamental a partir da pré-adolescência. Segundo Chen et al. (2010), dá-se uma redistribuição de mais recursos atencionais para a periferia visual no espaço próximo, especificamente sob condições de atenção seletiva, provavelmente para compensar a perda do alerta auditivo para estímulos potencialmente perigosos de fora do foco atual de atenção. É uma estratégia usada pelo cérebro, sobretudo em adolescentes e adultos surdos, distribuindo a atenção pelo campo visual periférico, devido à incerteza sobre onde, no campo visual, um alvo periférico pode aparecer (DYE; BAVELIER, 2013). Assim, pode-se supor que uma reatividade mais rápida aos eventos visuais em indivíduos surdos possa servir principalmente ao propósito de desencadear respostas de orientação (PAVANI; BOTTARI, 2011).

Ao estudar eventuais diferenças na atenção sustentada e seletiva entre crianças surdas de pais surdos e ouvintes de 6 a 13 anos, Dye e Hauser (2014) não relevaram diferenças no que toca à atenção sustentada. No entanto, as crianças surdas mais jovens foram mais distraídas por informações irrelevantes para a tarefa no seu campo visual periférico. No que toca à atenção seletiva, as crianças surdas produziram um número maior de erros, resultado atribuído à dificuldade no controlo endógeno dos recursos de atenção visual realocados, decorrentes da surdez profunda precoce (DYE; HAUSER, 2014) bem como ao custo do controlo do espaço periférico em relação ao central (ROTHPLETZ et al., 2003; VERCILLO; JIANG, 2017). Segundo Monroy et al. (2019), a aprendizagem sequencial, resultante da experiência sonora, influencia uma variedade de habilidades cognitivas de domínio geral e a sua ausência pode ter consequências generalizadas em vários aspetos do desenvolvimento. Assim, segundo Monroy et al., as crianças pequenas com surdez precoce, vistas numa perspetiva de desenvolvimento em relação aos seus

pares ouvintes, apresentam pior desempenho em múltiplas habilidades cognitivas não-verbais, tais como atenção visual controlada, processamento de seqüências e memória de trabalho, bem como nas habilidades motoras que exigem habilidades cognitivas, tais como a coordenação espacial e as habilidades de integração visuo-motora.

Para Dye (2014), os aspectos temporal e espacial vão lentamente melhorando em indivíduos surdos, à medida que vai despertando a atenção visual, a partir dos 6 anos. Este dado reforça a necessidade da existência de um ambiente estruturado para o reforço da reorganização da atenção seletiva (DYE; HAUSER; BAVELIER, 2009).

Bottari, Valsecchi e Pavani (2012) sugerem aos projetistas de ambientes reais ou virtuais a remoção ou limitação de eventos de distração, uma vez que os surdos recolhem mais elementos do espaço por usarem também a visão para substituírem a audição, alocando os seus recursos visuais numa faixa mais ampla do que aqueles com audição normal (SLADEN et al., 2005; THARPE et al., 2008).

## 5 CONCLUSÃO

A audição é complementar à visão e a sua importância vai além da detecção dos estímulos que escapam à visão. Os ambientes em que as crianças passam maior parte do seu tempo, tais como casa, escola, Igreja ou associações, bem como os percursos habituais que usam para ligar tais ambientes, podem ser vistos como oportunidades para melhorar a saúde e a qualidade de vida das crianças surdas se forem estruturados (DYE; HAUSER; BAVELIER, 2009) no que toca à atenção visual, mormente das crianças surdas.

## REFERÊNCIAS

BOTTARI, D.; VALSECCHI, M.; PAVANI, F. Prominent reflexive eye-movement orienting associated with deafness. **Cognitive Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 8-13, 2012. Disponível em <https://doi.org/10.1080/17588928.2011.578209>

CHEN, Q.; HE, G.; CHEN, K.; JIN, Z.; MO, L. Altered spatial distribution of visual attention in near and far space after early deafness. **Neuropsychologia**, v. 48, n. 9, p. 2693-2698, 2010. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2010.05.016>

DAZA, M. T.; PHILLIPS-SILVER, J. Development of attention networks in deaf children: Support for the integrative hypothesis. **Research in Developmental Disabilities**, v. 34, n. 9, p. 2661-2668, 2013. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.ridd.2013.05.012>

DYE, M. W. G. Temporal entrainment of visual attention in children: Effects of age and deafness. **Vision Research**, v. 105, p. 29-36, 2014. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.visres.2014.09.001>

DYE, M. W. G.; BAVELIER, D. Attentional enhancements and deficits in deaf populations: An integrative review. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 28, n. 2, p. 181-192, 2010a. Disponível em <https://doi.org/10.3233/RNN-2010-0501>

DYE, M. W. G.; BAVELIER, D. Differential development of visual attention skills in school-age children. **Vision Research**, v. 50, n. 4, p. 452-459, 2010b. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.visres.2009.10.010>

DYE, M. W. G., BAVELIER, D. Visual attention in deaf humans: a neuroplasticity perspective. In A. Kral, R. R. Fay, A.N. Popper (Eds.), **Springer Handbook of Auditory Research: Deafness**, New York, p. 237-263, 2013. Disponível em [https://doi.org/10.1007/2506\\_2013\\_9](https://doi.org/10.1007/2506_2013_9)

DYE, M. W. G.; HAUSER, P. C. Sustained attention, selective attention and cognitive control in deaf and hearing children. **Hearing Research**, v. 309, p. 94-102, 2014. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.heares.2013.12.001>

DYE, M. W. G.; BARIL, D. E.; BAVELIER, D. Which aspects of visual attention are changed by deafness? The case of the Attentional Network Test. **Neuropsychologia**, v. 45, n. 8, p. 1801-1811, 2007. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2006.12.019>

DYE, M. W. G.; HAUSER, P. C.; BAVELIER, D. Do deaf individuals see better? **Trends in Cognitive Sciences**, v. 10, n. 11, p. 512-518, 2006. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.tics.2006.09.006>

DYE, M. W. G.; HAUSER, P. C.; BAVELIER, D. Visual Skills and Cross-Modal Plasticity in Deaf Readers: Possible Implications for Acquiring Meaning from Print. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1145, p. 71-82, 2008. Disponível em <https://doi.org/10.1196/annals.1416.013>

DYE, M. W. G.; HAUSER, P. C.; BAVELIER, D. Is Visual Selective Attention in Deaf Individuals Enhanced or Deficient? The Case of the Useful Field of View. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, e5640, 2009. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005640>

MONROY, C.; SHAFTO, C.; CASTELLANOS, I.; BERGESON, T.; HOUSTON, D. Visual habituation in deaf and hearing infants. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, e0209265, 2019. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209265>

MUIR, L. J.; RICHARDSON, I. E. G. Perception of Sign Language and Its Application to Visual Communications for Deaf People. **Journal of Deaf Studies and Deaf Education**, v. 10, n. 4, p. 390-401, 2005. Disponível em <https://doi.org/10.1093/deafed/eni037>

PAVANI, F.; BOTTARI, D. Visual abilities in individuals with profound deafness: a critical review. In M. M. Murray, M. T. Wallace (Eds.), **The Neural Bases of Multisensory Processes**, p. 423-447, 2011. Disponível em <https://doi.org/10.1201/b11092-28>

ROTHPLETZ, A. M.; ASHMEAD, D. H.; THARPE, A. M. Responses to Targets in the Visual Periphery in Deaf and Normal-Hearing Adults. **Journal of Speech, Language, and Hearing Research**, v. 46, n. 6, p. 1378-1386, 2003. Disponível em [https://doi.org/10.1044/1092-4388\(2003\)107](https://doi.org/10.1044/1092-4388(2003)107)

SEYMOUR, J. L.; LOW, K. A.; MACLIN, E. L.; CHIARELLI, A. M.; MATHEWSON, K. E.; FABIANI, M.; GRATTON, G.; DYE, M. W. G. Reorganization of neural systems mediating peripheral visual selective attention in the deaf: An optical imaging study. **Hearing Research**, v. 343, p. 162-175, 2017. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.09.007>

SLADEN, D. P.; THARPE, A. M.; ASHMEAD, D. H.; GRANTHAM, D. W.; CHUN, M. M. Visual attention in deaf and normal hearing adults: Effects of stimulus compatibility. **Journal of Speech, Language, and Hearing Research**, v. 48, n. 6, p. 1529-1537, 2005. Disponível em [https://doi.org/10.1044/1092-4388\(2005\)106](https://doi.org/10.1044/1092-4388(2005)106)

THARPE, A. M.; ASHMEAD, D.; SLADEN, D. P.; RYAN, H.A.M.; ROTHPLETZ, A.M. (2008). Visual attention and hearing loss: Past and current perspectives. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 19, n. 10, p. 741-747, 2008. Disponível em <https://doi.org/10.3766/jaaa.19.10.2>

VACHON, P.; VOSS, P.; LASSONDE, M.; LEROUX, J. M.; MENSOUR, B.; BEAUDOIN, G.; BOURGOUIN, P.; LEPORE, F. Reorganization of the auditory, visual and multimodal areas in early deaf individuals. **Neuroscience**, v. 245, p. 50-60, 2013. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.004>

VERCILLO, T.; JIANG, F. Spatial modulation of motor-sensory recalibration in early deaf individuals. **Neuropsychologia**, v. 102, p. 39-44, 2017. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2017.06.002>

# CAPÍTULO 4

## MASAJE NEUROREFLEJO EN EL TRATAMIENTO DE PACIENTES CON LUMBALGIA Y CIATALGIA

*Data de submissão: 19/01/2023*

*Data de aceite: 10/02/2023*

### **Dr. Marcos Elpidio Pérez Ruiz**

Doctor en Ciencias Biológicas. PhD

Máster en Medicina Tradicional  
Natural y Bioenergética

Profesor investigador en la  
Facultad de Salud y Cultura Física de la  
Universidad Metropolitana  
del Ecuador

<https://orcid.org/0000-0002-8040-283X>

**RESUMEN:** En la investigación se muestran los resultados obtenidos con el tratamiento de masaje neuroreflejo en los pacientes diagnosticados de sacrolumbalgias y ciatalgia aguda y crónica. Se validaron los esquemas de tratamientos propuestos por el autor de la investigación en 140 pacientes que presentaron dichas afecciones, que habían recibido otros tratamientos medicamentosos y fisioterapéuticos sin resultados satisfactorios. La técnica de tratamiento por masaje utilizada fue la del tejido conectivo modificada por el autor y aplicada sobre las líneas de tensión de la conjuntiva de la piel, la manipulación del tejido celular subcutáneo, músculos y periostio. En todos los casos se logró eliminar la hiperestesia e hiperalgesia en las

zonas correspondientes a los dermatomas afectados. El dolor desapareció en el 98% de los enfermos, las alteraciones de los tejidos conectivo, muscular y piel, desaparecieron en el 95% de los pacientes después de la 8va sesión de tratamiento. Las funciones motoras y cinéticas se restablecieron más rápido en los enfermos agudos. El 98% de los casos afectados se restablecieron. La evolución satisfactoria de los pacientes fue significativa para  $P < 0.01$ .

**PALABRAS CLAVE:** Masaje neuroreflejo. Sacrolumbalgia. Ciatalgia.

### NEUROREFLEX MASSAGE IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH LOW BACK PAIN AND SCIATALGIA

**ABSTRACT:** Research shows the results obtained with the treatment of massage in reflex areas patients diagnosed low back pain and acute and chronic sciatica. Schemes of treatments proposed by the author of the research in 140 patients who presented such disorders, who had received other medicinal and physiotherapeutic treatments without satisfactory results were validated. The massage therapy technique used was that of the connective tissue modified by the author and applied on the lines of tension of the conjunctiva of the skin, the subcutaneous cellular tissue manipulation, muscles, and periosteum. In all cases was achieved to eliminate the hyperesthesia and hyperalgesia

in the areas corresponding to the affected dermatomes. The pain disappeared in 98% of patients, alterations of the tissue connective, muscle and skin, they disappeared in 95% of patients after the 8th session of treatment. Motor and kinetic functions were re-established more quickly in acute patients. 98% of the affected cases were restored. The satisfactory evolution of the patients was significant for  $P < 0.01$ .

**KEYWORDS:** Massage in reflex areas. Low back pain. Sciatica.

## 1 INTRODUCCIÓN

La aplicación de tratamientos conservadores y no invasivos por la medicina moderna se han incrementado en las afecciones del aparato locomotor. Se le brinda una gran atención al tratamiento de los síndromes dolorosos utilizando técnicas de la medicina tradicional y natural, tales como, el masaje, la acupuntura y ejercicios. La tendencia está orientada hacia la utilización de procedimientos terapéuticos más conservadores cada día, con sus indicaciones y contraindicaciones atendiendo al estado y características de la persona (1, 2, 3).

La sacrolumbalgia y cialgia son afecciones que presentan una gran incidencia en la población adulta en nuestro país, debido a diversas causas. Estos síndromes se encuentran entre los más incapacitantes en nuestro medio. Han sido publicados resultados en ensayos clínicos sobre el tratamiento de pacientes con lumbalgia baja aguda, a los que le aplicaron masaje y un programa de ejercicios terapéuticos, incluyendo relajación, obteniéndose excelentes resultados en cuanto a la rapidez de la recuperación y el regreso del paciente a las actividades (4). También Kurebayashi LF, et al (5), han reportado resultados sobre los beneficios del masaje en la disminución de la ansiedad y el estrés. Por otra parte, se ha comprobado científicamente los efectos analgésicos, inmunológicos, homeostáticos, tranquilizadores y recuperadores del masaje y los ejercicios terapéuticos empleando diferentes procedimientos (6, 7).

Las teorías de las zonas reflejas fueron descritas por primera vez por Head y Mackenzie. Los primeros trabajos publicados sobre el tratamiento de zonas reflejas con masaje se dieron a conocer en 1911 y 1912 por los Doctores Barczewski y Van Veen, citado por Kohlrausch (8), probando que los cambios de estado de las zonas reflejas podían servir de punto de partida para mejorar el funcionamiento de los órganos internos en los enfermos. En 1937 Kohlrausch (8), comprobó que las transformaciones hipertónicas de un músculo estaban relacionadas con un órgano enfermo y que desde estas zonas se podía aplicar una terapia por masaje para mejorar el estado del órgano afectado, apoyándose en los reflejos cutáneos viscerales.

En esta investigación se profundiza en el tratamiento con el Masaje Neuroreflejo por los resultados positivos que se han obtenido en los pacientes con afecciones de la columna vertebral y del sistema nervioso periférico durante varios años, según refiere el autor.

Se prueba la efectividad de un nuevo esquema de tratamiento en estos tipos de pacientes planteándose como objetivo.

Evaluar la efectividad del masaje Neuroreflejo en la desaparición de los trastornos musculares, del tejido conjuntivo, alteraciones cinéticas y la sintomatología dolorosa de los pacientes.

## 2 MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionó una muestra de 140 pacientes adultos de ambos sexos, con edades comprendidas entre los 20 y 65 años. Todos recibieron tratamiento en la consulta de Medicina Tradicional y Kinesiología de la Facultad de medicina y del Centro de estudio de Terapias Físicas Naturales en Holguín. La muestra de pacientes estuvo distribuida de la siguiente manera: 90 pacientes corresponden al sexo femenino y 50 al masculino. De ellos 60 habían sido operados de hernia discal lumbar, 25 fueron diagnosticados con hernia discal lumbar y los 55 restantes presentaban cialgia por otras causas. Todos procedían del servicio de neurocirugía y ortopedia de los hospitales Lenin y Clínico Quirúrgico de Holguín, así como de otras áreas de salud. La totalidad habían recibido tratamiento medicamentoso y fisioterapéutico con anterioridad sin obtener resultados satisfactorios.

Para la aplicación del tratamiento se dividió la muestra en dos grupos. El 1er grupo lo constituyeron los afectados por sacrolumbalgias y el 2do grupo formado por los que fueron diagnosticados con cialgia. Se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los pacientes, siguiendo los principios bioéticos.

Los dos grupos se sometieron a tratamiento con masaje neuroreflejo, aplicando en cada caso el esquema de tratamiento propuesto por el autor que se presenta a continuación:

- **Interrogatorio**
- **Examen del paciente.**
- **Estado general del enfermo:** se le presta una gran atención a su desarrollo morfológico y capacidad funcional.
- **Examen postural:**
- Se valoró el equilibrio entre la columna vertebral, la cintura escapular y la cintura pélvica.



- Se determinó si presentaban defectos estáticos en la columna vertebral, piernas, rodillas y pies, así como los territorios dolorosos.
- Alteraciones de los reflejos. Trastornos sensitivos: hipostesia o hiperestesia de la piel, hiperalgesia, alteraciones de la audición y la visión.
- Trastornos (musculares, cinéticos). Se reconocieron las zonas celulíticas, edematosas o congestivas, la hipertonia e hipotonía muscular, miogelosis, las alteraciones del tejido conectivo, y se determinaron los puntos dolorosos y los de hiperalgesia.

Estos elementos fueron indispensables al principio para la adaptación del masaje y después para el control de resultados.

- **Tratamiento.**

Los pacientes fueron tratados en la posición decúbito lateral y decúbito prono, en algunos casos con una almohadilla debajo del abdomen, por encima de las crestas iliacas. El tratamiento fue aplicado por un mismo especialista. El masaje segmentario fue aplicado en aquellos dermatomas donde existían alteraciones de zonas reflejas, fig.1. La técnica empleada fue la del tejido conectivo y el masaje muscular, de acuerdo con las alteraciones del tejido celular cutáneo y subcutáneo y a la hipertonia muscular.

Las manipulaciones empleadas fueron: los trazos o presiones deslizantes realizados sobre las miogelosis en el segmento afectado siguiendo el borde de las zonas. Las vibraciones, frotaciones y amasamientos se aplicaron en los puntos dolorosos, las hipertonías y espasmos musculares.

En todos los pacientes el tratamiento se comenzó con trazos en la región de la pelvis, no lejos del parasimpático sacro siguiendo los criterios de Kohlrausch (8).

Posteriormente se fueron incluyendo otras zonas propuestas por el autor; en las regiones cervicotorácica, lumbosacra, los glúteos y extremidades superiores e inferiores.

El tratamiento con masaje fue dosificado de la siguiente manera: la duración de cada sesión de tratamiento osciló entre los 25 y 30 minutos, de acuerdo con el estado del paciente. Semanalmente se aplicaron como promedio 3 a 5 sesiones de tratamiento.

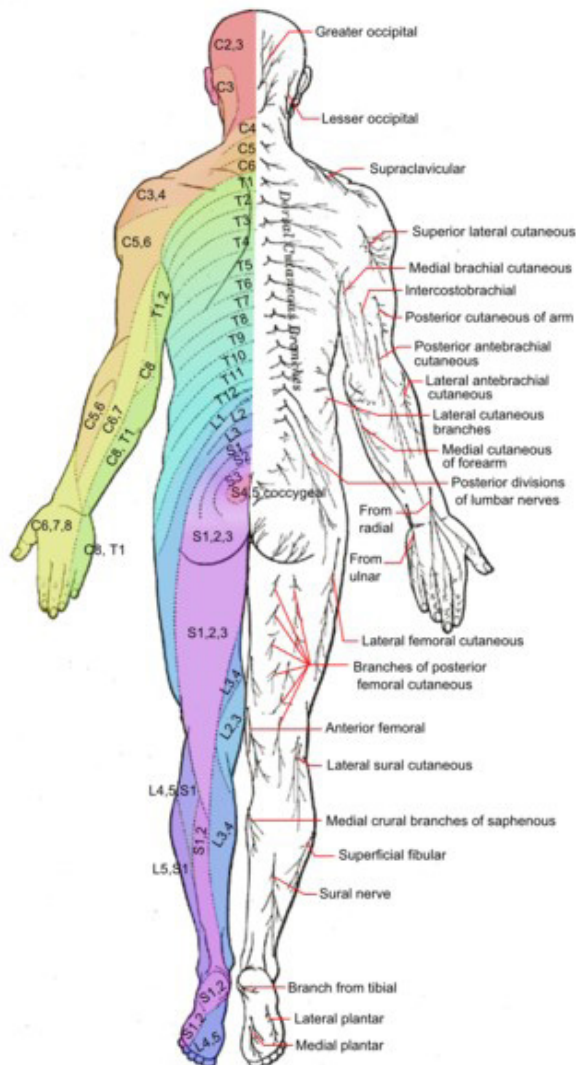
Para la evaluación de los resultados se estableció la siguiente escala de clasificación:

- **Buenos.** - Desaparición del dolor y retorno a las actividades habituales y al trabajo.

- **Regular.** - El paciente presenta alivio del dolor, pero no desaparece totalmente, en determinadas zonas y al realizar algunos movimientos. Mejora la movilidad articular.
- **Malo.** - El enfermo no resuelve con el tratamiento completamente. Disminuyen los dolores parcialmente y no puede integrarse a sus actividades habituales.

Los datos fueron procesados estadísticamente por distribuciones de frecuencia y tablas de doble entrada. Se aplicó la prueba de hipótesis de diferencias de proporciones con un nivel de significación del 1%.

Figura 1. Dermatomas y nervios cutáneos.



### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 FORMA Y SITUACIÓN DE LAS ZONAS SENSIBLES DE LA PIEL Y LAS TANGIBLES DE LA REGIÓN SUBCUTÁNEA Y LOS MÚSCULOS

Resulta necesario detallar los cambios que se encontraron en la piel de los pacientes, en lo que respecta el tejido conectivo y el tejido muscular, antes y después del tratamiento por el masaje de las zonas reflejas. Esto resulta interesante, tomando en cuenta que otros especialistas no reflejan en sus obras la totalidad de las alteraciones o cambios de los tejidos correspondientes a la zona afectada.

En los pacientes que presentaron sacrolumbalgias y ciatalgia, se encontraron alteraciones en la región lumbosacra, a nivel de las últimas vértebras de la región torácica y en las extremidades inferiores. También los músculos intertransversos mediales lumbares y los transversos espinosos se mostraron hipertónicos en el 100% de los pacientes. Además, las fibras del oblicuo externo abdominal, por encima de la cresta ilíaca, presentaron hipertonía, en los músculos glúteos máximo y mediano se encontraron zonas de hipertonía y espasmos. Estas zonas se caracterizaron por tener una resistencia muy elevada en la piel y la región subcutánea, donde al dedo que presiona se le hace difícil penetrar en los tejidos y desplazarlos, evidenciándose una alteración del tejido conectivo. En todos los enfermos aparecieron bandas transversales en dirección de las fibras musculares, que alcanzaban una o dos pulgadas de ancho, muy dolorosas a la palpación y la presión del dedo, denominadas por nosotros zonas de alarma. Manipulando la piel y el tejido conectivo logramos disminuir la tensión en el 100% de los enfermos, haciendo el tejido más elástico a partir de la primera sesión de tratamiento; produciéndose una acción analgésica en la medida que se manipulaban los mismos.

También se encontraron por encima del borde superior de la cresta ilíaca, en su porción anterior y posterior, nódulos blandos e hipertónicos. En ambos casos con la forma y el grosor de una almendra, un frijol, o un guisante. En el primero el dedo pudo penetrar con dificultad, el segundo ofreció gran resistencia al dedo que presionaba, pero ambos mostraron una reacción refleja de hiperalgesia cuando se manipulaba. Con las manipulaciones se logró disminuir la hiperalgesia en el 95% de los pacientes tratados a partir de la primera sesión, a partir de la cuarta sesión de tratamiento el 90% de los pacientes mostraron una desaparición de los puntos de máxima. En el muslo se encontró hipertonía en los músculos siguientes: semimembranoso, semitendinoso, tensor de la fascia lata y en el tracto iliotibial se encontró además una gran tensión. En la parte anterior del muslo apareció hipertonía a nivel de los músculos vasto medial, aductor largo y grácil, que se mostraron muy dolorosos a la palpación y presión de los dedos. En las piernas de

muchos pacientes con lumbociatalgia aparecieron afectadas las raíces L5-S1, con una clara hipertonia en los músculos tibial anterior y el peroneo largo. Con la hipertonia de las fibras musculares se palpó la disminución del tono muscular, con una flacidez manifiesta en la musculatura glútea y en el muslo en su cara medial.

Se obtuvo muy buenos resultados aplicando frotaciones, amasamientos y vibraciones, logrando hacer desaparecer las bandas hipertónicas a partir de la tercera sesión de tratamiento en el 90% de los pacientes. La tabla 1 refleja los resultados de los pacientes tratados según las afecciones y con evaluación buena, el mayor número 94% corresponde a las Sacrolumbalgias y 93,3% a las ciatalgia.

Los pacientes con buenos resultados se incorporaron a sus actividades habituales y no mostraron recidivas durante 6 meses posteriores.

Tabla 1. Resultados del tratamiento según afecciones.

DIAGNÓSTICO	RESULTADOS						TOTAL
	B	%	R	%	M	%	
Sacrolumbalgia	*47	94	2	4	1	2	50
Ciatalgia	*84	93,4	3	3,3	3	3,3	90

\* P<0,005

Fuente: Resultados del estudio.

También se pudo observar cómo los pacientes que no presentaban hernia discal, así como los que habían sido intervenidos quirúrgicamente, lograron un mejor resultado en el tratamiento, mayor que el 90% (tabla 2).

Tabla 2. Resultados del tratamiento en los pacientes con lumbociatalgia.

PACIENTES	B		R		M		TOTAL
	No.	%	No.	%	No.	%	
Operados de hernia discal	*55	91,7	3	5	2	3,3	60
Con hernia discal	*20	80	3	12	2	8	25
Sin hernia discal	*53	96,4	1	1,8	1	1,8	55

\* P<0,005

Fuente: Resultados del estudio.

Con la aplicación del masaje se logró eliminar los signos de irritación local, desapareciendo los síntomas en todos los pacientes. En la quinta sesión de tratamiento el 100% de los pacientes con sacrolumbalgias mostraron una desaparición de hiperestesia e hiperalgesia, sin embargo, los de lumbociatalgia lograron resultados inferiores, 92,2%, solamente el 7,8% tuvo que emplear más de diez sesiones para lograr su restablecimiento.

Los pacientes que demoraron más tiempo en su recuperación fueron los que tenían un canal estrecho con fibrositis, (Tabla 3).

Tabla 3. Sesiones en que desaparece la hiperalgesia e hiperestesia.

DIAGNÓSTICO	SESIONES						TOTAL
	4 - 5		6 - 10		> 10		
	No.	%	No.	%	No.	%	
Sacrolumbalgias	50	100					50
Ciatalgia	83	92,2	5	5,6	2	2,2	90

Fuente: Resultados del estudio.

Uno de los aspectos de gran importancia en la evaluación de la eficacia del tratamiento, es el restablecimiento de las funciones de los músculos que intervienen en la estabilidad de la columna vertebral. Mediante el masaje se logró a partir de la décima sesión de tratamiento un restablecimiento de la función muscular en el 90% de los enfermos. En la tabla 4 puede observarse el comportamiento de estos resultados con respecto a los trastornos musculares y cinéticos.

Tabla 4. Sesiones en que desaparecen los trastornos musculares y cinéticos.

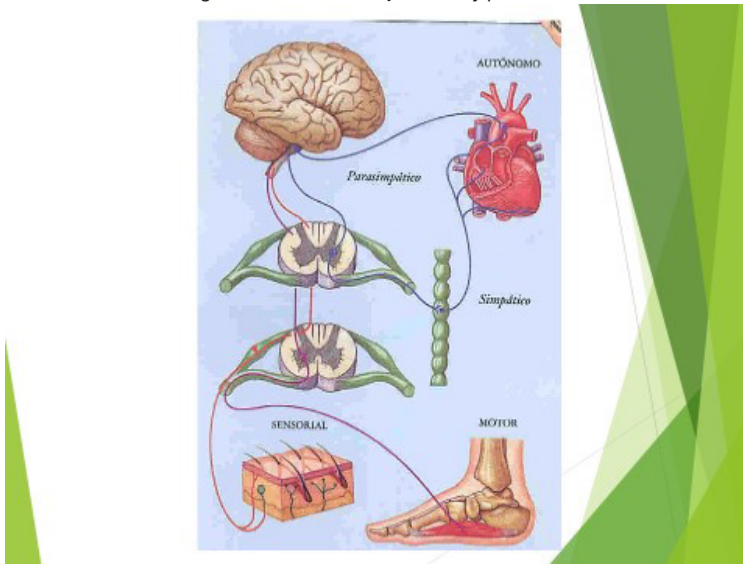
DIAGNÓSTICO	SESIONES						TOTAL
	4 - 5		6 - 10		> 10		
	No.	%	No.	%	No.	%	
Sacrolumbalgia	35	70	10	20	5	10	50
Ciatalgia	33	36,7	50	55,6	7	7,8	90

Fuente: Resultados del estudio.

Al aplicar el masaje sobre zonas y puntos dolorosos de la piel y el tejido celular subcutáneo, se estimulan exteroceptores y mecanorreceptores que descubren la deformación de los tejidos superficiales y los más profundos. Entre ellos se encuentran los discos de Merkel, corpúsculos de Pacini, de Meissner, de Ruffini y las terminaciones nerviosas libres. La estimulación prolongada de los receptores como los de Pacini, produce un fenómeno de acomodación que tiene lugar en la propia fibra nerviosa. Esto puede deberse a una redistribución de iones a través de la membrana de la fibra nerviosa (9), lo que fundamenta en parte la respuesta del paciente durante la manipulación de la piel, el tejido celular subcutáneo y los músculos por medio de fricciones frotaciones y amasamientos en forma lenta y de larga duración.

En la figura 2 se muestra la situación refleja central y periférica producida al estimular receptores cutáneos.

Figura 2. Situação refleja central e periférica.



La aplicación del masaje en los dermatomas correspondientes logró la desaparición de los espasmos musculares dolorosos en el 90% de los pacientes entre la cuarta y la sexta sesión de tratamiento, hecho que se fundamenta en el restablecimiento de la circulación sanguínea y linfática local, así como en el mejoramiento del metabolismo muscular. Las manipulaciones producen la estimulación de los angiorreceptores y los propioceptores provocando reflejos vasculomotores que favorecen el mejoramiento de la circulación sanguínea y linfática en los músculos contribuyendo al suministro de oxígeno y sustancias nutritivas a los tejidos (10).

Está probado que la acción del masaje de las zonas reflejas de la musculatura y del tejido conectivo, estimulando y equilibrando los centros de regulación situados en la médula espinal, el bulbo o el diencéfalo actúan sobre el órgano enfermo por vía refleja directa o indirectamente.

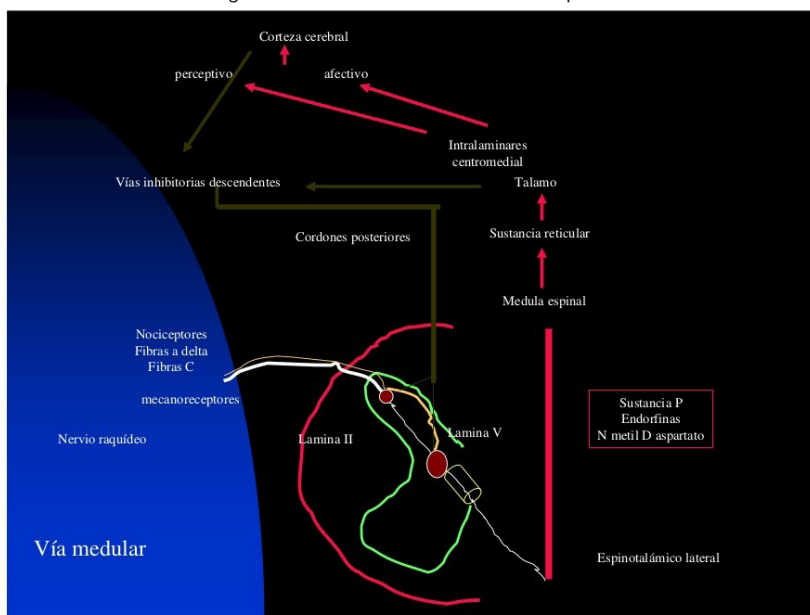
Otros autores (10,11) coinciden en que las fibras de dolor se excitan por tensión mecánica excesiva o daño mecánico a los tejidos, por el calor o el frío excesivo o por diversas sustancias químicas, pudiendo aumentar la sensibilidad de los receptores dolorosos (hiperalgesia). Las señales de dolor son transmitidas de la periferia a la médula espinal por fibras nerviosas deltas del tipo "A" (rápidas) mielinizadas y por fibras tipo "C" (lentas), que penetran en la médula espinal por las raíces dorsales y terminan en los cuernos dorsales en los núcleos de la sustancia gelatinosa de Rolando, láminas I a IV.

El descubrimiento de las encefalinas y la serotonina, que bajo la acción de estímulos de intensidad y frecuencia determinada son liberadas en el mesencéfalo, en los núcleos intratálámicos del tálamo y en los cuernos dorsales de la médula espinal, así

como las betas endorfinas y hormonas adrenocorticotrópicas liberadas en el hipotálamo, actúan como analgésicos inhibiendo la transmisión del dolor (2). Lo anterior fundamenta la acción analgésica del masaje de las zonas reflexógenas provocada por el reflejo cutáneo-visceral y musculo-visceral.

Un hecho destacable es que la estimulación de las fibras sensoriales grandes de los receptores táctiles periféricos disminuye la transmisión del dolor de la misma área del organismo o en áreas localizadas a distancias (12). Este efecto parece estar producido por un tipo de inhibición lateral local, lo que explica y fundamenta el hecho de que maniobras tan sencillas como las fricciones y frotaciones de la piel cerca de las áreas dolorosas o en las zonas reflexógenas del dermatoma correspondiente logre disminuir e incluso hacer desaparecer el dolor con una gran eficacia. No puede olvidarse que la respuesta ante estas manipulaciones se le da a nivel medular y encefálico. Las señales sensoriales somáticas mecanorreceptoras producidas por las manipulaciones del masaje estimulan los receptores, produciendo un impulso nervioso que penetra en la médula espinal por las raíces posteriores. La principal vía de transmisión debe ser por el dorsal lemniscal que contiene fibras nerviosas mielinizadas largas que transmiten señales muy rápidas al cerebro, entre 30 y 110 m/s además de tener una orientación espacial muy alta con respecto a su origen en la superficie del organismo, (Figura 3).

Figura 3. Sistemas de transmisión nociceptiva.



El tratamiento por medio del masaje de las zonas reflexógenas produjo en todos los pacientes una mejoría de su estado emocional, mejoraron su estado de ánimo. La

acción sedante del tratamiento se manifestó por el sueño que experimentaban los enfermos durante el tratamiento y horas después de haber concluido el mismo. Estas respuestas del organismo de los pacientes pueden fundamentarse por la estimulación que produce el masaje sobre los receptores cutáneos y terminaciones nerviosas en la médula espinal, el hipotálamo y la corteza cerebral, pudiéndose producir la secreción de sustancias neurotransmisoras, como la serotonina que actúa como inhibidor de las vías del dolor en la médula, induciendo el sueño y controlando el estado de ánimo en las personas. También el ácido gamma aminobutírico (GABA) que causa inhibición. Resultados parecidos encontró Diego (13), en adolescentes que presentaban agresividad y fueron tratados con masaje y relajación.

Preyde (4), realizó un ensayo clínico probando la efectividad del tratamiento a cuatro grupos de pacientes portadores de lumbalgias bajas, obteniendo buenos resultados con la aplicación de masaje, ejercicios terapéuticos y control postural. Furlan et al (14), muestran resultados de estudios en pacientes con dolor lumbosacro agudo y crónico, a los que se les aplicó masajes. Solo se incluyeron ensayos controlados aleatorios de adultos con dolor lumbar inespecífico clasificado como agudo, subagudo o crónico. El masaje se definió como la manipulación de tejidos blandos con las manos o un dispositivo mecánico. Los grupos de comparación se agruparon en dos tipos: controles inactivos (terapia simulada, lista de espera o ningún tratamiento) y controles activos (manipulación, movilización, TENS, acupuntura, tracción, relajación, fisioterapia, ejercicios o educación sobre el cuidado personal). Para el dolor lumbar agudo, se encontró que el masaje era mejor que los controles inactivos para el dolor ((DME -1,24; IC del 95%. Para el dolor lumbar subagudo y crónico, el masaje fue mejor que los controles inactivos para el dolor ((DME -0,75, IC del 95 %).

Los resultados alentadores que se lograron en esta investigación con el tratamiento, aplicando el masaje neuroreflejo, fue la disminución o desaparición de los infiltrados celulálgicos (hipertonía y miogelosis) en las regiones cervicotorácica, lumbosacra, la pelvis y en el muslo, lo que disminuyó la sintomatología en la cinética y estática del paciente, permitiendo la realización de las actividades físicas con una mayor eficiencia y permitiendo de esta manera el restablecimiento más rápido del enfermo.

#### 4 CONCLUSIONES

- La mayoría de los pacientes lograron la desaparición de la hiperalgesia e hiperestesia antes de la sexta sesión de tratamiento.
- La movilidad articular se restableció en el mayor porcentaje de pacientes después de la sexta sesión de tratamiento.



- El estado del tejido celular subcutáneo y el tejido conjuntivo mejoró a partir de la primera sesión. Se recomienda se utilice este esquema de tratamiento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Michelotti A, Steenks M H, Farella M. Short-term effects of physiotherapy versus counselling for the treatment of myofascial pain of the jaw muscles. Subject(s): physical therapy; myofascial pain syndromes Treatment Source: Journal of Oral Rehabilitation, 2002, 29 9, p874, 1pAuthor(s): Database: Biomedical Reference Collection: Expanded.
2. Kralj M. Puntos de vista de los fisioterapeutas sobre el masaje durante el embarazo: Završni rad [Documento final]. Rijeka: Universidad de Rijeka, Facultad de Estudios de la Salud en Rijeka; 2022 [consultado el 17.01.2023] Disponible en: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:686370>
3. Lund I, Yu L Ch, Uvnas M, Kerstin. Repeated massage-like stimulation induces long-term effects on nociception: contribution of oxytocinergic mechanisms. Subject(s): massage; sensory receptors; oxytocin; pain Source European Journal of Neuroscience, 2002; 16 (2): 9. Database: Biomedical Reference Collection: Expanded.
4. Preyde, Michele, CMAJ. Effectiveness of massage therapy for subacute low-back pain: a randomized controlled trial. Canadian Medical Association Journal, 2000; 162 (13). Database: Biomedical Reference Collection: Expanded.
5. Kurebayashi LF, Turrini RN, Souza TP, Takiguchi RS, Kuba G, Nagumo MT. Massage and Reiki used to reduce stress and anxiety: Randomized Clinical Trial. Rev Lat Am Enfermagem. 2016; 24:2834.
6. Pitsillides A, Stasinopoulos D. The Beliefs and Attitudes of Cypriot Physical Therapists Regarding the Use of Deep Friction Massage. Medicina [Internet]. 2019 Aug 12;55(8):472. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/medicina55080472>
7. Diego M, Field T. Hive adolescents show improved immune function following massage therapy. International Journal of Neuroscience, 2001; 106. Database: Biomedical Reference Collection: Expanded.
8. Kohlrausch, W. Masaje muscular de las zonas reflejas. En su: Masaje muscular de las zonas reflejas. Barcelona, Toray- Masson. 1968.
9. Guyton A. Receptores sensoriales y circuitos neuronales. Tratado de Fisiología Médica. Nueva York: Interamericana. 2012; 516.
10. Starke, K. et al. Modulation of neurotransmitter release by presynaptic auto. Physiol Rev. 1989; 69: 864 869.
11. Guyton A. Sensaciones somáticas: II Dolor, cefalea y temperatura. Tratado de Fisiología Médica Nueva York: Interamericana. 2012; 547.
12. Bousfield, D. Neurotransmitters in action. New York, Elsevier Science publishing. 1985.
13. Diego M, Tiffany H R. Aggressive adolescents benefit from massage therapy. Adolescence. 2002; 37 (47) Database: Biomedical Reference Collection: Expanded
14. Furlan AD, Giraldo M, Baskwill A, Irvin E, Imamura M. Massage for low-back pain. Cochrane Database of Systematic Reviews 2015, Issue 9. Art. No.: CD001929. DOI: 10.1002/14651858.CD001929.pub3.

# CAPÍTULO 5

## PROGRAMAS DE REABILITAÇÃO MOTORA NA PESSOA COM DOENÇA DE HUNTINGTON: REVISÃO SISTEMÁTICA DE EFICÁCIA

Data de submissão: 23/12/2022

Data de aceite: 10/01/2023

### Susana Marisa Loureiro Pais Batista

Escola Superior de Saúde do  
Instituto Politécnico de Viseu  
Viseu, Portugal

<https://orcid.org/0000-0003-0256-6027>

### Hugo Rafael Moita dos Santos

Escola Superior de Saúde do  
Instituto Politécnico de Viseu  
Viseu, Portugal

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

<https://orcid.org/0000-0001-6743-9673>

### Rosa Maria Lopes Martins

Escola Superior de Saúde do  
Instituto Politécnico de Viseu  
Viseu, Portugal

<https://orcid.org/0000-0001-9850-9822>

### Carlos Manuel Sousa Albuquerque

Escola Superior de Saúde do  
Instituto Politécnico de Viseu  
Viseu, Portugal

<https://orcid.org/0000-0002-2297-0636>

### Alexandra Isabel Marques da Costa Dinis

Escola Superior de Saúde do  
Instituto Politécnico de Viseu  
Viseu, Portugal

<https://orcid.org/0000-0002-4102-5322>

**RESUMO:** *Introdução:* A Doença de Huntington (DH) é uma doença genética neurodegenerativa, caracterizada por movimentos “coreicos” incontroláveis, défices cognitivos e problemas emocionais. O exercício físico está indicado para a reabilitação destas pessoas, contudo o seu benefício não é claramente evidente. Pretende-se com o presente estudo, identificar a evidência científica mais relevante sobre a eficácia de programas de reabilitação motora na pessoa com DH. *Metodologia:* realizou-se uma revisão sistemática de eficácia sem metanálise, com recurso aos motores de busca: *EBSCOhost-Research Databases, PubMed, Cochrane Central Register for Controlled Trials* e *PEDro*. A pesquisa decorreu entre maio e julho de 2019, tendo como limitadores o filtro cronológico de 2015.01.01 a 2019.12.31. A extração de dados foi efetuada por dois revisores, tendo por base uma ferramenta construída para o efeito, respeitando os princípios propostos pelo Manual do Revisor da *Joanna Briggs Institute*. *Resultados:* foram identificados 615 artigos no total da pesquisa, contudo incluídos foram apenas 5 estudos primários (3 ensaios clínicos randomizados e 2 estudos quase experimentais). Estes sugerem benefícios estatisticamente e clinicamente significativos na reabilitação motora na DH, com impacto significativo no desempenho motor, força muscular, equilíbrio corporal, destreza manual, autonomia, autoeficácia, resistência cardiorrespiratória, função cognitiva, fluência verbal e maior bem-estar. Contudo estes ganhos não foram transversais, verificando-

se alguma disparidade de resultados. *Conclusão:* um programa de reabilitação motora estruturado e sistematizado, poderá gerar ganhos na função motora e consequentemente na qualidade de vida da pessoa com DH.

**PALAVRAS-CHAVE:** Doença de Huntington. Reabilitação. Enfermagem em Reabilitação. Exercício Terapêutico.

## MOTOR REHABILITATION PROGRAMS IN PEOPLE WITH HUNTINGTON'S DISEASE: SYSTEMATIC REVIEW OF EFFECTIVENESS

**ABSTRACT:** *Introduction:* Huntington's disease (HD) is a neuro-degenerative genetic disease, characterized by uncontrollable "choreic" movements, cognitive deficits, and emotional problems. Physical exercise is indicated for the rehabilitation of these people; however, its benefit is not clear. The aim of the present study is to identify the most relevant scientific evidence on the effectiveness of motor rehabilitation programs in people with HD. *Methodology:* A systematic review of effectiveness was carried out without meta-analysis, using search engines: EBSCOhost-Research Databases, PubMed, Cochrane Central Register for Controlled Trials and PEDro. The research took place between May and July 2019, with the chronological filter from 2015.01.01 to 2019.12.31 as limiting factors. Data extraction was performed by two reviewers, based on a tool built for the purpose, respecting the principles proposed by the Joanna Briggs Institute Reviewer's Manual. *Results:* 615 articles were identified in the total of the research, however included were only 5 primary studies (3 randomized clinical trials and 2 quasi-experimental studies). These suggest statistically and clinically significant benefits in motor rehabilitation in HD, with significant impact on motor performance, muscle strength, body balance, manual dexterity, autonomy, self-efficacy, cardiorespiratory resistance, cognitive function, verbal fluency, and greater well-being. However, these gains were not transversal. *Conclusion:* A structured and systematic motor rehabilitation program can generate gains in motor function and, consequently, in the quality of life of people with HD.

**KEYWORDS:** Huntington Disease. Rehabilitation. Rehabilitation Nursing. Exercise Therapy.

### 1 INTRODUÇÃO

A reabilitação é um campo de tratamento preventivo, curativo e de capacitação, no qual o Enfermeiro Especialista em Enfermagem de Reabilitação desempenha um papel fundamental. A Doença de *Huntington* (DH) despertou em nós interesse pela problemática, pela sua especificidade, pela pertinência e novidade uma vez que se trata de um tema que tem sido pouco abordado, sobretudo quando recorremos a publicações e bibliografia portuguesa, e com grande interesse para a área de especialização em Enfermagem de Reabilitação. De facto, compete à Enfermagem de Reabilitação intervir no doente, família, conviventes significativos e comunidade, através de um conjunto de intervenções específicas, que passam por: contribuir para um diagnóstico precoce, manutenção de capacidades funcionais, prevenção de complicações, evitar incapacidades, melhorar funções residuais, manter ou recuperar a independência nas atividades de vida e minimizar o impacto das incapacidades instaladas (1).

A DH é uma doença neuro-degenerativa, hereditária, causada por uma mutação genética que afeta áreas concretas do cérebro, nomeadamente os núcleos da base, que são responsáveis sobretudo pela coordenação motora voluntária. Esta degeneração provoca movimentos incontrolláveis, perda das faculdades intelectuais e problemas emocionais, dependendo da idade de início da doença e da gravidade do defeito genético (2). A participação em programas de reabilitação, numa fase precoce e intermédia da doença é defendida por alguns autores, contudo o exercício físico nem sempre demonstrou efeitos positivos na DH (3).

A prevalência da doença em Portugal não está devidamente determinada, porém estima-se que seja semelhante à dos restantes países europeus, em que cinco a sete pessoas por cada 100.000 são portadoras de DH. Sabe-se ainda, que as crianças que desenvolvem a forma juvenil da doença raramente vivem até à idade adulta, existindo uma probabilidade de 50% de herdar o gene fatal dos pais, (4) Trata-se de uma doença considerada rara, contudo tem efeitos devastadores nas famílias, pois para além de ser uma doença atualmente incurável, incapacitante e com quadros sintomatológicos graves pode afetar vários elementos da mesma família (5).

Nos últimos anos a DH tem despertado o interesse da comunidade científica mundial, verificado pelo número de estudos nas bases de dados científicas, porém em Portugal tem sido subvalorizada. Neste contexto, torna-se premente a necessidade de síntese do conhecimento já existente acerca da temática em estudo, para que possamos dar-lhe continuidade e trazer novos aportes nas intervenções futuras da Enfermagem de Reabilitação.

Conscientes da problemática que envolve a DH e o interesse por nós sentido como estudantes de Especialização em Enfermagem de Reabilitação, surge a questão de investigação: qual será a eficácia dos programas de reabilitação motora na pessoa com Doença de *Huntington*?

Pretendemos com a presente Revisão Sistemática da Literatura, avaliar a eficácia dos programas de reabilitação motora na pessoa com doença de Huntington e deste modo contribuir para a prática baseada na evidência.

## 2 METODOLOGIA

O protocolo de pesquisa que se segue, é baseado nas orientações do capítulo três do Manual do Revisor da *Joanna Briggs Institute* (6). Atendendo à questão de investigação e ao respetivo objetivo, a presente revisão é uma “Revisão Sistemática de Eficácia”, sem metanálise. Esta, visa identificar a evidência científica sobre a eficácia de programas de reabilitação motora na pessoa com doença de Huntington e ser um contributo para a clarificação e boas práticas dos Cuidados Especializados em Enfermagem de Reabilitação.

Após a definição do objetivo e questão de investigação, utilizou-se o método PI[C] O (cf.Tabela 1) para a seleção dos estudos primários a incluir na presente RSL: *participants*-participantes [P]; *interventions* - intervenções [I]; *comparators* – comparações [C], caso existam; *outcomes* – resultados [O].

Tabela 1. Aplicação do Método PICO.

<b>P Participantes</b>	Quem foi estudado?	Pessoa com doença de Huntington	Palavras-chave: # Huntington disease # Rehabilitation # Exercise therapy # Nursing
<b>I Intervenções</b>	O que foi feito?	Programas de reabilitação motora	
<b>C Comparações</b>	Sim/ não	Caso/ Controlo	
<b>O Outcomes</b>	Resultados/ efeitos ou consequências	Eficácia/ Atraso na progressão da doença/ promoção do autocuidado/ qualidade vida	

Para que sejam incluídos na revisão sistemática, apenas estudos que abordem a problemática acima apresentada, foram definidos os critérios de seleção ou de elegibilidade constantes na tabela 2. Para identificar os estudos mais relevantes para a presente revisão, isolaram-se os conceitos referentes aos participantes e à intervenção em estudo, de modo a definir os descritores *MeSH* (*Medical Subject Headings*) mais adequados para a investigação. De seguida, procedeu-se à seleção das plataformas de pesquisas eletrónicas: *EBSCOhost*, *PubMed*, *Cochrane Central Register for Controlled Trials*. Incluiu-se ainda a base de dados em Evidências em Fisioterapia *PEDro*.

Tabela 2. Critérios de Elegibilidade.

<b>Critérios de Seleção</b>	<b>Critérios de Inclusão</b>	<b>Critérios de Exclusão</b>
DESENHO DOS ESTUDOS	Ensaios Clínicos Randomizados e Controlados; Estudos Quase Experimentais	Estudos qualitativos Estudos secundários Estudos não publicados
Tipo de PARTICIPANTES (fatores demográficos, localização)	Pessoas com doença de Huntington geneticamente diagnosticada	Patologia psiquiátrica diagnosticada Declínio cognitivo Sintomas neuropsiquiátricos
Tipo de INTERVENÇÃO (experimental/ controlo, variação intervenções)	Intervenções de reabilitação motora	Estimulação multissensorial, Musicoterapia, yoga
Tipo de OUTCOMES	Equilíbrio Estabilidade postural Qualidade de vida Atividade Física Destreza manual Força muscular Capacidade Funcional UHDRS – Unified Huntington Disease Rating Scale (motor section)	Agressão Mecanismos moleculares Ideação suicida Transtornos de linguagem

Foi efetuada uma **pesquisa 1** nas bases de dados referenciais da EBSCOhost – Research Databases: CINAHL® Plus with Full Text, Nursing & Allied Health Collection, Cochrane Plus Collection, MedicLatina, MEDLINE® with Full Text. A fórmula de pesquisa (Booleano/ Frase) utilizada para o presente motor de busca foi: huntington disease AND (exercise therapy OR rehabilitation). Foram identificados quarenta (40) estudos no total: MEDLINE Complete (35), CINAHL Complete (4), Nursing & Allied Health Collection: Comprehensive (1).

A **pesquisa 2** foi realizada na PubMed de acordo com os detalhes de pesquisa que se seguem: (“huntington disease”[MeSH Terms] OR (“huntington”[All Fields] AND “disease”[All Fields]) OR “huntington disease”[All Fields]) AND (“rehabilitation”[Subheading] OR “rehabilitation”[All Fields] OR “rehabilitation”[MeSH Terms]) AND (“loattrfull text”[sb] AND (“2015/01/01”[PDAT]: “2019/12/31”[PDAT])). Foram deste modo identificados 104 estudos.

A **pesquisa 3** foi realizada a *Cochrane Central Register for Controlled Trials*, tendo revelado 469 estudos correspondentes aos termos de pesquisa: (“huntington disease”) AND (“rehabilitation”) OR (“exercise based”).

A **pesquisa 4** foi realizada na base de dados *PEDro*, com os termos de pesquisa: (“huntington”) AND (“rehabilitation”), tendo sido identificados 3 estudos.

A pesquisa nas bases de dados supracitadas decorreu entre o mês de Maio e Julho de 2019, tendo como limitadores o filtro cronológico (2015.01.01 a 2019.12.31).

Do resultado das quatro pesquisas enunciadas anteriormente, resultaram 615 artigos, que foram analisados, num primeiro momento, por dois revisores independentes. Esta primeira análise teve por base a seleção dos artigos pela sua relevância para a presente RSL (desenho do estudo, participantes, intervenções e resultados), através da leitura dos títulos e resumos.

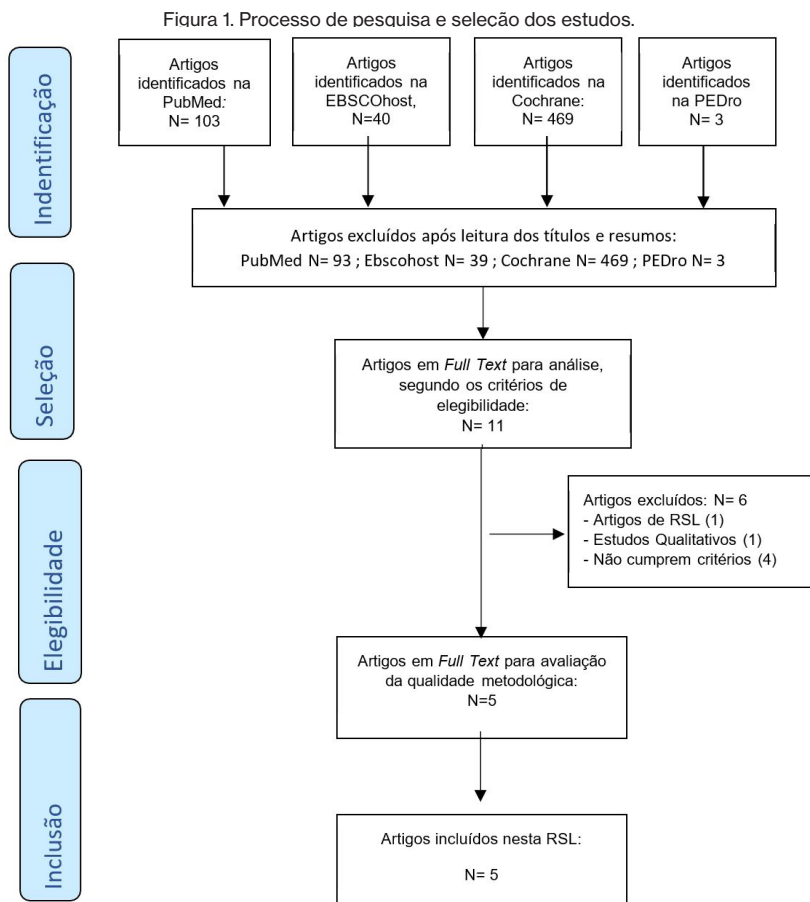
Após a seleção dos estudos por parte de cada revisor, resultou por consenso, a exclusão de 604 artigos por não se relacionarem com a questão de investigação ou por se encontrarem repetidos. Assim, foram identificados 11 artigos com potencial interesse para análise integral do texto.

Num segundo momento, os revisores procederam à leitura e análise dos 11 artigos selecionados, à luz dos critérios de elegibilidade definidos. Resultou assim, a exclusão de 6 estudos: artigo de Revisão da Literatura (1); estudo qualitativo (1), excluídos por não cumprirem critérios (4). Deste modo, chegámos a um resultado de 5 estudos com critérios para avaliação metodológica e posterior inclusão na presente RSL.

A qualidade metodológica dos estudos foi avaliada de acordo com os as ferramentas de avaliação crítica da JBI: “Lista de verificação para estudos quase experimentais (estudos experimentais não randomizados)” e “Lista de verificação para ensaios clínicos randomizados” (7).

### 3 RESULTADOS

O fluxograma representado na Figura 1, apresenta o processo de seleção dos estudos, representado no fluxograma PRISMA (8).



Fonte: Adaptado do diagrama de fluxo PRISMA (8).

A extração de dados foi efetuada por 2 revisores, tendo por base uma ferramenta construída para o efeito, para minimizar o risco de erro. Os resultados obtidos dos estudos selecionados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Resumo dos dados extraídos dos estudos selecionados (adaptado da JBI).

Ano/Título/ Autor/ País	Objetivos	Desenho do estudo	Número e Tipo Participantes	Duração estudo	Intervenções	Resultados	Conclusões
(E1) 2018 Effects of multidisciplinary therapy on physical function in Huntington's disease. Cruikshank, T. M., Reyes, A. P., Penailillo, L. E., Pulverenti, T., Bartlett, D. M., Zaenker, P., ... Ziman, M. R. Austrália (9)	Avaliar os efeitos da terapia multidisciplinar em ambulatório, (comparada com o terapia convencional), na função motora e força muscular em pessoas com doença de Huntington (DH) manifestada.	- Estudo Randomizado Controlado  - Avaliadores cegos  - As avaliações foram realizadas no início e na 36ª semana.  - Telefonemas de acompanhamento foram feitos na 26ª semana para avaliar o estado de saúde e a atividade física.	- Fisiologista do exercício, fisioterapeutas e terapeutas ocupacionais.  Recrutamento de doentes da área Metropolitana Norte do Serviço de Saúde Mental, através de anúncios de jornal.  Amostra randomizada com rácio de 1:1. - 10 Incluídos na terapia multidisciplinar (caso) - 10 Incluídos na terapia convencional (controlo)  Critérios de inclusão: - Teste genético positivo para mutação HD, diagnóstico clínico de manifestação da doença (UHDRS-TMS >=5), capacidade para seguir instruções verbais e escritas, a capacidade de realizar exercício submáximo e exercícios cognitivos.  Critérios de exclusão: - Envolvimento em outro estudo terapêutico, abuso de substâncias, condições neurológicas, musculoesqueléticas e cardiovasculares confusas.	36 Semanas	<b>Terapia multidisciplinar</b> (programa de reabilitação motora e cognitiva) <u>Programa de exercícios supervisionados</u> Frequência: -1 vez por semana, durante uma hora Local: Exercícios em ginásio na comunidade: - Aeróbicos em bicicleta ergométrica - Resistentes em máquinas de resistência <u>Programa de exercícios em casa autocontrolados</u> (com manual de exercícios, bandas elásticas de resistência e um diário de treino) Frequência: - 3 vezes por semana durante uma hora Exercícios: - Fortalecimento, caminhada, equilíbrio e motricidade fina. <u>Programa de reabilitação cognitiva</u> (terapeutas ocupacionais): Frequência: - Sessões quinzenais Exercícios - Papel e lápis - Exercícios cognitivos verbais, - Jogos de tabuleiro, - Atividades da vida diária: culinária, planeamento e organização.  <b>Terapia convencional</b> Cuidados médicos padrão	Após 36 semanas de terapia multidisciplinar, os participantes incluídos no programa de terapia multidisciplinar demonstraram acentuada melhoria da destreza manual (P <0,05) e força muscular dos membros inferiores (P <0,05) em relação aos doentes que receberam cuidados habituais.  Uma análise <i>post hoc</i> revelou que o grupo de cuidados habituais teve deterioração significativa no NBT (P = 0,008), enquanto o grupo de treino não apresentou alterações (P= 0,174). Uma análise <i>post hoc</i> revelou melhoria significativa nos resultados de força dos membros inferiores apenas no grupo de treino (extensão do joelho 30°, P<0,001; extensão isométrica do joelho, P <0,001; flexão do joelho isométrica, P = 0,006), sem alterações significativas observadas no grupo de cuidados habituais.  Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na mobilidade, equilíbrio, resistência cardiorrespiratória e força dos membros superiores entre os grupos após o período de intervenção.  Não houve eventos adversos associados à terapia multidisciplinar	A terapia multidisciplinar tem efeitos positivos sobre a destreza manual e a força muscular, mas não apresenta efeitos significativos sobre a mobilidade, o equilíbrio, a resistência cardiorrespiratória e a força muscular dos membros superiores em pacientes com HD.  Maiores ensaios clínicos randomizados são necessários para confirmar os achados.
<b>Avaliação da eficácia do programa de reabilitação</b>	Avaliações na semana 0 e 36. Avaliada manifestação motora da doença de Huntington - Unified Huntington's Disease Rating Scale - Total Motor Score (UHDRS-TMS), avaliadas alterações da mobilidade - 10-m Timed Walk (10 MWT); endurance cardiorrespiratória- 6 Minute Walk Test, equilíbrio corporal - Berg Balance Scale (BBS), destreza manual - Timed Nut and Bolt Test (NBT), força muscular dos membros superiores e inferiores - Lafayette instrument (dinamómetro de mão), Biodex medical System (dinamómetro isocinético do membro inferior), Sit-To-Stand Repetition Test						



Ano/Título/Autor/ País	Objetivos	Desenho do estudo	Número e Tipo Participantes	Duração estudo	Intervenções	Resultados	Conclusões
(E2) 2017 Exercise effects in Huntington disease. Frese, S., Petersen, J. A., Ligon-Auer, M., Mueller, S. M., Mihaylova, V., Gehrig, S. M., ... Jung, H. H. Suíça (10)	Investigar se o treino de endurance (TE) estabiliza a progressão da disfunção motora e cognitiva e melhora a função cardiovascular em pacientes em HD.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudo Quase – Experimental com grupo controle.</li> <li>- Antes e após a intervenção de treino, foram realizadas avaliações clínicas, testes fisiológicos físico e dosagem da composição corporal (biópsia muscular de M. vastus lateralis).</li> <li>- Para examinar o decurso natural da doença, os doentes com HD foram avaliados 6 meses antes do TE.</li> </ul>	<p>Amostra:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 13 Participantes masculinos com HD (média ± DP, 54,8 ± 7,1 anos)</li> <li>- 15 Controlos masculinos (49,1 ± 6,8 anos)</li> </ul> <p>Critérios de Inclusão (casos):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sexo masculino,</li> <li>- Níveis séricos de fosfocreatina quinase (CK) abaixo de 300 U / l;</li> <li>- Habilidades motoras e cognitivas que permitam dar consentimento informado por escrito e realizar TE.</li> </ul> <p>Critérios de exclusão (casos):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Contraindicações de TE (problemas cardiovasculares, metabólicos ou ortopédicos).</li> </ul> <p>Os dados demográficos, histórico médico, comorbilidades, medicação atual e mutação genética da DH (análise de repetição CAG, tamanho dos alelos, laboratório que realizou a análise, data) foram avaliados durante a fase de triagem.</p>	6 meses	<p><b>Programa Treino de Endurance (casos e controlos)</b></p> <p>Frequência:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Três períodos de treino de 10 semanas, intercalados com uma semana de regeneração</li> <li>- Três vezes por semana.</li> </ul> <p>Exercícios:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1<sup>as</sup> 10 semanas: 30 min de bicicleta de intensidade constante a uma potência de bicicleta correspondente a 65% de VO2pico</li> <li>- 2<sup>as</sup> 10 semanas (após a 1ª semana de regeneração): treinos intervalados de alta intensidade (por exemplo, 4 9 4 min de bicicleta com uma potência de 90-95% do pico da frequência cardíaca) durante um total de 8 semanas.</li> <li>- Últimas 6 semanas de treino de resistência: duas sessões intervaladas e um treino de carga constante por semana</li> <li>- Durante as semanas de regeneração, os participantes realizaram dois treinos de carga constante a 50% -VO2pico por 30 min.</li> <li>- Para manter a estimulação de treino suficiente, a potência foi aumentado com base no nível individual dos participantes, conforme monitorização da percepção de esforço (escala CR10)</li> </ul>	<p>Adesão de 92% ao programa de intervenção e 80% ao grupo de controlo. Nenhum efeito adverso da intervenção de treino foi relatado.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Durante o período de avaliação do decurso natural da doença, o UHDRS- TMS aumentou consideravelmente.</li> <li>- Durante o período de TE, houve estabilização do défice motor segundo a UHDRS-TMS (basal: 18,6 ± 9,2, pré- treino: 26,0 ± 13,7; pós-treino: 26,8 ±16,4).</li> </ul> <p>O pico de consumo de oxigénio (VO2pico) aumentou significativamente nos doentes com HD (D_VO2pico = 0,33 ± 0,28 l) tal como nos controlos (D_VO2pico = 0,29 ± 0,41 l).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- O grupo caso HD teve pior desempenho que o controlo em todos os testes neuropsicológicos: escala de avaliação de demência de Mattis (DRS- 2), a pontuação subescala de iniciação/ perseveração da DRS-2, o teste de fluência verbal e de categoria, o teste de aprendizagem verbal de Hopkins, os testes de Stroop, o trail making test part A and B, e o S- DMT.</li> </ul> <p>Análise histológica de secções transversais de fibras musculares do vasto lateral não mostraram alterações patológicas claras.</p>	<p>O TE melhorou a função cardiovascular e a capacidade de resistência dos doentes com HD, embora sem diferenças significativas com o grupo controle.</p> <p>Doentes com HD atingiram valores pós-treino VO2peak e pico de potência de bicicleta aproximando-se dos valores de pré-treino dos controlos.</p> <p>Os resultados indicam que pacientes com HD submetidos a plano de treino de endurance são capazes de aumentar sua aptidão cardiovascular para o nível dos controlos da mesma idade e também podem beneficiar com melhor qualidade de vida.</p> <p>O presente estudo é limitado pelo reduzido número de participantes; no entanto, os resultados justificam uma investigação mais aprofundada dos efeitos do exercício em pessoas com HD. Ensaios multicêntricos e maiores podem ajudar a identificar doentes que poderão beneficiar de TE.</p>
<b>Avaliação da eficácia do programa de reabilitação</b>	A gravidade dos sinais motores dos doentes com HD foi quantificada através da secção motora da Unified Huntington Disease Rating Scale (UHDRS-TMS). Os testes neuropsicológicos foram realizados numa sequência fixa e incluíram: o teste de fluência verbal - Hopkins Verbal Learning Test-Revised (HVLTR; [2]) e a escala de demência (DRS-2). Avaliado o Symbol- Digit Modalities Test (S-DMT), o Stroop color naming, leitura de palavras e testes de interferência, o trail making test part A and B e a category-fluency task. Avaliado o VO2peak e o peak cycling power.						

Ano/Título/Autor/ País	Objetivos	Desenho estudo	Número e Tipo Participantes	Duração estudo	Intervenções	Resultados	Conclusões
<b>(E3)</b> 2017 Physical Activity Self-Management and Coaching Compared to Social Interaction in Huntington Disease: Results From the ENGAGE-HD Randomized, Controlled Pilot Feasibility Trial. Busse, M., Quinn, L., Drew, C., Kelson, M., Trubey, R., Mcewan, K., ... Hood, K. Reino Unido (11)	Desenvolver e avaliar a viabilidade de uma intervenção de <i>coaching</i> de atividade física em comparação com o contacto social na doença de Huntington (HD).	- Estudo Randomizado Controlado - Avaliadores cegos	- 8 Clínicas especializadas em HD com intervenção no domicílio.  - 8 Treinadores (fisioterapeutas, terapeutas ocupacionais, enfermeiros)  - 46 Adultos com HD confirmada geneticamente, com dificuldade na marcha ou equilíbrio (capacidade de marcha com mínima assistência), idade > 18 anos, estabilização medicamentosa de 4 semanas mínimo.  - Excluídos pela condição física e psíquica impeditivas de colaborar, incapacidade de falar a língua Inglesa, envolvimento noutros estudos há menos de 4 semanas.  - Selecionados aleatoriamente 22 casos para intervenção física e 24 controlos para intervenção social.	14 Semanas	<b>Intervenção de <i>coaching</i> de atividade física ENGAGE-HD</b> <u>Frequência</u> - 6 Visitas domiciliárias durante 14 semanas (semanas 1, 2, 3, 6, 10 e 14) e 3 chamadas telefónicas intermediárias (semanas 4, 8 e 12) para incentivar a adesão à atividade física regular. <u>Metas</u> - Os participantes (com seus treinadores) desenvolveram até três metas realistas de atividade física e foram auxiliados com a progressão da atividade física individual por meio da discussão das mesmas. - O atingimento do objetivo foi avaliado pelo técnico na última visita domiciliária. <u>Monitorização exercício físico no domicílio</u> - Fornecidos, para registar a quantidade e o tipo de envolvimento na atividade física (caminhada ou uso de DVD e pedómetro): - Diários de exercícios - Pedómetros <u>Monitorização de eventos adversos:</u> - Diários de saúde e quedas facilitaram a documentação de quedas, mudanças de medicação ou contacto com serviços de saúde.  <b>Intervenção de contacto social</b> <u>Frequência:</u> - Visitas domiciliárias nas semanas 1, 2, 3, 6, 10 e 14, e telefonemas de apoio nas semanas 4, 8 e 12. Numa visita, o <i>coach</i> de atividade social integrou o participante numa interação de fala e comunicação. Placas de conversação (com imagens e texto) representando uma ampla gama de tópicos estimularam as discussões. Os diários de saúde e quedas foram completos, mas não foi pedido mantivessem registo de exercícios.	77% (19) Terminaram programa intervenção física: - Foram atingidos 50 objetivos no total: 19 rel/c caminhada, 21 rel/c exercício estruturado, 6 rel/c aumento da atividade física, 2 rel/c redução do tempo sentado, 2 rel/c desportos e atividades recreativas. - Dos 19 participantes, 3 não atingiram a totalidade dos objetivos. - Relato 14 quedas durante o período do programa. - Melhoria do score do PPT, IPAQ, Loring Scale, 6-minute walk, ICECAP, SDMT e CVF. - Agravamento TUG  92% Terminaram programa de intervenção social: - Relato de 24 quedas durante o período do programa. - Melhoria do score do EQ-5D, UHDRS - Agravamento do Loring Scale score 6-min walk, SMDT, CVF	Os resultados sugerem que uma intervenção de treino em atividade física é viável e pode melhorar a autoeficácia, o comportamento de atividade física e a cognição em pessoas com HD.
<b>Avaliação da eficácia do programa de reabilitação</b>	Avaliadas escalas no início do programa, na 16ª semana e 26ª semana: Physical Performance Test (PPT), International Physical Activity Questionnaire (IPAQ), Life Space (LS), Loring Self Efficacy Scale, Self-reported Falls, Unified Huntington's Disease Rating Scale (UHDRS) modified motor assessment, 6-minute walk test, Timed Up and Go Test (TUG), EQ-5D, ICECAP-A, Symbol Digit Modality Test (SDMT), verbal category fluency (VCF).						

Ano/Título/Autor/ País	Objetivos	Desenho do estudo	Número e Tipo Participantes	Duração estudo	Intervenções	Resultados	Conclusões
<p><b>(E4)</b> 2016 A randomized, controlled trial of a multi-modal exercise intervention in Huntington's disease. Quinn, L., Hamana, K., Kelson, M., Dawes, H., Collett, J., Townson, J., ... Busse, M. Cardiff, Reino Unido; Birmingham, Reino Unido; Oxford, Reino Unido; Leiden, Holanda; Münster, Alemanha; e Oslo, Noruega. (12)</p>	<p>Avaliar a viabilidade e benefício de uma intervenção de exercício estruturado em pessoas com Doença de Huntington (HD)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudo Randomizado (rácio de 1:1) e controlado</li> <li>- Avaliadores cegos</li> <li>- As avaliações foram realizadas no início e na 13ª semana.</li> <li>- Telefonemas de acompanhamento foram feitos na 26ª semana para avaliar o estado de saúde e a atividade física.</li> </ul>	<p>O ensaio foi realizado em seis clínicas especializadas em HD com Registo (13/ WA/ 0192) ENROLL-HD.</p> <p>O ENROLL-HD é um estudo observacional mundial das famílias com doença de Huntington, e fornece uma plataforma para estudos clínicos para facilitar o recrutamento em ensaios clínicos.</p> <p>Amostra: 17 Participantes em grupo de intervenção 15 Participantes em grupo de controlo.</p> <p>Crítérios de Inclusão: - Diagnóstico de HD geneticamente confirmado; ter mais de 18 anos; regime medicamentoso estável (+ de 4 semanas).</p> <p>Crítérios de exclusão: - Condição física ou psiquiátrica que impeçam de completar o programa ou a bateria de escalas; incapacidade para uso independente de bicicleta; incapacidade de compreender e falar língua inglesa (UK); envolvimento em outro estudo terapêutico (há menos de 4 semanas).</p>	13 Semanas	<p><b>Intervenção de exercício estruturado</b> (programa de reabilitação motora) <i>Local:</i> - Ginásio hospitalar - Domicílio com equipamentos fornecidos pela equipa de pesquisa. <i>Frequência:</i> - 3 vezes por semana, durante 50 minutos <i>Exercícios:</i> - Programa estruturado de exercícios aeróbicos (5' a 25' de bicicleta), de fortalecimento (15' a 20') e alongamento (5'). - Intensidade do aquecimento de 50 a 60% da FC máx prevista - Intensidade treino aeróbico de 65 a 85% FCAPA.</p> <p><b>Terapia convencional</b> Cuidados médicos padrão</p>	<p>Adesão de 82,4% do grupo intervenção e 86,7% do grupo controlo. Houve dois eventos adversos no grupo de intervenção, ambos relacionados a condições médicas prévias, e dois eventos adversos graves no grupo controlo.</p> <p>O grupo de intervenção de exercício estruturado demonstrou: - Melhor capacidade aeróbica: diferença prevista de VO2 máx (<math>p=0.002</math>): 492,3 (ml. min<sup>-1</sup>), IC 95% [97,1%, 887,6]; - Menor UHDSRS-mMS (<math>p=0.003</math>) (diferença 2,9 pontos, 95% [5,42, 0,32]) - Menor peso na semana 13 (<math>p=0.047</math>) (diferença 2,25 kg, 95% IC: [-4,47, - 0,03]).</p>	<p>Este estudo demonstra que uma intervenção de exercício a curto prazo é segura e viável.</p> <p>Os indivíduos com HD podem beneficiar de exercícios estruturados, sendo a intensidade, a monitorização e o apoio importantes fatores para a otimização da resposta.</p> <p>São necessários estudos com maior amostra para elucidar completamente o potencial clínico do exercício da HD</p>
<p><b>Avaliação da eficácia do programa de reabilitação</b></p>	<p>Avaliações na semana 0 e 13. Avaliada manifestação cognitiva da doença de Huntington: UHDRS – Symbol Digit Modality Test Cognitive assessment (UHRS – SDMT); avaliada capacidade aeróbica através da avaliação do Volume de Oxigénio (VO2); avaliada função motora: UDDRS-mMS (modified Motor Scale); 15 rep chair stand time, Three minute walk, Finger Tapping score; avaliada atividade física - IPAQ MET- Minutes; capacidade de dupla tarefa - Simple dual task walk time, Complex dual task walk time; avaliação cognitiva - Symbol Digit Modalities Test, Category Verbal Fluency, Stroop colour naming, Word Reading, Trailmaking; avaliação depressão - Hospital Anxiety and Depression scale; saúde em geral - EQ-5D-3L; peso em Kg.</p>						

Ano/Título/Autor/ País	Objetivos	Desenho do estudo	Número e Tipo Participantes	Duração estudo	Intervenções	Resultados	Conclusões
(E5) 2015 Influence of intensive multifunctional neurorehabilitation on neuronal oxidative damage in patients with Huntington's disease. Ciancarelli, I., De Amicis, D., Di Massimo, G., Sandrini, C., Pistarini, C., Carolei, A., & Tozzi Ciancarelli, M. G. Itália (13)	Investigar os efeitos potenciais de um programa multifuncional de neuro-reabilitação intensivo nos níveis séricos de Cu/ Zn-superóxido dismutase (Cu / Zn- SOD), enolase neurónio-específica (NSE) e 8- hidroxí-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) como marcadores periféricos do dano oxidativo neuronal na HD.	- Estudo Quase-Experimental  - Avaliações realizadas no início e na 3ª semana.	Serviço de Neuro-reabilitação de <i>Nova Salus Rehabilitation Center</i> (NSRC).  Amostra: - 18 Participantes com HD incluídos no Programa de Neuro-reabilitação - 10 Voluntários aparentemente saudáveis incluídos no grupo controlo para comparação de marcadores oxidativos (encaminhados ao NSRC em regime de ambulatório para exames laboratoriais de rotina).  Critérios de Inclusão (casos): - Diagnóstico de HD geneticamente confirmado - Estar livre de outras patologias neurológicas e psiquiátricas - Capacidade para realizar os exercícios propostos pelos fisioterapeutas - Autonomia preservada na deambulação confirmada por uma pontuação $\geq 1$ no 9º item do PPT.  Critérios de exclusão (casos): - Condição física ou psiquiátrica que impeçam de completar o programa	3 Semanas	<b>Programa multifuncional de neuro-reabilitação intensivo</b>  <u>Frequência:</u> - Durante um período intra-hospitalar de três semanas - Duas vezes por dia, seis dias por semana, durante pelo menos duas horas por cada sessão <u>Exercícios:</u> - Programa ajustado individualmente (exercícios para melhorar o equilíbrio, a coordenação, a marcha, a postura e a força muscular) - Plataforma propriocetiva: Sistema de Equilíbrio <i>Biodesx</i> , utilizada para melhorar a estabilidade postural estática e dinâmica numa superfície estática ou instável e para aumentar as habilidades cinestésicas em pacientes com deficiência propriocetiva. - Atividades aeróbicas leves, como ciclismo e caminhada, uma vez por dia, por não mais de 20 minutos; - Terapia ocupacional para restaurar habilidades funcionais perdidas: controlo motor global, destreza e motricidade fina.  <b>Grupo Controlo</b> Utilizado para exames laboratoriais. Os hábitos gerais de estilo de vida, incluindo o consumo diário atual de antioxidantes em alimentos e bebidas, foram cuidadosamente monitorizados através de um questionário estruturado.	Adesão de 100% ao programa, sem eventos adversos. Após o programa intensivo de neuro- reabilitação, foram detetadas melhorias estatisticamente significativas a nível da autonomia funcional (Barthel Index 10 itens- BI), equilíbrio e marcha (Tinetti scale 16 itens- TS), teste de performance motora (Physical Performance Test 9 itens - PPT), capacidade funcional total (Total Functional Capacity Scale 5 itens- TFCS). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre homens e mulheres no BI, TS, PPT e TFCS, antes nem depois da neuro- reabilitação intensiva.  Os valores de Cu / Zn-SOD e NSE diminuíram após a neuro- reabilitação, mas ainda superiores aos dos controlos. Cu / Zn-SOD e NSE correlacionaram-se positivamente antes ( $r = 0,659$ ; $p = 0,003$ ) e após a reabilitação ( $r = 0,553$ , $p = 0,017$ ).  Os valores de 8-OHdG diminuíram após a neuro-reabilitação contudo sem atingir significância estatística quando comparados com os valores basais ( $p = 0,145$ ).  Não foi observada correlação entre o resultado dos marcadores oxidativos e a autonomia funcional, performances motoras ou habilidades físicas antes ou após a reabilitação neurológica.	Os achados relatados no presente trabalho fornecem evidências da eficácia da reabilitação neurológica na redução do dano oxidativo em pacientes em HD e sublinham o limite de marcadores oxidativos séricos para a avaliação de características clínicas da DH.  Os marcadores oxidativos são limitados para a avaliação da função motora.  A sua avaliação pode ser útil para melhor determinar a contribuição do <i>stress</i> oxidativo como causa ou como consequência da alteração e perda neuronal que ocorre na DH, bem como para verificar a eficácia dos tratamentos terapêuticos, incluindo a terapia de reabilitação, que vise a diminuição do <i>stress</i> oxidativo.  <u>Recomendações para novas investigações:</u>  Os resultados do presente estudo devem ser validados por um estudo de caso-controle multicêntrico, com alimentação adequada, conduzido para investigar a eficácia dessa neuro-reabilitação intensiva na modulação do estresse oxidativo e sua ligação potencial com independência funcional e desempenho motor numa amostra maior de pessoas com HD nos estádios iniciais e intermediários da doença.
<b>Avaliação da eficácia do programa de reabilitação</b>	Avaliações na semana 0 e 13. Independência e desempenho nas atividades da vida diária (ADL) através do Índice de Barthel (BI) (10-item) e da Escala de Capacidade Funcional Total (TFCS) (5-item), que é uma secção da escala unificada da avaliação da doença de Huntington (UHDRS). Os desempenhos motores nas tarefas funcionais foram avaliados pelo Teste de Desempenho Físico (PPT) (9 itens); equilíbrio e marcha foram avaliados pela escala de Tinetti (TS) (16 itens).						

## 4 DISCUSSÃO

A presente RSL pretende reunir os estudos disponíveis, que traduzam a melhor evidência científica, com o propósito de avaliar a eficácia dos programas de reabilitação motora na pessoa com doença de *Huntington*.

Após pesquisa nas várias bases de dados enumeradas e seleção criteriosa dos artigos a incluir, foram selecionados cinco artigos, os quais foram avaliados na sua qualidade. Os cinco artigos incluídos são referentes a ensaios clínicos controlados, três dos quais são randomizados e dois não randomizados, traduzindo um nível de evidência 1 e 2 respetivamente (14).

Pretendemos assim favorecer a prática baseada na evidência do enfermeiro especialista em enfermagem de reabilitação, na sua intervenção no bem-estar destas pessoas, apontando recomendações sustentadas, processos de implementação e utilização dos resultados obtidos. Da análise dos cinco ensaios clínicos que constituem o corpo do presente trabalho emergem, como medida de eficácia dos programas de reabilitação motora, os resultados que se seguem.

### 4.1 PROGRAMA DE REABILITAÇÃO

Numa primeira análise, verificamos que não há um programa padrão de reabilitação motora para a pessoa com DH. Os programas de treino dos estudos incluídos na presente RSL são muito disparem quanto à duração, frequência e intensidade. O que significa que um plano de reabilitação da pessoa com DH deve ter em conta a fase da doença e as necessidades específicas de cada indivíduo. A disparidade de programas encontrados nos artigos selecionados revela também alguma falta de consenso nesta matéria.

O grau de adesão aos programas de reabilitação foi bastante elevado, revelando alta recetividade dos doentes e suas famílias a estas iniciativas. O E1 obteve uma percentagem de adesão de 90% em ambos os grupos. O E2, 92% ao programa de intervenção e 80% ao grupo de controlo; o E3, 77% ao programa de intervenção e 92% programa intervenção social (controlo); O E4 82,4% do grupo intervenção e 86,7% do grupo controlo; e o E5 uma adesão de 100% em ambos os grupos.

Ainda assim houve alguma variabilidade de adesão, que poderá estar associada ao próprio plano de intervenção, sendo o E3 direcionado unicamente para o aumento da atividade física, recorrendo a visitas domiciliárias de *coaching* a cada 2 semanas, acabando por 33% dos indivíduos abandonar o plano de reabilitação. Por sua vez, o E5 oferece um plano de exercícios estruturado e intensivo em regime intra-hospitalar que promove um maior acompanhamento e treino supervisionado, contudo é um programa

apenas de 3 semanas, o que poderá ser um fator que justifique também a ausência de abandonos.

Durante os períodos de intervenção de treino, não foram observados eventos adversos nos E1, E2, E3 e E5. Já no E4 há relato de dois eventos adversos no grupo de intervenção, que os investigadores associam a condições médicas prévias, e dois eventos adversos graves no grupo controlo.

Seguidamente apresentamos as várias dimensões avaliadas que apontam para os resultados da eficácia dos planos de reabilitação instituídos nos estudos incluídos, avaliando assim a sua eficácia.

## 4.2 FUNÇÃO MOTORA

Os movimentos coreicos que caracterizam a DH, são como que solavancos sucessivos, descoordenados, rápidos e curtos, como que de uma dança, (Umphred, 2010). Logicamente, todos os estudos incluídos na presente RSL avaliaram a função motora antes e depois do programa de reabilitação instituído. Foram utilizadas para o efeito, a sub-escala de avaliação do desempenho motor da Escala Unificada de Avaliação da Doença de Huntington (*Unified Huntington's Disease Rating Scale Modified Motor Assessment* -UHDRS MMA) e o teste de performance motora (*Physical Performance Test 9 items* - PPT).

Como resultado, os E3, E4 e E5 revelaram melhoria do **desempenho motor** dos grupos submetidos a programa de intervenção motora. Os resultados dos planos de reabilitação diária dos E3 e E5 revelaram melhorias estatisticamente significativas no desempenho motor demonstrado pela melhoria do score do Teste de Desempenho Físico (*Physical Performance Test* - PPT). O grupo controlo do E3 teve melhoria no score da UHDRS MMA e o grupo de caso do E4 demonstrou melhorias estatisticamente significativas no score UHDSRS-MMA ( $p=0.003$ ) (diferença 2,9 pontos, 95% [5,42, 0,32]), tal como na perda de **peso corporal** ( $p=0.047$ ) (diferença 2,25 kg, 95% IC: [-4,47, -0,03]).

O E3 revelou também melhoria do **nível de atividade física** (*International Physical Activity Questionnaire* - IPAQ), tal como da **velocidade de marcha**, alcançando melhoria do teste de caminhada de 6 minutos (*6-minute walk*) no grupo de caso e agravamento no grupo controlo. Também na patologia neurodegenerativa de Parkinson, os efeitos benéficos do exercício físico são reconhecidos (15). Em patologias neurodegenerativas, o exercício promove um efeito positivo no desempenho de capacidades neuromotoras envolvidas nos processos degenerativos da DP, importante para a melhor execução de tarefas funcionais como a marcha, precocemente comprometida pela doença (16).

Já os E1 e E2 não obtiveram a melhoria desejada, a nível motor. No E1, após 36 semanas de terapia multidisciplinar, os participantes demonstraram acentuada melhoria apenas a nível da **força muscular** dos membros inferiores ( $p < 0,05$ ). Contudo, contrariamente ao esperado pelos investigadores, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na mobilidade, equilíbrio, resistência cardiorrespiratória e força dos membros superiores entre os grupos, após o período de intervenção.

No E2, o treino de **endurance** resultou na estabilização do défice motor segundo a UHDRS-MMA (basal:  $18,6 \pm 9,2$ , pré-treino:  $26,0 \pm 13,7$ ; pós-treino:  $26,8 \pm 16,4$ ). Contudo, é necessária moderação com este tipo de exercício visto que, em estudos experimentais em ratos com DH, o treino de endurance pode levar à deterioração do músculo esquelético (3).

Quanto ao **equilíbrio corporal**, os indivíduos com DH são caracterizados por exibir excesso de movimento, que é evidente no tronco, face e membros (2). Estes movimentos afetam o equilíbrio corporal e conseqüentemente acrescem risco de queda aos seus portadores. É essencial que um programa de reabilitação vise restabelecer o equilíbrio corporal da pessoa com DH. Para tal, existem várias formas de o fazer, desde os exercícios mais comuns até à dança (17), exercícios de alongamento (18), exercício aquático (16), feedback visual e auditivo (19) (20), “*Wii Balance Board*” (21) e outros tipos de “*exergames*” (22).

Dos estudos selecionados, os programas de reabilitação motora demonstraram o seu impacto no equilíbrio corporal, contudo não foi um ganho transversal. Dos E1, E3 e E5, apenas E5 demonstrou eficácia na melhoria do equilíbrio corporal. Neste estudo, foi utilizada a plataforma propriocetiva “*Sistema de Equilíbrio Biodex*”, para melhorar a estabilidade postural estática e dinâmica numa superfície estática ou instável e para aumentar as habilidades cinestésicas em pacientes com deficiência propriocetiva. Após o programa intensivo de neuro-reabilitação, foram detetadas melhorias estatisticamente significativas a nível do equilíbrio e marcha (*Tinetti scale 16 items- TS*).

Por outro lado, o E3 demonstrou precisamente o contrário. O grupo caso apresentou maior risco de queda após o programa de melhoria de atividade física, revelado pelo agravamento nos resultados do teste de equilíbrio (*Timed Up and Go -TUG*). Contudo, apesar deste agravamento, durante o período do programa, o grupo de caso fez um autorrelato de quedas inferior (14) ao do grupo controlo (24). O E1 não revelou diferenças estatisticamente significativas no equilíbrio entre os grupos.

Na verdade, a capacidade de controlo do tronco é prejudicada nos doentes com DH, agravando-se na posição de sentado e em pé, e melhorando na caminhada, (20).

Esta capacidade está intimamente ligada ao equilíbrio e risco de queda destes doentes. Os estudos acima referidos podem não ser conclusivos, contudo há que destacar os ganhos que o programa de neuro-reabilitação intensiva do E5 demonstrou no equilíbrio e marcha. Na DH, também dos movimentos mais finos são afetados. Estes tornam-se desajeitados e lentos (2). Os programas de reabilitação também demonstraram ganhos a este nível refletindo-se na melhoria da destreza manual e autonomia. A **destreza manual** foi avaliada apenas no E1, apresentando os participantes incluídos do programa de terapia multidisciplinar, acentuada melhoria da destreza manual ( $P < 0,05$ ). Uma análise *post hoc* revelou que o grupo de controlo teve deterioração significativa no teste “porca e parafuso” *Timed Nut and Bolt Test* (NBT) ( $P = 0,008$ ), enquanto o grupo de treino não apresentou alterações ( $P = 0,174$ ).

Quanto à **autonomia**, o E3 revelou melhoria na escala de autoeficácia (*Loring Self Efficacy Scale - LSES*) no grupo de caso, e agravamento no grupo controlo. O E5 revelou melhorias estatisticamente significativas a nível da autonomia funcional (*Barthel Index 10 items- BI*), capacidade funcional total (*Total Functional Capacity Scale 5 items- TFCS*), após o programa intensivo de neuro-reabilitação. Estas melhorias irão refletir-se em qualidade de vida, o que corrobora *Van Walsem* e colaboradores (23), ao concluírem no seu estudo que os indivíduos com DH com melhor capacidade funcional total e que não necessitem de cuidados de saúde possuem melhor qualidade de vida.

A **endurance cardiorrespiratória** melhora com o treino aeróbico e resistido, (24). Também o uso de “*exergames*” nos programas de reabilitação em diversas populações clínicas se demonstraram eficazes a este nível (22). Contudo, os programas supracitados não abrangeram pessoas com DH.

Dos cinco estudos incluídos na presente RSL, apenas E1, E2 e E4 avaliaram os ganhos em endurance cardiorrespiratória. Os três estudos avaliaram a capacidade aeróbica dos indivíduos em estudo, através da avaliação do volume de oxigénio consumido ( $VO_2$ ), volume máximo de oxigénio ( $VO_{2m\acute{a}x}$  - capacidade máxima do corpo em transportar e metabolizar oxigénio) ou pico de consumo de oxigénio ( $VO_{2pico}$ ).

A terapia multidisciplinar em ambulatório (E1) não demonstrou eficácia a nível da endurance cardiorrespiratória. Contudo, os E2 e E4 demonstraram melhoria a este nível. No (E2), o pico de consumo de oxigénio ( $VO_{2pico}$ ) aumentou significativamente no grupo de treino de endurance ( $VO_{2pico} = 0,33 \pm 0,28$  l) tal como nos controlos ( $VO_{2pico} = 0,29 \pm 0,41$  l), o que seria de esperar uma vez que o grupo controlo também foi submetido a plano de treino regular. Também o grupo de exercício estruturado do E4 demonstrou melhor capacidade aeróbica: diferença prevista de  $VO_{2m\acute{a}x}$  ( $p=0.002$ ).



O **dano oxidativo** tem sido identificado por vários estudos experimentais em ratos, como um indicador de doença neuro-degenerativa, (Agassiz et al., 2018). Recentemente, num estudo experimental em ratos, descobriu que o músculo esquelético também desempenha um novo papel na modulação da patogénese sistémica da DH, sugerindo que algumas formas de exercício físico podem ser prejudiciais na neurodegeneração (3).

Os resultados do E5 (programa intensivo de neuro-reabilitação) e E2 (treino de endurance) são inconclusivos a este nível. Verificou-se, pois, uma diminuição do valor dos marcadores de dano oxidativo *Cu/ Zn-superoxide dismutase* (Cu/Zn-SOD) e *neuron-specific enolase* (NSE) e 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), contudo sem atingir significância estatística quando comparados com os valores basais (E5). Assim sendo, não foi observada correlação entre o resultado dos marcadores oxidativos e a autonomia funcional, performances motoras ou habilidades físicas antes ou após a reabilitação neurológica, o que requer um estudo mais alargado a este nível (E5). Quanto a possíveis alterações do músculo esquelético após programa de exercício físico, a análise histológica de secções transversais de fibras musculares do vasto lateral não mostrara alterações patológicas claras (E2).

#### 4.3 FUNÇÃO COGNITIVA E FLUÊNCIA VERBAL

Apesar da reabilitação cognitiva não constituir um objetivo principal do presente estudo, dois estudos incluídos, fizeram intervenção a este nível concomitantemente. Faz sentido que a função cognitiva interfira na função motora. Também a gravidade do comprometimento do reconhecimento emocional se associa significativamente à carga da DH, à proximidade do início dos sintomas motores e ao comprometimento cognitivo (25). Van Walsen e colaboradores (23), realizaram um estudo a respeito da performance cognitiva de pessoas com DH submetidas a um programa intensivo de reabilitação multidisciplinar durante um ano. Este concluiu que a progressão contínua do comprometimento cognitivo foi evidente, sugerindo que a progressão da doença não é interrompida.

Na presente RSL, apenas dois estudos avaliaram a função cognitiva e fluência verbal antes e depois dos programas de reabilitação. No E2, o grupo caso teve pior desempenho que o controlo em todos os testes neuropsicológicos: escala de avaliação de demência de *Mattis* (DRS-2), a pontuação subescala de iniciação/ perseveração da DRS-2, o teste de aprendizagem verbal de *Hopkins*, os testes de *Stroop*, o *Trail Making Test part A and B*, e o *S-DMT*. O mesmo estudo revelou pior desempenho do grupo em estudo que o controlo no teste de fluência verbal e de categoria (E2).

Pelo contrário, o E3 obteve melhoria de resultado do desempenho cognitivo avaliado pelo Teste de Modalidades de Dígitos e Símbolos (*Symbol Digit Modality Test - SDMT*) e agravamento no grupo controlo, com intervenção social. O mesmo estudo revelou melhoria da fluência verbal (*Verbal Category Fluency - CVF*) no grupo caso e agravamento no grupo controlo.

Como podemos confirmar, os resultados de ambos os estudos são díspares e os testes aplicados também. Deste modo, podemos considerar que as diferenças dos resultados poderão estar associadas ao programa de reabilitação, aos instrumentos de medida utilizados e às características da própria amostra como ao estadio e progressão da doença.

#### 4.4 BEM-ESTAR E QUALIDADE DE VIDA

A tipologia dos programas de reabilitação deverão ter como objetivo principal a melhoria da qualidade de vida da pessoa com DH e sua família, já que a coreia de *Huntington* exerce um impacto negativo sobre esta, interferindo na funcionalidade global da pessoa, (26). Também Van Walsem e colaboradores (23) confirmam que a qualidade de vida das pessoas com DH é afetada pela doença, agravando-se nas fases mais avançadas (IV e V) e sendo proporcional ao nível de necessidades não atendidas.

No E3, o bem-estar e a qualidade de vida são indicadores que pretendem demonstrar o efeito do programa de reabilitação instituído. O mesmo estudo verificou a melhoria do bem-estar, definido pelo apego, estabilidade, realização, prazer e autonomia (*ICECAP- 5*), no grupo de caso. Por outro lado, o grupo de intervenção social (controlo) confirmou a melhoria da qualidade de vida (*EQ-5D*).

A este propósito é sabido que os défices de cognição social são potenciais biomarcadores de início e progressão da DH (25), contudo a satisfação das necessidades melhoram a qualidade de vida (23). Neste sentido, os resultados do E3 estarão muito provavelmente relacionados com o programa de reabilitação dirigido às necessidades dos doentes.

### 5 CONCLUSÃO

A prática do enfermeiro especialista em enfermagem de reabilitação deve basear-se na melhor evidência científica disponível. Pretendemos com a presente RSL responder à questão de investigação: qual a eficácia dos programas de reabilitação motora na pessoa com DH?

Uma característica comum a todos os ensaios clínicos foi o tamanho reduzido da amostra. A dimensão das amostras para os grupos de caso variou entre 10 e 19 com

um total de 73 elementos. Dos grupos controlo variou entre 10 e 22 elementos, com um total de 67 elementos. Visto assim, parece que a dimensão total das amostras é razoável. Contudo, os planos de reabilitação são diferentes e os instrumentos de avaliação da sua eficácia também.

Ainda assim, a evidência dos cinco estudos incluídos sugere eficácia dos programas de reabilitação motora, estatisticamente significativa, a vários níveis:

- Melhoria do desempenho motor no E3, E4 e E5 ou estabilização do défice motor no E2;
- Efeitos positivos sobre a destreza manual e a força muscular dos membros inferiores (E1);
- Melhoria do nível de atividade física e velocidade de marcha (E3);
- Melhoria do equilíbrio corporal após programa intensivo de neuro-reabilitação (E5) [agravamento do equilíbrio corporal após programa de *coaching* de atividade física no domicílio (E3) e sem correlação com o programa de intervenção multidisciplinar];
- Melhoria da endurance cardiorrespiratória E1, E2 e E4;
- Melhoria da autonomia funcional e capacidade funcional total com o programa intensivo de neuro-reabilitação do E5, e melhoria da autoeficácia no E3;
- Melhoria dos marcadores oxidativos neuronais Cu/ Zn-SOD e NSE (E5);
- Melhoria do bem-estar (E3).

Consideramos deste modo, que os programas de reabilitação motora parecem beneficiar os indivíduos com DH. Estes programas são díspares quanto ao local em que ocorrem, à frequência, intensidade e tipo de exercícios. Ainda assim, todos demonstraram a sua eficácia a nível motor.

Não podemos deixar de destacar o plano que se demonstrou mais vantajoso: o programa intensivo de neuro-reabilitação (E5). Este obteve melhoria do desempenho motor, equilíbrio corporal, autonomia funcional, capacidade funcional total e redução dos marcadores oxidativos neuronais após três semanas de intervenção intensiva e ajustada. Contudo, não podemos tirar conclusões seguras quanto ao tipo de programa a adotar uma vez que os estudos são limitados pelo reduzido número de participantes.

Além destes aspetos, algumas opções metodológicas durante a pesquisa podem ter limitado o acesso a outros estudos, nomeadamente a exclusão de estudos não publicados ou em curso, as opções relacionadas com a seleção dos descritores, com a aplicação dos operadores booleanos e com o período temporal de pesquisa dos estudos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ordem dos Enfermeiros. Regulamento n.º 392/2019 do Diário da República n.º 85/2019, Série II de 2019-05-03. [Online].; 2019 [cited 2021 1 8. Available from: <https://dre.pt/application/conteudo/122216893>
2. Caron N, Wright G, Hayden M. Huntington Disease. In Adam M, Ardinger H, Pagon R. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington; 2020. p. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1305/>
3. Corrachano S, Blanco G, Williams D, Wettstein J, Simon M, Kumar S, et al. A genetic modifier suggests that endurance exercise exacerbates Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*. 2018; p. 1723-1731. DOI:10.1093/hmg/ddy077
4. WHO. WHO | Genes and human diseases. *Human Genomics in Global Health*. [Online].; 2019 [cited 2021 1 8. Available from: <https://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html#HD>.
5. Dinis A, Santos H, Martins R. Qualidade de Vida dos Cuidadores Informais de Doentes de Huntington. *Millenium*. 2016 setembro: p. 203-210. DOI:10.1111/j.1365-2648.2011.05727.x
6. Joanna Briggs Institute. JBI Reviewer's Manual. [Online].; 2019 [cited 2019 5 1. Available from: <https://wiki.joannabriggs.org/display/MANUAL/JBI+Reviewer%27s+Manual>
7. Joanna Briggs Institute. Critical appraisal tools. [Online].; 2019 [cited 2019 5 1. Available from: <https://joannabriggs.org/critical-appraisal-tools>.
8. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med*. 2009; p. e1000097. DOI:10.1371/journal.pmed1000097
9. Cruickshank T, Reyes A, Penailillo L, Pulverenti T, Bartlett D, Zaenker P, et al. Effects of multidisciplinary therapy on physical function in Huntington's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2018 july: p. 500-507. DOI:10.1111/ane.13002
10. Frese S, Petersen J, Ligon-Auer M, Mueller S, Mihaylova V, Gehrig S, et al. Exercise effects in Huntington disease. *Journal of Neurology*. 2017; p. 32-39. DOI:10.1007/s00415-016-8310-1
11. Busse M, Quinn L, Drew C, Kelson M, Trubey R, Mcewan K, et al. Physical Activity Self-Management and Coaching Compared to Social Interaction in Huntington Disease: Results From the ENGAGE-HD Randomized, Controlled Pilot Feasibility Trial. *Physical Therapy*. 2017; p. 625-639. DOI:10.1093/ptj/pzx031
12. Quinn L, Hamana K, Kelson M, Dawes H, Collett J, Townson J, et al. A randomized, controlled trial of a multi-modal exercise intervention in Huntington's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*. 2016; p. 46-52. DOI:10.1016/j.parkreldis.2016.06.023
13. Ciancarelli I, De Amicis D, Di Massimo C, Sandrini G, Pistarini C, Carolei A, et al. Influence of intensive multifunctional neurorehabilitation on neuronal oxidative damage in patients with Huntington's disease. *Functional Neurology*. 2015; p. 47-52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26214026>
14. Joanna Briggs Institute. JBI Levels of Evidence FAME. JBI Approach. 2013 October: p. 2-6. <http://www.joannabriggs.edu.au>

15. Da Silva T, Schemberg M, & Prado C. Exercício Físico como Intervenção no Tratamento da Doença de Parkinson em Idosos: Uma revisão sistemática. *Anais do EVINCI-UniBrasil: Caderno de Resumos* 2017. 2018 Mar: p. 93. <https://portaldeperiodicos.unibrasil.com.br/index.php/anaisvinci/article/view/3151>
16. Assis G. Exercício aquático com dupla-tarefa para pacientes com doença de Parkinson avançada. Dissertação (Mestrado em Educação Física). Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde; 2016. Report No.: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/23466>
17. Patterson, KK; Wong, JS; Prout, EC; Brooks, D. Dance for the rehabilitation of balance and gait in adults with neurological conditions other than Parkinson's disease: A systematic review. *Heliyon* Elsevier Ltd. 2018 March. DOI:10.1016/j.heliyon.2018.e00584
18. Mirek, E; Filip, M; Banaszkiwicz, K; Rudzińska, M; Szymura, J; Pasiut, S; Stożek, J; Szczudlik, A. The effects of physiotherapy with PNF concept on gait and balance of patients with Huntington's disease – pilot study. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*. 2015: p. 354-357. DOI:10.1016/j.pjnns.2015.09.002
19. Hatzitaki V. The use of visual feedback techniques in balance rehabilitation. In Briassouli A. *BPJ, HA. Health Monitoring and Personalized Feedback using Multimedia Data.*: Springer, Cham.; 2015. DOI:10.1007/978-3-319-17963-6\_11
20. Kegelmeyer, DA; Kostyk, SK; Fritz, NE; Fiumedora, MM; Chaudhari, A; Palettas, M; Kloos, AD. Quantitative biomechanical assessment of trunk control in Huntington's disease reveals more impairment in static than dynamic tasks. *Journal of the Neurological Sciences*. 2017: p. 29-34. DOI:10.1016/j.jns.2017.02.054
21. Gil-Gómez, JA; Lloréns, R; Alcñiz, M; Colomer, C. Effectiveness of a Wii balance board-based system (eBaViR) for balance rehabilitation: A pilot randomized clinical trial in patients with acquired brain injury. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*. 2011. DOI:10.1186/1743-0003-8-30
22. Viana, RB; Vancini, RL; Andrade, MS; Vieira, CA; De Lira, CAB. O uso dos exergames nos protocolos de reabilitação em diversas populações clínicas. *Rev. Bras. Pesq. Saúde*. 2018 September: p. 132-140. <http://www.publicacoes.ufes.br/RBPS/article/viewFile/24512/16710>
23. Van Walsem, MR; Piira, A; Mikalsen, G; Fossmo, HL; Howe, EI; Knutsen, SF; Frich, JC. Cognitive performance after a one-year multidisciplinary intensive rehabilitation program for huntington's disease: An observational study. *Journal of Huntington's Disease*. 2018: p. 379-389. DOI:10.1186/s12955-016-0575-7
24. Vasques, M; Fonseca, E. Estresse oxidativo, exercício físico e saúde encefálica. *Revista de Medicina e Saúde de Brasília*. 2018: p. 76-98. <https://portalrevistas.ucb.br/index.php/rmsbr/article/view/8763>
25. Bora, E; Velakoulis, D; Walterfang, M. Social cognition in Huntington's disease: A meta-analysis. *Behavioural Brain Research*. 2016: p. 131-140. DOI:10.1016/j.bbr.2015.10.001
26. Thorley E, Iyer R, Wicks P, Curran C, Gandhi S, Abler V, et al. Understanding How Chorea Affects Health-Related Quality of Life in Huntington Disease: An Online Survey of Patients and Caregivers in the United States. *Patient*. 2018 May: p. 547-559. DOI:10.1007 / s40271-018-0312-x

## THE INFLUENCE OF MUSIC CADENCE ON KINETIC VARIABLES DURING WATER FITNESS EXERCISES

Data de submissão: 22/12/2022

Data de aceite: 17/01/2023

### Catarina Costa Santos

Universidade da Beira Interior, CIDESD  
Covilhã, Portugal  
<https://orcid.org/0000-0003-4592-8091>

### Mário Jorge Costa

Faculdade de Desporto  
Universidade do Porto, CIF12D  
Porto, Portugal  
<https://orcid.org/0000-0001-5502-1202>

### Luís Manuel Rama

Faculdade de Ciências do  
Desporto e Educação Física  
Universidade de Coimbra, CIDAF  
Coimbra, Portugal  
<https://orcid.org/0000-0002-9619-8618>

**ABSTRACT:** The aim of this study was to assess the effect of music cadence on in-water forces during to different water fitness exercises. Thirty-two young adults (age:  $21.66 \pm 1.79$  years-old, body mass:  $69.32 \pm 10.88$  kg, height:  $168.90 \pm 9.58$  cm) performed two incremental protocols of horizontal adduction (HA) and rocking horse (RH), with music cadences ranging from 105 until 150 bpm. The Aquanex System was used to obtain the

peak force ( $F_{PEAK}$ ) for the dominant (D) and non-dominant (ND) upper limb. No differences were found between  $F_{PEAK D}$  and  $F_{PEAK ND}$  into the same cadence for HA and RH. However, differences were found for the majority of music cadences in both water fitness exercises. The main conclusions were that water fitness exercises elicit different in-water forces during an incremental protocol.

**KEYWORDS:** Biomechanics. Aquatic fitness. In-water forces. Young adults.

### A INFLUÊNCIA DA CADÊNCIA DA MÚSICA NAS VARIÁVEIS CINÉTICAS DURANTE EXERCÍCIOS DE FITNESS NA ÁGUA

**RESUMO:** Foi objetivo deste estudo avaliar o efeito da cadência musical na força aplicada na água durante a execução de dois exercícios de hidroginástica. Trinta e dois jovens adultos (idade:  $21.66 \pm 1.79$  anos, massa corporal:  $69.32 \pm 10.88$  kg, estatura:  $168.90 \pm 9.58$  cm) foram submetidos a dois protocolos incrementais na adução horizontal (HA) e no cavalo-marinho (RH) com cadências musicais entre os 105 e 150 bpm. O sistema Aquanex foi utilizado para obter o pico de força ( $F_{PEAK}$ ) do membro superior dominante (D) e não dominante (ND). Não foram encontradas diferenças entre  $F_{PEAK D}$  e  $F_{PEAK ND}$  na HA e no RH. Contudo, diferenças foram encontradas para a maioria das cadências musicais em ambos os exercícios de hidroginástica. Portanto, conclui-se que exercícios de hidroginástica levam a

diferentes comportamentos das forças na água durante um protocolo incremental de cadências musicais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biomecânica. Hidroginástica. Forças. Jovens adultos.

## 1 INTRODUCTION

Water fitness programmes related to health and well-being have increased exponentially in the aquatic centres. This boost interest is mainly attributed to water properties and the associated potential benefits (Barbosa et al., 2007). Understood water properties related to the physics principles and laws of motion plays a key-role for help water fitness instructors to design well-succeeded programmes (Torres-Ronda & del Alcázar, 2014). For instance, water fitness exercises need to be practised with the water surface at the xiphoid process, or near to that (Kruel et al., 2001) to obtain the maximal beneficial effect of hydrostatic pressure. Most of the previous evidence interested in this domain were focused on acute and chronic physiological adaptations (e.g., Costa et al., 2019). Indeed, the knowledge about the biomechanical responses remains scarce, namely related to the kinetic domain (Santos et al., 2020a).

Human locomotion in water depends on the interaction of propulsive and resistance forces. The understanding of in-water forces was already done in other water activities, as such competitive swimming (e.g., Santos et al., 2021a). However, the complexity of aquatic locomotion hampers the assessment of such forces (Morouço et al., 2011). Improvements in equipment's design and data acquisition enable an estimation or quantification of force values based on bi-dimensional and three-dimensional kinematics analysis, tethered-swimming, fluids analysis and, more recently with pressure sensors. Sensors (e.g., accelerometer or gyroscopes) are developed to enhance the analysis of motion (Pansiot, Lo, & Guang-Zhong, 2010). For instance, water pressure sensors allow directly measure of the upper- (Pereira et al., 2015; Tsunokawa et al., 2019) and lower-limbs' (Bartolomeu et al., 2022) in-water forces in a more validity ecological environment (Santos et al., 2022). To date, just a few papers used pressure sensors to acquire in-water forces during the freely motion (Santos et al., 2019; Santos et al., 2020b; Santos et al., 2021b). However, such forces were mainly obtained using older women (Santos et al., 2020b; Santos et al., 2021b) or clinical population during the water fitness exercises at maximum velocity (Becker & Havriluk, 2006).

Water fitness instructors often consider the music to maintain the synchronization with exercises (Barbosa et al., 2009), motivate the participants' (Costa et al., 2011) and lead up to a desirable exertion (Barbosa et al., 2010). Music cadence or "water tempo" are

characterized by the countdown of only one beat in every two beats (Kinder & See, 1992) and allows to be synchronized with the specific movement of different exercises (Santos et al., 2020a). Water fitness programmes comprise different exercises with variants and extensions from walking, running, rocking, jumping, kicking or scissors group (Sanders, 2000) Some research has been produced in order to better understand the effect of musical cadence in physiological and kinematic response during water fitness sessions (Costa et al., 2011; Oliveira et al., 2011; Teixeira et al., 2015) as well as attempted to highlight the acute responses through different mechanical strategies, i.e. different segmental actions by the number of limbs added. For instance, the number of limbs influenced the physiological response in young women (Costa et al., 2019), while the exercise variant (e.g., simultaneous, and alternated arms flexion) lead to different applied in-water force (Santos et al., 2020b). Therefore, this approach can help water fitness instructors to prescribe and define the most appropriate exercise to obtain a desirable force production according to a specific music cadence.

The aim of the present study was to assess the effect of music cadence in force production and to compare two water fitness exercises. It was hypothesized that the in-water peak force for both upper-limbs' would increase to follow the music cadence and the two exercises can lead to differences between exertions.

## 2 METHODS

### 2.1 PARTICIPANTS

Thirty-two young healthy subjects, eleven women and twenty-one men volunteered to participate in this study (Table 1). The inclusion criteria were defined as follows: (i) clinically healthy at the beginning of the study; (ii) have at least one year of experience in water fitness exercises and programs; (iii) non-pregnant; and (iv) not having any history of musculoskeletal or neurologic injury, conditions or syndromes diagnosed in the past six months. Participants of both genders were recruited among those enrolled in a Sports Science degree and taking an elective module in Water Fitness (two sessions a week). All participants were informed of the benefits and experimental risks before give their written informed consent for the participation. All procedures were in accordance with the Helsinki Declaration in respect to human research and approved by the Institutional Ethics Committee (CE/FCDEF-UC/00362019).



Table 1. Descriptive statistic (Mean  $\pm$  SD) for the characteristics of the participants.

Variable	Range	Mean $\pm$ SD
Age (yr)	18.0 – 26.0	21.66 $\pm$ 1.79
Body mass (kg)	51.1 – 81.3	69.32 $\pm$ 10.88
Body height (cm)	152.3 – 181.2	168.90 $\pm$ 9.58
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	18.5 – 27.1	24.42 $\pm$ 9.23
Upper-limb volume (L)	1.41 – 2.54	1.83 $\pm$ 0.22

yr, years-old; kg, kilogram; cm, centimeter; BMI, body mass index; kg/m<sup>2</sup>, kilogram per square meter; L, liter.

## 2.2 STUDY DESIGN

A cross-sectional design was selected for this study. In-water data collection was held in a 25-m indoor pool (12.5-m width and maximal depth of 1.80-m) with a mean water temperature of 29° C and 73.5% of humidity. Participants were randomly assigned to perform in different days the following water fitness exercises: horizontal upper-limbs adduction (HA); and rocking horse with horizontal upper-limbs adduction (RH). The HA is characterized as maintaining a static trunk with lower limbs fixed to the ground (Costa et al., 2019) when performing the upper limbs' action. During the motion of the arms, a full extension is required, without any restriction in the range of motion of shoulders at abduction. Both hands positioned at a 90° angle considering the water surface. In RH add the upper limbs require the same pattern of motion as in HA. Lower limbs actions have a continuous and simultaneous motion with horizontal upper-limbs' adduction and abduction (Barbosa et al., 2010). In every cycle between leaps the same knee flexion was assumed, when the participants' performed arms abduction and the opposite leg did a hyperextension when adduction was reached. The level of the water surface was set at near xiphoid process, as reported elsewhere (Barbosa et al., 2007).

Each exercise was performed over an incremental protocol, with four music cadences, starting at 105 bpm and increasing every 30 seconds by 15 bpm, up to 150 bpm. The music cadence was controlled by a metronome (Korg, MA-30, Tokyo, Japan) plugged-in to a sound system and both exercises were performed at "water tempo" (Kinder & See, 1992), which allowed the synchronization with the specific movement. Verbal and visual cues were given to participants during the protocol. The test ended when the participant decreased the range of motion (ROM), failed to maintain the desired music cadence or when the 30-sec trial was completed. Accordingly, all women and men were able to successfully finish the incremental protocol.

## 2.3 MEASURES

Height and body mass were measured using a Harpenden stadiometer (model 98.603, Holtain Ltd., Crosswell, UK) and a SECA scale (model 770, Hanover, USA), respectively. Dominant upper-limb volume was estimated as proposed by Rogowski et al. (2008). In-water forces were assessed by reliable hydrodynamic measurement system (Santos et al., 2022). The Aquanex System (v.4.2, Swimming Technology Research, Richmond, VA, USA) is composed by two independent sensors that are positioned between phalanges of middle and ring fingers of both hands and allowed to measure the pressure differential between the palmar and dorsal surfaces. Thus, the peak force ( $F_{PEAK}$ , N) of dominant (D) and non-dominant (ND) upper-limbs were assessed at a frequency of 100Hz. At the beginning of each trial (i.e., music cadence), participants kept their hands immersed (10-sec) to calibrate the system. A signal-processor (AcqKnowledge v.3.7.3, Biopac Systems, Santa Barbara, CA, USA) was used to export data with a 5Hz cut-off low-pass 4th order Butterworth filter upon residual analysis. First positive peak (one cycle) was discarded.

## 2.4 STATISTICAL ANALYSIS

Exploratory data analysis was used to identify potential outliers. Shapiro-Wilk test was used to confirm the normality of distribution ( $p > 0.05$ ). Descriptive statistics (range, mean standard and deviation, SD) were calculated for the pooled sample. A non-parametric Wilcoxon Signed-Rank Test was used to compare differences between dominant and non-dominant peak force and also between the two exercises into the same music cadence. Friedman test was conducted to compare differences between music cadences. Additionally, effect size (ES) was calculated based on Cohen's  $d$  (Cohen, 1988) to assess the magnitude of the mean differences between cadences and interpreted according to author's recommendation: (i) small ( $d \geq 0.20$ ); (ii) moderate ( $d \geq 0.50$ ); and (iii) large ( $d \geq 0.80$ ). The level of statistical significance was set at  $p \leq 0.05$ .

## 3 RESULTS

The comparison between  $F_{PEAK}$  of D and ND upper-limb is shown in Table 2. A trend to increase  $F_{PEAK}$  for both limbs' was observed from slower to faster cadences. Larger values were found in HA for  $F_{PEAK}$  D and ND when comparing with RH. There were no differences between  $F_{PEAK}$  D and ND into the same cadence for HA and RH. A small ES was found for all variables.

Table 2. Descriptive statistic (Mean ± SD) for dominant member and non-dominant limb into the same cadence.

Cadence (bpm)	Variables	HA			RH		
		Mean ± SD	p	ES	Mean ± SD	p	ES
105	F <sub>PEAK</sub> D (N)	31.44±10.89	0.13	0.11	25.81±7.60	0.50	0.06
	F <sub>PEAK</sub> ND (N)	30.29±9.78			25.34±7.58		
120	F <sub>PEAK</sub> D (N)	37.20±12.16	0.21	0.09	34.15±11.72	0.65	0.06
	F <sub>PEAK</sub> ND (N)	36.17±10.54			33.45±12.16		
135	F <sub>PEAK</sub> D (N)	43.32±13.11	0.76	0.00	42.48±12.50	0.93	0.01
	F <sub>PEAK</sub> ND (N)	43.27±12.43			42.66±13.50		
150	F <sub>PEAK</sub> D (N)	50.03±14.52	0.20	0.08	49.74±15.09	0.45	0.09
	F <sub>PEAK</sub> ND (N)	51.23±14.46			48.28±16.46		

bpm, beats per minute; HA, horizontal adduction; F<sub>PEAK</sub>, peak force; D, dominant; ND, non-dominant; N, Newton; RH, rocking horse adduction.

Table 3 reports a comparison analysis between HA and RH into the same music cadence. Differences were found in music cadence of 105 bpm for F<sub>PEAK</sub> D and ND with a large and moderate ES, respectively. Differences were also found in the cadence of 120 and 135 bpm for F<sub>PEAK</sub> D and in the 150 bpm for F<sub>PEAK</sub> ND.

Table 3. Descriptive statistic (Mean ± SD) for dominant and non-dominant limb propulsive peak force between two exercises.

Cadence (bpm)	Variables	HA	RHadd	p	ES
		Mean ± SD	Mean ± SD		
105	F <sub>PEAK</sub> D (N)	31.44±10.89	25.81±7.60	0.00	0.91
	F <sub>PEAK</sub> ND (N)	30.29±9.78	25.34±7.58	0.00	0.56
120	F <sub>PEAK</sub> D (N)	37.20±12.16	34.15±11.72	0.03	0.25
	F <sub>PEAK</sub> ND (N)	36.17±10.54	33.45±12.16	0.07	0.24
135	F <sub>PEAK</sub> D (N)	43.32±13.11	42.48±12.50	0.55	0.06
	F <sub>PEAK</sub> ND (N)	43.27±12.43	42.66±13.50	0.80	0.05
150	F <sub>PEAK</sub> D (N)	50.03±14.52	49.74±15.09	0.79	0.02
	F <sub>PEAK</sub> ND (N)	51.23±14.46	48.28±16.46	0.01	0.19

bpm, beats per minute; HA, horizontal adduction; F<sub>PEAK</sub>, peak force; D, dominant; ND, non-dominant; N, Newton; RH, rocking horse adduction.

Table 4 shows the differences between music cadences into the same exercise and upper-limb for F<sub>PEAK</sub> D and ND. The trend for F<sub>PEAK</sub> was to find higher values during the cadences increment from ~31 N (105 bpm) to ~51 N (150 bpm) in HA and from ~25 N (105 bpm) to ~48 N (150 bpm) for RH. Differences were found for HA<sub>105-120</sub> (D, p < 0.01, d = 0.49; ND, p = 0.03, d = 0.57), HA<sub>105-135</sub> (D, p < 0.01, d = 0.97; ND, p < 0.01, d = 1.15), HA<sub>105-150</sub> (D, p <

0.01,  $d = 1.43$ ; ND,  $p < 0.01$ ,  $d = 1.68$ ),  $HA_{120-135}$  (D,  $p = 0.01$ ,  $d = 0.48$ ; ND,  $p < 0.01$ ,  $d = 0.61$ ) and  $HA_{120-150}$  (D,  $p < 0.01$ ,  $d = 0.95$ ; ND,  $p < 0.01$ ,  $d = 1.18$ ). There was also meaningful differences for  $F_{PEAK}$  D in  $RH_{105-135}$  ( $p < 0.01$ ,  $d = 1.59$ ),  $RH_{105-150}$  ( $p < 0.01$ ,  $d = 1.98$ ),  $RH_{120-135}$  ( $p = 0.01$ ,  $d = 0.68$ ),  $RH_{120-150}$  ( $p = 0.01$ ,  $d = 1.14$ ) and for  $F_{PEAK}$  ND during the  $RH_{105-120}$  ( $p = 0.03$ ,  $d = 0.79$ ),  $RH_{105-135}$  ( $p < 0.01$ ,  $d = 1.56$ ),  $RH_{105-150}$  ( $p < 0.01$ ,  $d = 1.77$ ),  $RH_{120-135}$  ( $p < 0.01$ ,  $d = 0.71$ ) and  $RH_{120-150}$  ( $p < 0.01$ ,  $d = 1.01$ ). No differences were found for  $F_{PEAK}$  D and ND values in  $HA_{135-150}$  and  $RH_{135-150}$  neither for  $F_{PEAK}$  D in  $RH_{105-120}$ .

Table 4. Descriptive statistic (Mean  $\pm$  SD) for propulsive peak force in two water fitness exercises at different music cadences.

Variables	Cadence (bpm)			
	105	120	135	150
<b>HA</b>				
$F_{PEAK}$ D (N)	31.44 $\pm$ 10.89	37.20 $\pm$ 12.16 $\alpha^{**}$	43.32 $\pm$ 13.11 $\alpha^{**}, \beta^{**}$	50.03 $\pm$ 14.52 $\alpha^{**}, \beta^{**}$
$F_{PEAK}$ ND (N)	30.29 $\pm$ 9.78	36.17 $\pm$ 10.54 $\alpha^{*}$	43.27 $\pm$ 12.43 $\alpha^{**}, \beta^{**}$	51.23 $\pm$ 14.46 $\alpha^{**}, \beta^{**}$
<b>RH<sub>add</sub></b>				
$F_{PEAK}$ D (N)	25.81 $\pm$ 7.60	34.15 $\pm$ 11.72	42.48 $\pm$ 12.50 $\alpha^{**}, \beta^{**}$	49.74 $\pm$ 15.09 $\alpha^{**}, \beta^{**}$
$F_{PEAK}$ ND (N)	25.34 $\pm$ 7.58	33.45 $\pm$ 12.16 $\alpha^{*}$	42.66 $\pm$ 13.50 $\alpha^{**}, \beta^{**}$	48.28 $\pm$ 16.46 $\alpha^{**}, \beta^{**}$

$^{*}$ ,  $p \leq 0.05$ ;  $^{**}$ ,  $p \leq 0.01$ ;  $\alpha$ , different from 105 bpm;  $\beta$ , different from 120 bpm.

bpm, beats per minute; HA, horizontal adduction;  $F_{PEAK}$ , peak force; D, dominant; ND, non-dominant; N, Newton; RH, rocking horse adduction;

## 4 DISCUSSION

The aim of the present study to assess the effect of music cadence and different exercises in force production in the water. Results suggested that both upper-limbs had a similar exertion into the same cadence and both exercises showed different in-water peak forces between music cadences.

Young adult participants reached values near to 50 N at 150 bpm. In-water forces of upper- and lower-limbs are, on a regular basis, estimated in swimming as a key-role to enhancing the performance (Lauder et al., 2001) and to prevent injuries (Becker & Havriluk, 2006). While assessing swimmers during the horizontal adduction, Becker and Havriluk (2006) reported values near to 76 N and 80 N for the right and left hand, respectively. However, the role of musical cadence imposes a continuous segmental frequency and velocity, which lead to the same pattern motion during the exertion. Therefore, when the musical cadence increase, the same happens to the limb's velocity (Costa et al., 2011). Thus, our results suggest that the in-water force increases while following the musical cadence in HA and RH. Indeed, older women demonstrated the same pattern

while performing the same exercises (Santos et al., 2021b). However, authors reported in-water forces near 31 N at the cadence of 150bpm. As water fitness programmes are enrolled by heterogeneous age groups, instructors should pay attention to such inter-subject variability. Differences were found between cadences for the majority variables, which mean that the rhythm can be useful to achieve the desired intensity of exertion. Differences in maximum force (N) between dominant and non-dominant have been reported for HA, RH, and arm flexion by the elbow (Santos et al., 2020b; Santos et al., 2021b). As expected, there was a trend in our study to obtain higher values in  $F_{PEAK}$ . However, it seems that both limbs do not promote significant differences in both exercises. This may be explained by the optimal coordination during the exertion, which indicates that hypothetical asymmetries may do not exist.

According to the kinetics of both exercises, the RH seems to promote lower in-water forces compared to HA. The same trend was previously reported for older women (Santos et al., 2021b). Barbosa et al. (2010) demonstrated that the range of motion was maintained while performing the rocking horse at higher cadences. However, the multiple hops can lead to instability, leading to lower values in lower cadences when compared with the HA. This suggests, as happens in the physiologic domain, where an exercise using the upper and lower-limbs does not promote higher exertion than the exercise that used only upper-limb motion (Costa et al., 2019). For instance, we can have similar exertion pattern when adopted a static position or an imbalance position at higher music cadences, because the short time contact with the ground can lead to similar in-water forces.

Some limitations of the present research can be pointed out: (i) the uncontrolled effect of range motion (i.e., kinematic analysis); (ii) the use of only four music cadences.

## 5 CONCLUSION

Water fitness exercises in young adults elicit different in-water forces during an incremental protocol and increasing music cadence promotes an increase in applied force.

## REFERÊNCIAS

Barbosa, T.M., Garrido, M., & Bragada, J. (2007). **Physiological adaptations to head-out aquatic exercises with different levels of body immersion.** *Journal of Strength and Conditioning Research*, 21(4): 1255-1259.

Barbosa, T.M., Marinho, D.A., Reis, V.M., Silva, A.J., & Bragada, J.A. (2009). **Physiological assessment of head-out aquatic exercises in healthy subjects: A qualitative review.** *Journal of Sports Science and Medicine*, 8: 179-189.

Barbosa T.M., Sousa, V.F., Silva, A.J., Reis, V.M., Marinho, D.A., & Bragada, J.A. (2010). **Effects of musical cadence in the acute physiologic adaptations to head-out aquatic exercises.** *Journal of Strength and Conditioning Research*, 24(1): 244-250.

Bartolomeu, R. F., Rodrigues, P., Santos, C. C., Costa, M. J., & Barbosa, T. M. (2021). **Is There Any Effect of Symmetry on Velocity of the Four Swimming Strokes?** *Symmetry*, 14(1), 12.

Becker, T., & Havriluk, R. (2006). **Bilateral and anterior-posterior muscular imbalances in swimmers.** In J. P. Vilas-Boas, F. Alves, & A. Marques (Eds.), *X Biomechanics and Medicine in Swimming. Portuguese Journal of Sport Sciences*, 6(2): 327-328.

Cohen, J. (1988). **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences, Second Edition.** New York, USA: Routledge Academic.

Costa, M.J., Cruz L., Simão, A., & Barbosa T.M. (2019). **Cardiovascular and perceived effort in head-out water exercises: effect of limbs' action and resistance equipment.** *Journal of Human Kinetics*, 69: 89-97.

Costa, M.J., Oliveira, C., Teixeira, G., Marinho, D.A., Silva, A.J., & Barbosa, T.M. (2011). **The influence of musical cadence into aquatic jumping jacks kinematics.** *Sports of Science and Medicine*, 10: 607-615.

Kinder, T., & See, J. (1992). **Aqua Aerobics: A Scientific Approach.** Dubuque, USA: Eddie Bowers Publishing Company.

Kruel, L., Moraes, E., Avila, A., & Sampedro, R. (2001). **Alterações fisiológicas e biomecânicas em indivíduos praticando exercícios de Hidroginástica dentro e fora d'água.** *Kinesis*, número especial: 104-154.

Lauder, M.A., Dabnichki, P., & Bartlett, R.M. (2001). **Improved accuracy and reliability of sweepback angle, pitch angle and hand velocity calculations in swimming.** *Journal of Biomechanics*, 34(1): 31-39.

Morouço, P., Keskinen, K., Vilas-Boas, J.P., & Fernandes, R.J. (2011). **Relationship between tethered forces and the four swimming techniques performance.** *Journal of Applied Biomechanics*, 27(2): 161-169.

Oliveira, C., Teixeira, G., Costa, M.J., Marinho, D.A., Silva, A.J., & Barbosa, T.M. (2011). **Relationship between head-out aquatic exercise kinematics and musical cadence: analysis of the side kick.** *International SportMed*, 12: 39-52.

Pansiot, J., Lo, B., & Guang-Zhong, Y. (2010). **Swimming stroke kinematic analysis with BSN.** *International Conference on Body Sensor Networks (BSN)*, Singapore, IEEE, 153-158.

Pereira, G., Schutz, G., Ruschel, C. Roesler, H., & Pereira, S. (2015). **Propulsive force symmetry generated durring butterfly swimming.** *Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano*, 17(6): 704-712.

Rogowski, I., Ducher, G., Brousseau, O., & Hautier, C. (2008). **Asymmetry in volume between dominant and nondominant upper limbs in young tennis players.** *Pediatric Exercise Science*, 20: 263-272.

Sanders, M. (2000). **YMCA Water Fitness for Health.** Champaign, IL: Human Kinetics.

Santos, C. C., Barbosa, T. M., & Costa, M. J. (2020a). **Biomechanical responses to water fitness programmes: A narrative review.** *Motricidade*, 16(3), 305-315.

Santos, C. C., Barbosa, T. M., Bartolomeu, R. F., Garrido, N. D., & Costa, M. J. (2020b). **Inter-Limb Symmetry at Simultaneous and Alternated Arms Flexion by the Elbow during Water Fitness Sessions.** *Symmetry*, 12(11), 1776.

Santos, C. C., Marinho, D. A., & Costa, M. J. (2022). **The Mechanical and Efficiency Constraints When Swimming Front Crawl with the Aquanex System.** *Journal of Human Kinetics*, 84, 166–173.

Santos, C. C., Marinho, D. A., Neiva, H. P., & Costa, M. J. (2021a). **Propulsive forces in human competitive swimming: a systematic review on direct assessment methods.** *Sports Biomechanics*, 1–21. Advance online publication.

Santos, C. C., Marinho, D. A., Fail, L. B., Neiva, H. P., & Costa, M. J. (2021b). **Force production and coordination from older women in water fitness exercises.** *Healthcare*, 9(8), 1054.

Santos, C. C., Rama, L. M., Marinho, D. A., Barbosa, T. M., & Costa, M. J. (2019). **Kinetic Analysis of Water Fitness Exercises: Contributions for Strength Development.** *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(19), 3784.

Teixeira, G., Costa, M.J., Oliveira, C., Marinho, D.A., Silva, A.J., & Barbosa, T.M. (2015). **Alterações na cinemática angular do movimento básico de Hidroginástica “Balanço Lateral” induzidas pelo incremento do ritmo musical.** *Motricidade*, 11(2): 143-152.

Torres-Ronda, L., & Del Alcázar, X. (2014). **The Properties of Water and their Applications for Training.** *Journal of Human Kinetics*, 44: 237–248.

Tsunokawa, T., Mankyu, H., Takagi, H., & Ogita, F. (2019). **The effect of using paddles on hand propulsive forces and Froude efficiency in arm-stroke-only front-crawl swimming at various velocities.** *Human Movement Science*, 64: 378-388.

# CAPÍTULO 7

## USO TERAPÊUTICO DA CANNABIS SATIVA NO TRATAMENTO DE DOENÇAS CRÔNICAS

Data de submissão: 08/02/2023

Data de aceite: 20/02/2023

### Vaneide Ediele Duarte Martins

Faculdade Sequencial  
São Paulo – SP

<https://lattes.cnpq.br/0614829536923730>

### Marta de Oliveira Barreiro

Universidade Federal do Maranhão  
São Luís – MA

<http://lattes.cnpq.br/2695239794047991>

### Ilka Kassandra Pereira Belfort

Faculdade Laboro  
São Luís – MA

<http://lattes.cnpq.br/7359488931067941>

### Viviane Sousa Ferreira

Universidade Federal do Maranhão  
São Luís – MA

<http://lattes.cnpq.br/9540852892015299>

### Vanessa Edilene Duarte Martins

Universidade Federal do Maranhão  
São Luís – MA

<http://lattes.cnpq.br/2739224836952749>

**RESUMO:** O conhecimento das propriedades terapêuticas da *Cannabis sativa* faz com que alguns países já comercializem essa

planta para fins terapêuticos e recreativos. Em meio as dificuldades para a obtenção de tratamento mais eficaz para diversas patologias, estudos têm sido realizados com substâncias presentes na Cannabis sativa, dentre elas se destaca o canabidiol. Estudos clínicos e pré-clínicos, mostram que o canabidiol apresenta efeitos terapêuticos para várias doenças, como a epilepsia, dor neuropática, Parkinson, Alzheimer, esquizofrenia, ansiedade, depressão, câncer, Aids, entre outras. A presente pesquisa tem como foco o conhecimento e sua perspectiva de utilização para melhor compreender suas ações e seus efeitos na pesquisa experimental e na prática médica. Extratos de Cannabis sativa apresentam efeito analgésico em diversos estudos clínicos, sugerindo seu uso no tratamento da dor, em particular naquela de origem neuropática e convulsões. A *Cannabis sativa* também apresentou efeitos ansiolíticos quando usados como adjuvantes no tratamento da dor no câncer, na doença de Parkinson e na esclerose múltipla. Porém, efeitos adversos significativos, como euforia, depressão e sedação limitam o uso clínico desses agentes canabinóides. No Brasil, são escassas as pesquisas que evidenciam os resultados positivos do seu uso terapêutico como um fitoterápico, dificultando a sua inserção para uso terapêutico e novas descobertas científicas relacionadas aos benefícios do uso dessa planta. Já no meio internacional, pesquisas apontam a



importância da *Cannabis sativa* no tratamento do alívio da dor em pacientes crônicos e para a cura da epilepsia.

**PALAVRAS-CHAVES:** Canabidiol. Doenças Crônicas. Fitoterapia. Maconha Terapêutica.

## THERAPEUTIC USE OF CANNABIS SATIVA IN THE TREATMENT OF CHRONIC DISEASES

**ABSTRACT:** Knowledge of the therapeutic properties of *Cannabis sativa* means that some countries already commercialize this plant for therapeutic and recreational purposes. In the midst of difficulties in obtaining more effective treatment for various pathologies, studies have been carried out with substances present in *Cannabis sativa*, among which cannabidiol stands out. Clinical and preclinical studies show that cannabidiol has therapeutic effects for various diseases, such as epilepsy, neuropathic pain, Parkinson's, Alzheimer's, schizophrenia, anxiety, depression, cancer, AIDS, among others. This research focuses on knowledge and its perspective of use to better understand its actions and its effects in experimental research and medical practice. *Cannabis sativa* extracts have shown an analgesic effect in several clinical studies, suggesting its use in the treatment of pain, particularly that of neuropathic origin and seizures. *Cannabis sativa* has also shown anxiolytic effects when used as an adjunct in the treatment of cancer pain, Parkinson's disease and multiple sclerosis. However, significant adverse effects such as euphoria, depression and sedation limit the clinical use of these cannabinoid agents. In Brazil, there are few studies that show the positive results of its therapeutic use as a herbal medicine, making it difficult to insert it for therapeutic use and new scientific discoveries related to the benefits of using this plant. Already in the international environment, research points to the importance of *Cannabis sativa* in the treatment of pain relief in chronic patients and for the cure of epilepsy.

**KEYWORDS:** Canabidiol. Chronic diseases. Phytotherapy. Therapeutic Marijuana.

### 1 INTRODUÇÃO

A *Cannabis sativa* foi uma das primeiras plantas cultivadas pelo homem, dentre todas as espécies de plantas domesticadas pelo ser humano, talvez nenhuma tenha a versatilidade da *C. sativa* (CS). Popularmente conhecida no Brasil pelo seu nome africano, maconha, tem feito parte da história da humanidade por centenas de anos. A planta do cânhamo, *C. sativa*, foi utilizada há 1200 anos atrás como fonte de fibras para a fabricação de tecidos e cordoaria a partir do seu caule, dada a sua grande resistência. Esta espécie, e preparados a partir dela, são conhecidos por uma variedade de nomes, incluindo o haxixe, maconha, e têm sido utilizada durante séculos para obter sensações de prazer e euforia após o seu consumo, geralmente quando fumada (KALANT, 2001).

Em todas as épocas e culturas, o homem aprendeu a tirar proveito dos recursos naturais locais, de acordo com (MECHOULAM,1973), a *C. sativa* vem sendo utilizada há séculos pela humanidade para diversos fins. Além de seu efeito psicoativo, a *C. sativa*

possui importância nutricional, medicinal e industrial como alimento, fármaco, fibra e óleo combustível.

Em relação as práticas medicinais, percebeu-se que essa planta, capaz de induzir sonolência, seria também capaz de acalmar, se usada em dosagens menores. Moreau de Tours e o cientista e médico Irlandês William Brooke O'Shaughnessy, foram os mentores da introdução da *Cannabis* na Medicina Ocidental, sobretudo no tratamento de doenças infecciosas como o tétano, a raiva e a cólera (KALANT, 2001). O uso da *C. sativa* é muito discutido no tratamento sintomático e preventivo, porém alguns cuidados devem ser tomados na hora de indicar o uso do canabidiol na forma oral, pois seus efeitos adversos podem ser agravados em função da característica da doença.

Em 1937 é regulamentada a utilização da *Cannabis* para fins medicinais. Com esta lei federal apenas os médicos podiam prescrever a *Cannabis* e ao efetuar a prescrição eram obrigados a comunicar ao Federal Bureau of Narcotics (BALLOTTA, 2005). Atualmente, com as novas descobertas de tratamento com a *C. sativa*, os médicos passaram a indicá-la para tratamentos de doenças crônicas nos países como Canadá e Uruguai, pois o conhecimento das propriedades terapêuticas da *C. sativa* faz com que alguns países já comercializem essa planta para fins terapêuticos e recreativos.

No Brasil já se houve falar desse mesmo tratamento, porém em casos isolados. É importante frisar que são escassas as pesquisas que evidenciam os resultados positivos do seu uso terapêutico como um fitoterápico, dificultando a sua inserção para uso terapêutico e novas descobertas científicas relacionadas aos benefícios do uso dessa planta. Já no meio internacional, pesquisas apontam a importância da *C. sativa* no tratamento de transtorno de ansiedade, o alívio da dor em pacientes crônicos e para a cura da epilepsia (DURAN, 2004).

Da *C. sativa* é utilizado suas flores e folhas secas ou os pequenos talos que apresentam baixa concentração de THC, que podem ser fumadas ou ingeridas, sendo que a forma mais comum é a fumada. No fumo a maconha é absorvida por via pulmonar e atinge o Sistema Nervoso Central (cérebro) em apenas alguns segundos, já na forma ingerida sua absorção é lenta de 30 a 60 minutos. A forma mais concentrada é a planta *in natura*. Pode-se ainda utilizar a resina, produzida pelas glândulas das vilosidades da planta que apresenta uma concentração média de THC. O óleo de *C. sativa* resultante da extração da resina é onde contém uma alta concentração de THC (BONFÁ et al, 2008).

No Brasil com a autorização da Agência Nacional de Vigilância (ANVISA), já se pode importar extratos produzidos por indústrias farmacêuticas internacionais, porém, o processo ainda é burocrático. Além de ser usado no tratamento de epilepsia, componentes da *C. sativa*, como é o caso do canabidiol (CBD), também

se mostra promissor no tratamento de outras doenças como ansiedade, doenças neurodegenerativas, esclerose múltipla entre outras. O primeiro relato do uso de CBD no tratamento de convulsão foi publicado no dia 4 de fevereiro de 1843 pelo médico irlandês William Brook O'Shaughnessy, relatando que uma menina indiana com quarenta dias de vida sofria crises severas de convulsões, as quais não respondiam a nenhum tipo de tratamento aplicado na época, O'Shaughnessy deu a primeira gota de tintura de resina de *C. sativa* que equivalia a 3 mg de resina.

Já no Brasil, pode-se relatar o caso de Anny Fischer, uma menina de seis anos que sofria com severas crises epiléticas e regressão autística foi tratada ilegalmente com óleo extraído de variedades de *C. sativa* ricas em CBD e com baixa concentração de tetrahydrocannabinol (THC). Os resultados foram ótimos, reduzindo quase totalmente as convulsões e melhorando os sintomas autísticos, sendo o único efeito colateral observado a sonolência (LOPES, 2014).

Há relatos do uso de *C. sativa* também no tratamento da dor neuropática, esclerose múltipla e Parkinson (BRUCKI et al, 2015).

O uso da *C. sativa* só é indicado caso os tratamentos convencionais tenham falhado ou a qualidade de vida do paciente esteja prejudicada, pois o uso de canabinóides tem suas contraindicações sendo desaconselhada para pacientes com risco aumentado de transtornos psicossociais, como ideação suicida, uso de drogas ilícitas e prejuízo da função cognitiva a longo prazo (WARE, 2010).

Os efeitos colaterais do uso de canabinóides é vasto e pode ser dividido em efeitos desejáveis e indesejáveis. Dentro dos desejáveis encontram-se os efeitos ansiolíticos, diminuição da percepção dolorosa, ação anticonvulsivante e antiemética, estimulação do apetite em pacientes inapetentes, melhora do sono, diminuição da espasticidade com aumento do relaxamento do tônus muscular e controle do glaucoma com redução da pressão intraocular. No grupo dos indesejáveis estão taquicardia, hipertensão, despertares noturnos, diminuição da capacidade cognitiva, da concentração e da memória, ansiedade, psicose, alucinações, depressão e apatia (GROTENHERMEN, 2012).

Embora a maconha seja uma droga ilegal no Brasil, o canabidiol, em específico, foi adicionado à lista de substâncias prescritas e o Conselho Federal de Medicina autorizou seu uso com receita médica para pacientes que não respondem aos tratamentos convencionais, passos importantes na concretização do uso do canabidiol como medicamento.

A presente pesquisa tem como foco principal o conhecimento da *Canabis sativa* e sua perspectiva de utilização para melhor compreender as ações e os efeitos na

pesquisa experimental e na prática médica, o uso terapêutico por meio dos canabinóides, as consequências orgânicas e psíquicas, demonstrando suas opções de uso clínico, além de perspectivas futuras e os principais avanços no potencial uso terapêutico de alguns compostos canabinóides.

## 2 METODOLOGIA

Foi realizado uma revisão bibliográfica no sítio da BVS acionando à base de dados LILACS e SCIELO, identificando estudos e revisões da literatura sobre a farmacologia e o uso terapêutico de substâncias canabinóides na dor. Nessa busca foram utilizadas as seguintes palavras-chaves: maconha terapêutica, doenças crônicas, *Cannabis sativa*; tratamento de dor.

Vale salientar que este trabalho não visa discutir a legalização do uso recreativo da maconha, o foco é, exclusivamente, o uso terapêutico da *Cannabis sativa* como meio de salvar a vida daqueles que necessitam ou pelo menos, trazer uma melhor qualidade de vida.

Por fim, a título de atualização, este trabalho foi elaborado ao longo do ano de 2014 como trabalho de conclusão de curso, quando ainda não havia uma decisão acerca da liberação do medicamento à base do canabidiol. No entanto, em 2015 a Anvisa decidiu pela retirada desse medicamento da lista de medicamentos proibidos para ser uma substância controlada.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dor crônica inclui grande variedade de condições clínicas bastante heterogêneas, e o sintoma mais comum leva os pacientes a procurar atendimento médico. E por não responder satisfatoriamente aos tratamentos convencionais, novas opções estão sempre sendo estudadas para seu tratamento. Entre as possibilidades atuais, estão uso de canabinóides, um grupo de derivados da *C.sativa*, que já são utilizados para tratamento (ASCENÇÃO et al, 2016).

Conforme estudos, esse principal constituinte da droga (THC), os ligantes endógenos e os canabinóides (CBD), em pacientes oncológicos possuem uma ação analgésica, trazem o aumento do apetite, proporcionam um relaxamento muscular e a redução da insônia (MONTEIRO, 2014).

O uso de canabinóides demonstra ter efeito benéfico e é indicado no tratamento de dores crônicas de diversas etiologias, sendo as mais comuns as dores neuropáticas associadas a diabetes, vírus da imunodeficiência humana (HIV)/AIDS,

epilepsia, parkinson, distúrbios de movimentos, esclerose múltipla, artrite reumatoide severa, fibromialgia. Da mesma forma, no caso de pacientes com dor crônica, o uso de canabinóides trata a dor, melhora o humor e o sono. Também, os pacientes com esclerose múltipla ou dor neurogênica não tratável relataram os benefícios dos canabinóides, incluindo redução da ansiedade, da depressão, bem como dos espasmos musculares e da dor (MONTEIRO, 2014).

Com o progressivo aumento de doenças prolongadas, incuráveis e progressivas conduziram a um aumento significativo do número de doentes despertando interesse terapêutico pela *C.sativa* (RIBEIRO, 2014)

Os agentes canabinóides possuem um considerável papel terapêutico no tratamento da sintomatologia associada às doenças crônicas, devido aos avanços tecnológicos na área da química e da farmacologia. Desse modo foi possível a utilização de canabinóides ativos na medicina, pois permitiram a obtenção destes em sua forma pura, na composição, estabilidade e dose conhecidas (RIBEIRO, 2014).

### 3.1 CANABINÓIDES EM EPILEPSIA

A epilepsia é desordem crônica cerebral, que pode acontecer em qualquer parte do cérebro e causar mudança de comportamento, consciência e sensação, caracterizada por episódios recorrentes de disfunção cerebral, resultando em descargas anormais nos neurônios. É o transtorno neurológico mais sério, tendo alta prevalência mundial, estimada entre 0,4 a 2% da população em geral (ALFRADIQUE e VASCONCELOS, 2007).

Epilepsias podem ser provocadas por praticamente qualquer condição que afete o córtex cerebral, é caracterizada por tremores rápidos, irregulares e repetitivos. (Bastos et al., 2009). Um novo tratamento para a doença está ganhando destaque, principalmente pela sua polêmica composição, que é o Canabidiol (CBD), oriundo de um dos componentes da *C. sativa*, que não causa dependência, mas possui grande potencial terapêutico (LIMA, 2015).

O uso do canabidiol em algumas condições neurológicas foi liberado pela ANVISA em 2015, para prescrição médica para o estado de São Paulo pelo CREMESP. Para o uso medicinal por importação para vários casos exige-se a prescrição, laudo médico e termo de responsabilidade (BRUCKI et al., 2015).

O primeiro estudo clínico que demonstrou o efeito anticonvulsivante do canabidiol foi conduzido no Brasil, pelo grupo do renomado pesquisador Dr. Elisaldo Carlini. Esse estudo duplo-cego foi realizado com 15 pacientes que sofriam pelo menos uma crise generalizada por semana, mesmo recebendo algum outro anticonvulsivante (fenitoína,

primidona, clonazepam, carbamazepina). No total, oito pacientes receberam entre 200-300 mg/dia de CBD puro por via oral, durante oito semanas. Destes pacientes, apenas um não obteve nenhuma melhora clínica (CARVALHO et al, 2017).

Entre os demais, quatro tiveram as convulsões totalmente abolidas durante o período em que tomaram CBD e três tiveram redução na frequência das crises. No grupo de pacientes que recebeu placebo junto com seu outro anticonvulsivante, apenas um demonstrou melhora. Entretanto, não há avaliação do efeito do CBD na ausência de qualquer outro anticonvulsivante, mas o estudo sugeriu que o CBD poderia ser um adjuvante no tratamento da epilepsia (CARVALHO et al, 2017).

Dr. Devinsky, na New York University School of Medicine foi autorizado pelo Federal Drug Administration (FDA) a conduzir um estudo aberto com um produto contendo 98% de CBD, cujo nome comercial é Epidiolex fabricado pela GW Pharmaceuticals. De acordo com os resultados dos primeiros 23 pacientes com idade média de 10 anos, 39% dos pacientes tiveram uma redução de 50% de suas crises. Três dos nove pacientes que tinham um tipo de epilepsia muito grave da infância tiveram controle total das crises. Os efeitos colaterais mais comuns foi a sonolência, fadiga, falta ou ganho de peso e diarreia (BRUCKI et al, 2015).

Os dados científicos até o momento permitem concluir que o canabidiol poderá ter um grande papel no tratamento de epilepsias muito difíceis que não respondem a outros tratamentos.

### 3.2 CANABINÓIDES NA ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM)

A Esclerose Múltipla é uma doença do sistema nervoso central, decorrente de processo inflamatório na substância branca, resultando na formação de tecidos cicatriciais, denominados de placas escleróticas, as quais impedem a propagação adequada do impulso nervoso, o que ocasiona perdas permanentes ou transitórias em qualquer função do sistema nervoso central. A doença se caracteriza com sintomas que variam conforme a área afetada, dentre os principais: fraqueza muscular, fadiga, alterações cognitivas, dor, espasticidade, depressão e alterações visuais, esfinterianas e de sensibilidade (CALLEGARO et al, 2009).

A maioria dos pacientes com esclerose múltipla entrevistados nos estudos de auto relato referem problemas com o controle dos sintomas. Aqueles que fumaram *Cannabis* alegaram melhorias na espasticidade noturna e dor muscular (91-98%), no entanto apresentaram depressão, tremor, ansiedade e espasmos no pé. Também podem apresentar parestesia (sensação anormal sobre a pele), fraqueza nas pernas,

dormência no tronco, dor facial, diminuição do equilíbrio, obstipação e perda de memória (ROBSON, 2001).

Em alguns países, o naxibimol é um medicamento indicado no tratamento da espasticidade, pois ele contém THC e CBD, na proporção de 1:1. Este medicamento é exclusivamente de uso oro-bucal (BRUCKI et al., 2015), que demonstraram melhora em seis semanas na escala de auto avaliação. Já na escala objetiva não demonstrou nenhuma melhora.

O extrato de *Cannabis* oral e o THC se mostraram eficazes apenas nas escalas de autoavaliação no uso por até 15 semanas, porém, após um ano os resultados indicaram uma melhora também nas escalas objetivas de mensuração da espasticidade. Estes resultados sugerem que esta opção terapêutica pode ser considerada nos pacientes com EM, embora faltem estudos de segurança com uso por longos períodos.

O Cannador é um fármaco em cápsulas orais que é feito a partir do extrato bruto do THC/canabidiol e foi utilizado em pacientes com alterações da espasticidade na esclerose múltipla (BERLACH et al, 2006).

Sativex é um medicamento produzido a partir do extrato bruto da planta, administrado como um *spray* bucal. Este medicamento tem sido utilizado para o alívio de sintomas relacionados a esclerose múltipla, é formulado a partir de duas linhagens de *C. sativa* nas quais predominam THC e canabidiol (STOTT et al, 2004).

São muitas as evidências científicas que comprovam os efeitos terapêuticos da *Cannabis* e um novo estudo sobre o tema descobriu que o Sativex em *spray*, é uma opção eficaz e segura para combater as formas moderadas e graves de espasticidade causadas pela esclerose múltipla, moderada ou grave e resistentes a outros medicamentos (FLACHENECKER et al, 2014). Não existem indicações da maconha em forma de cigarro para qualquer tipo de Esclerose múltipla.

### 3.3 CANABINÓIDE NA DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa crônica, tendo sua patogenia no sistema nervoso central, sendo causada pela deficiência da dopamina – neurotransmissor, interferindo principalmente no sistema motor (WARE, 2010).

A Doença de Parkinson abrange um grupo de manifestações clínicas caracterizadas pelos tremores e pela perturbação dos movimentos involuntários, que mais acomete os idosos, principalmente homens (LANA et al., 2007).

Segundo estudos realizados em roedores, o CBD tem-se mostrado bastante eficaz no tratamento da Doença de Parkinson, apresentando propriedades antioxidantes e neuroprotetoras (SILVA, 2013).

Estudos preliminares usando o CBD puro para o tratamento da Doença de Parkinson revelaram que os pacientes tiveram um efeito positivo sobre os sintomas psicóticos, o sono e a qualidade de vida. Considera-se que os efeitos colaterais psicopatológicos graves podem chegar a 1%, isso vai depender da proporção de THC presente no tratamento, porém não há relatos de efeitos colaterais graves, e o que pode-se concluir, que apesar da ausência de evidências para indicar o uso da *Cannabis* em pacientes com distúrbios de movimentos, há sinais de que do extrato da planta, em especial o CBD puro, possa minimizar sintomas não motores da Doença de Parkinson, como distúrbio do sono, dor, psicose e talvez a urgência miccional (BRUCKI et al, 2015). Porém esse tratamento só seria indicado em casos que os tratamentos convencionais falharam e a qualidade de vida do paciente esteja muito comprometida.

### 3.4 CANABINÓIDES NO TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA

A Dor Neuropática é definida como dor causada por lesão ou disfunção do sistema nervoso, pode ser dividida em dor neuropática fisiológica, onde há a compressão de nervos, ou dor neuropática patológica que corresponde à destruição de nervos, as principais causas desta síndrome são: *Diabetes mellitus*, neuralgias, dor regional complexa, acidente vascular encefálico, esclerose múltipla, lesão medular, entre outros (TORRANCE et al, 2006).

Estudos avaliaram a eficácia da *Cannabis* no tratamento de dor neuropática. Em um deles foi utilizada a forma spray, como analgesia no tratamento de dor central em pacientes com esclerose múltipla. Em outro estudo foi utilizada forma inalatória, em pacientes com dor neuropática pós-traumática ou pós-cirúrgica, com melhora na intensidade da dor (BRUCKI et al, 2015).

O Sativex também foi utilizado em pacientes com quadro clínico de dor neuropática periférica associada com alodinia e novamente reduziu os níveis de dor (NURMIKKO et al, 2007).

Pacientes com dor neuropática fazem média de 8 a 12 aplicações de spray por dia, consumindo cerca de 2,5 mg (20 a 30 mg por dia) de CBD e 2,7 mg de (22 a 32 mg por dia) THC. No Canadá esse medicamento já é comercializado, onde seu uso já é aprovado (BONFÁ et al, 2008).

O ácido ajulêmico, outro análogo sintético do THC, foi utilizado por Karst et al. em ensaio clínico controlado em pacientes que apresentavam quadro de dor neuropática periférica, demonstrando aparente melhora nos sintomas relacionados a dor (BURSTEIN et al, 2004).



Parece existir evidências de efeitos benéficos dos canabinóides em alterações do sistema nervoso central e periférico, porém, estudos de longo prazo devem ser realizados, pois não se tem eficácia de seu uso a longo prazo. Até o momento o uso do canabidiol é indicado na falha terapêutica dos tratamentos já consagrados ou quando os mesmos apresentam eficácia insuficiente.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos clínicos e pré-clínicos demonstram que substâncias presentes na *Cannabis sativa*, em especial, o canabidiol, apresentam efeitos terapêuticos. A descoberta dos receptores dos canabinóides e o seu papel na homeostasia dos sistemas biológicos contribuíram para a mudança de mentalidades e para a aceitação do THC e seus componentes, dentre os inúmeros estudos. É relevante expor que não existe uma comprovação fática de que o uso da *C. sativa*, cause ou não dependência química.

Apesar de existir ainda muita resistência por parte de organizações médicas tradicionais, alguns países já legalizaram o uso da maconha, Uruguai e Argentina são alguns exemplos na América do Sul, os Estados Unidos, que liderava campanhas para proibição, hoje aceita o uso medicinal em diversos estados e o uso recreativo em pelo menos dois estados.

Em 2015, no Brasil a ANVISA autorizou a importação do CBD, apesar da liberação, o preço elevado da importação torna essa substância inacessível para a maior parte da população. É importante frisar que são escassas as pesquisas que evidenciam os resultados positivos do seu uso terapêutico como um fitoterápico, dificultando a sua inserção para uso terapêutico e novas descobertas científicas relacionadas aos benefícios do uso dessa planta.

Por fim, revela-se a ampla aplicabilidade do CBD no tratamento de algumas doenças crônicas e a importância da realização de estudos e experimentos que permitam ampliar o conhecimento, tanto de sua ação como dos seus efeitos colaterais.

#### REFERÊNCIAS

ALFRADIQUE, Isabel; VASCONCELOS, Marcio Moacyr. **Juvenile myoclonic epilepsy**. Arquivos de neuro-psiquiatria, v. 65, p. 1266-1271, 2007.

ASCENÇÃO MD, LUSTOSA VR, SILVA LJ. **Canabinoides no tratamento da dor crônica**. Rev Med Saúde Brasília, 5(3): 255-63, 2016.

BALLOTA, D.; SOUSA, G. **Cannabis, uma substância sob controle permanente**. Revista Toxicodependências v. 11, n. 1, p. 37-46, 2005.

BASTOS, Mariana Cota et al. **Epilepsia mioclônica juvenil: estudo clínico, epidemiológico, terapêutico e da qualidade de vida.** Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology, v. 15, p. 65-69, 2009.

BERLACH, David M.; SHIR, Yoram; WARE, Mark A. **Experience with the synthetic cannabinoid nabilone in chronic noncancer pain.** Pain medicine, v. 7, n. 1, p. 25-29, 2006.

BONFÁ, Laura; VINAGRE, Ronaldo Contreiras de Oliveira; FIGUEIREDO, Núbia Verçosa de. **Uso de canabinóides na dor crônica e em cuidados paliativos.** Rev Bras Anestesiol, v. 58, n. 3, p. 267-279, 2008.

BRUCKI, Sonia et al. **Cannabinoids in neurology—Brazilian Academy of Neurology.** Arquivos de neuro-psiquiatria, v. 73, p. 371-374, 2015.

BURSTEIN, Sumner H. et al. **Ajulemic acid: a novel cannabinoid produces analgesia without a “high”.** Life sciences, v. 75, n. 12, p. 1513-1522, 2004.

CALLEGARO, D.; LINO, A. M. M.; MARCHIORI, P. E. **Esclerose múltipla e outras doenças desmielinizantes do sistema nervoso central.** Clínica médica. Barueri: Manole, 2009. p. 449-478.

CARVALHO, Cristiane Ribeiro de et al. **Canabinoides e Epilepsia: potencial terapêutico do canabidiol.** VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde, v. 29, n. 1, 2017.

DA SILVA, Thiago Vitarelli. **Avaliação dos efeitos do canabidiol sobre os eventos imunológicos e degenerativos induzidos pela encefalomielite autoimune experimental (EAE) em camundongos.** 2013.

DURAN, Marta; LAPORTE, Joan-Ramon; CAPELLÀ, Dolors. **Novedades sobre las potencialidades terapéuticas del Cannabis y el sistema cannabinoide.** Medicina clínica, v. 122, n. 10, p. 390-398, 2004.

FLACHENECKER, Peter; HENZE, Thomas; ZETTL, Uwe K. **Nabiximols (THC/CBD oromucosal spray, Sativex®) in clinical practice—results of a multicenter, non-interventional study (MOVE 2) in patients with multiple sclerosis spasticity.** European neurology, v. 71, n. 5-6, p. 271-279, 2014.

GROTENHERMEN, Franjo; MÜLLER-VAHL, Kirsten. **The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids.** Deutsches Ärzteblatt International, v. 109, n. 29-30, p. 495, 2012.

RIBEIRO, J.A.C.; **A cannabis e suas aplicações terapêuticas,** 2014.

KALANT, Harold. **Medicinal use of cannabis: history and current status.** Pain Research and Management, v. 6, n. 2, p. 80-91, 2001.

LANA, R. C. et al. **Percepção da qualidade de vida de indivíduos com doença de Parkinson através do PDQ-39.** Brazilian Journal of Physical Therapy, v. 11, p. 397-402, 2007.

LIMA, Andréia Maura Bertoline Rezende **Liberação da importação de produtos à base de canabidiol para uso medicinal e o bem-estar físico, mental e social do paciente no contexto do direito fundamental à saúde e à dignidade da pessoa humana.** São Paulo: PUCSP, 2015. 16 p. Disponível em . Acesso em: 04 out. 2015.

LOPES, Renato José Rodrigues Malcher. **Canabinoides ajudam a desvendar aspectos etiológicos em comum e trazem esperança para o tratamento de autismo e epilepsia.** Rev. Da biologia, v. 13, n 1, p. 43-59, 2014.

MECHOULAM, Raphael; BURSTEIN, Sumner H. **Marijuana: Chemistry, Pharmacology, Metabolism and Clinical Effects. Contributors-SH Burstein [And Others]**. Academic Press, 1973.

NURMIKKO, Turo J. et al. **Sativex successfully treats neuropathic pain characterised by allodynia: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial**. *Pain*<sup>®</sup>, v. 133, n. 1-3, p. 210-220, 2007.

ROBSON, Philip. **Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids**. *The British Journal of Psychiatry*, v. 178, n. 2, p. 107-115, 2001.

STOTT, Colin G.; GUY, Geoffrey W. **Cannabinoids for the pharmaceutical industry**. *Euphytica*, v. 140, n. 1-2, p. 83-93, 2004.

TORRANCE, Nicola et al. **The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey**. *The Journal of Pain*, v. 7, n. 4, p. 281-289, 2006.

WARE, Mark A. et al. **Smoked cannabis for chronic neuropathic pain: a randomized controlled trial**. *Cmaj*, v. 182, n. 14, p. E694-E701, 2010.

## CAPÍTULO 8

### “PREVALENCIA DE CHAGAS MAZZA EN MUJERES EN EDAD FÉRTIL EN EL CAPS DE LA CAÑADA” LA RIOJA. ARGENTINA

Data de submissão: 27/12/2022

Data de aceite: 17/01/2023

#### Jesica Elizabeth Morey Herrera<sup>1</sup>

Educación académica superior:  
Bioquímica otorgado por la  
Universidad Nacional de La Rioja  
Argentina

#### Heliana Hebe Valdez<sup>1</sup>

Educación académica superior:  
Bioquímica otorgado por la  
Universidad Nacional de La Rioja  
Argentina

#### María José Cabral<sup>1</sup>

Educación académica superior:  
Bioquímica otorgado por  
Universidad Nacional de Córdoba  
Especialista en Inmunología  
otorgado por Universidad Nacional  
de Córdoba, Argentina

**RESUMEN:** La enfermedad de Chagas es endémica en Latinoamérica abarcando desde el sur de Estados Unidos hasta la región sur de Argentina. Este proyecto se efectuó en 2 etapas diferentes. En la primera etapa

<sup>1</sup> Institución actual: Laboratorio de Biología Molecular de la Provincia de La Rioja. Hospital Escuela y de Clínicas “Virgen María de Fátima”. Dirección completa (institucional): Av. Luis Vernet S/N Av. Ortiz de Ocampo 1700.

se trató de un estudio de corte transversal que implicó en un trabajo de campo en los barrios que nuclea el Centro de Atención Primaria de la Salud (Caps.) de La Cañada. En el que se escogió al azar 112 mujeres comprendidas entre 15 y 35 años. Obteniendo una prevalencia de la enfermedad del 7%. Del total de las encuestada el 57%(n=64) no tenía conocimiento sobre la enfermedad ni sobre el diagnóstico de la misma. En la segunda etapa se revisaron las historias clínicas desde el año 2017 al 2022, de mujeres que concurren a un hospital de tercer nivel que residían en el área de estudio y tenía serología para Chagas. Lo que nos permitió observar el descenso de la prevalencia desde 5% a 1% desde 2017 a 2021. En el 2022 la prevalencia aumenta al 2 %, en relación al año anterior. Es importante tener en cuenta no solo el diagnóstico de laboratorio requerido en contextos determinados y puntuales nos van a permitir identificar la enfermedad de Chagas; sino también tener en cuenta aquellos factores que incrementen la posibilidad de adquisición de la misma como lo son el escenario ambiental, los antecedentes familiares y el lugar de procedencia. Estos elementos nos van a permitir sospechar la enfermedad y ofrecer como agentes de salud la detección del T. cruzi en población más vulnerable y evitar complicaciones en la mujer a largo plazo como así también disminuir el riesgo en futuros embarazos.

**PALABRAS CLAVES:** Enfermedad de Chagas. Mujeres en edad fértil. Trypanosoma cruzi.

## 1 INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el *Trypanosoma cruzi*, esta es transmitida de manera vectorial por una chinche hematófaga denominada *Triatoma infestans*. La localización de este vector en el mapa corresponde con el mapa de la pobreza en América.

La enfermedad de Chagas es endémica en Latinoamérica abarcando desde el sur de Estados Unidos hasta la región sur de Argentina. A nivel mundial se ha estimado que existen aproximadamente 10 millones de personas infectadas y más de 80 millones se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad. Según datos de la ONU, en Latinoamérica, la incidencia calculada es de 40 mil nuevos casos por año y alrededor de 12.500 personas infectadas mueren anualmente como consecuencia de la enfermedad. (2-4-12).

El hábitat del insecto transmisor es principalmente los techos de paja y las grietas de las paredes de las viviendas precarias. A estas condiciones habitacionales se les suma la falta de higiene y el escaso conocimiento sobre la enfermedad por parte de la población. (10-1-2-3-14-19-20).

El diagnóstico oportuno de Chagas permitiría mejorar la calidad de vida de las personas que viven en los barrios que nuclea el CAPS de la Cañada, conocer la prevalencia de este centro de salud y a futuro prevenir la transmisión vertical de la enfermedad.

## 2 METODOS

Este estudio se efectuó en 2 etapas diferentes. En la primera etapa se realizó un estudio de corte transversal en 13 barrios nucleados por el Centro de Atención Primaria de la Salud (Casp.) de La Cañada ubicado en la zona sur de la ciudad Capital de la Rioja. Dicha región, según la ronda N° 70 del Ministerio de Salud de la Provincia de La Rioja, en el año 2016 presentaba viviendas con paredes de adobe 0.5%; madera 0.5% y 7.7% cartón y madera, y techos de madera 0.5% quinchos 0.2% y cartón y plástico 0.5%, lo que hace de este sector un lugar propicio y con factores de riesgo para contraer la enfermedad.

En esta primera etapa, la población en estudio fueron 112 mujeres con rango etario entre 15 a 35 años seleccionadas al azar que viven en la zona de La Cañada. Se les realizó extracción de sangre por punción venosa para posterior obtención de suero, donde se investigó la presencia de anticuerpos anti-T.cruzi por 2 métodos diferentes: Ensayo por Inmunoabsorción ligado a Enzimas (ELISA) de tercera generación y Hemaglutinación Indirecta (HAI). Ambas pruebas deben resultar reactivas para considerar positiva a la paciente. Aquellas en las que alguna de las 2 pruebas resultara no conclusiva o no fueran

concordantes, se dispuso de un tercer método, Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), para resolver dicha discordancia.

Conjuntamente se les pidió llenar una encuesta con datos sobre antecedentes personales y familiares, conocimiento sobre la enfermedad y condiciones relacionadas con la enfermedad como así también sobre las características de vivienda, de viaje o antecedente de residencia en zonas endémicas en los últimos 10 años.

En la segunda etapa se realizó un trabajo retrospectivo en la cual se estudiaron las historias clínicas de las mujeres comprendidas entre 15 y 35 años que vivían en zona de La Cañada y que concurrieron a un hospital de tercer nivel durante los años 2017 al 2022 para realizarse las pruebas de serología para Chagas. Como criterio de inclusión conjuntamente con la edad debían tener realizada 2 técnicas para la detección de Chagas y en caso de indeterminado o discordancia una tercera técnica para resolver la discordancia. Con el fin de relevar la prevalencia de Chagas en dicho centro en el transcurso de los años.

### 3 RESULTADOS

En la primera etapa se localizó 112 mujeres comprendidas entre 15 y 35 años con una edad media de 25 años. Analizando la prevalencia de la enfermedad (Gráfico N°1) se observa que el 7% (n= 8) de las mujeres que participaron del estudio fueron reactivas para anticuerpos anti-T. cruzi por los métodos de ELISA y HAI. No se presentaron discordancia, por lo que no fue necesario el tercer método.

El 75% (n=6) de las pacientes con resultado positivo para Chagas, tenían antecedentes de haber residido en los últimos 10 años en Bolivia y 25% (n=2) en la provincia de La Rioja (Gráfico N°2). En cuanto a las mujeres con resultado negativo 88.4% (n=92) habían residido en la Provincia de la Rioja, 5.7% (n=6) había residido en Bolivia y, 5.7% (n=6) en otras provincias de Argentina como Catamarca, Jujuy, San Luis y Buenos Aires.

Del total de las encuestadas el 57% (n=64) no tenía conocimiento sobre la enfermedad ni sobre el diagnóstico de la misma. En relación a haberse realizado previamente el ensayo para diagnóstico de Chagas, solo el 46% (n=52) se había realizado el estudio, de las cuales 26,9% (n=14), se lo realizó durante embarazos previos (Gráfico N°3). De las pacientes que no se realizaron nunca el estudio, el 40% (n=24) tuvieron embarazos previos en las que no se le solicitó ni se les ofreció el diagnóstico de Chagas.

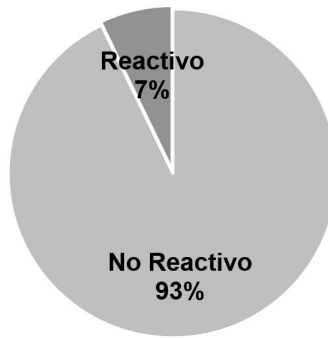


Gráfico N°1: Prevalencia de Chagas en Caps de la Cañada . Año2017.  
Fuente: Elaboración Propia.

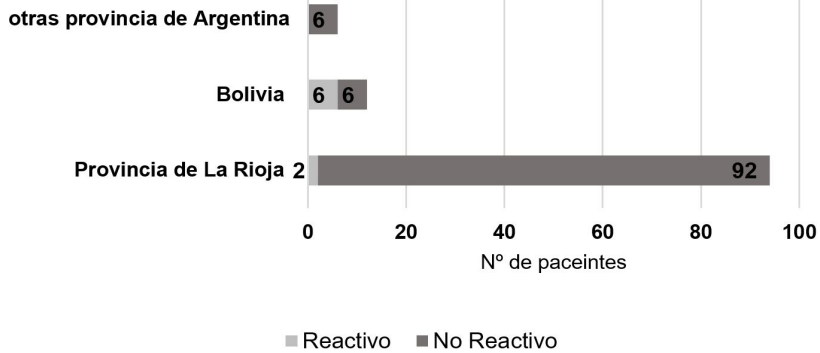


Gráfico N°2: Resultado de serología para Chagas vs. Lugar de Residencia en los últimos 10 años.  
Fuente: Elaboración Propia.

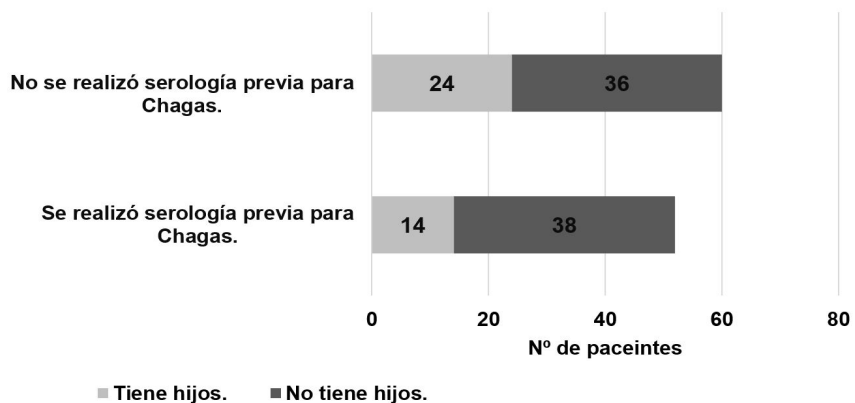
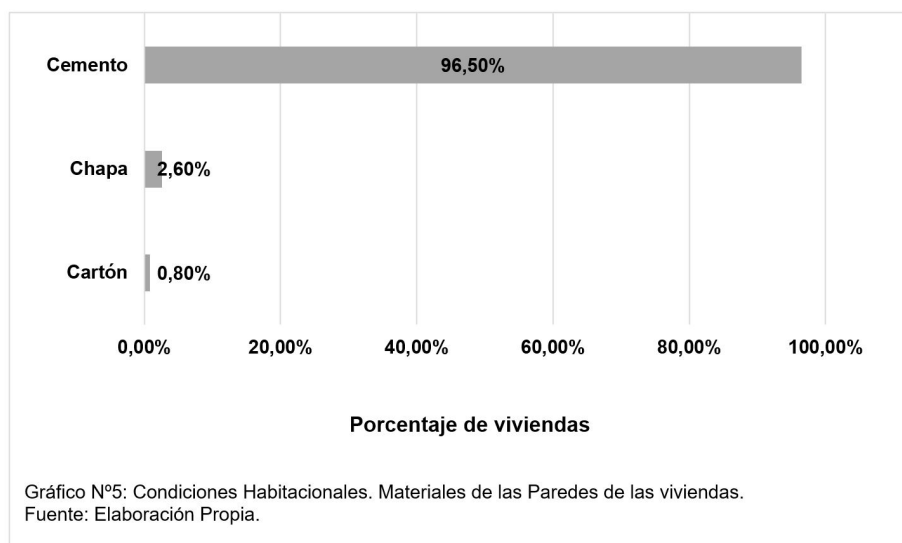
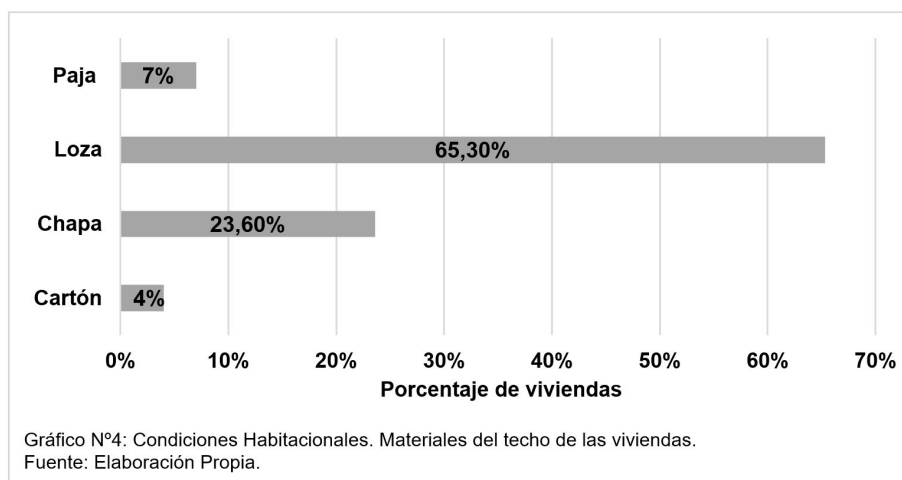


Gráfico N°3: Relación entre embarazos previos vs. realización de serología para Chagas.  
Fuente: Elaboración Propia.

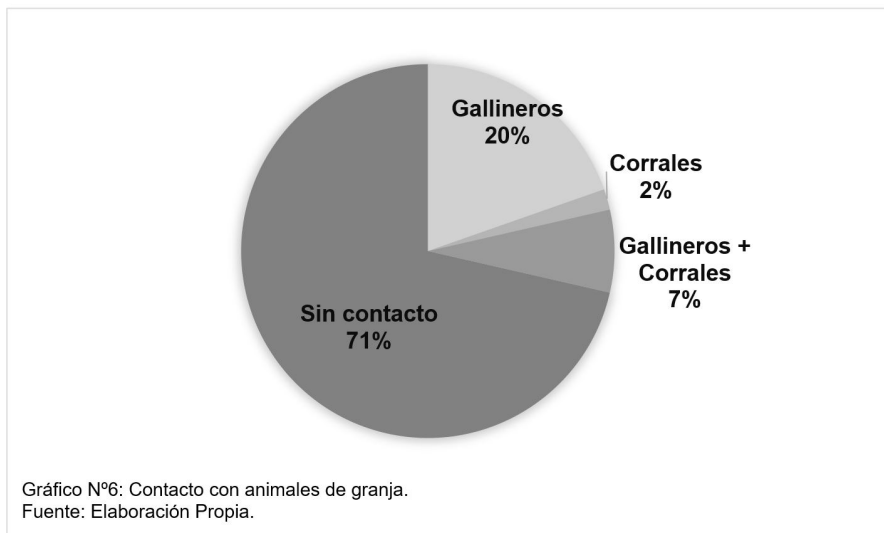
Al estudiar los antecedentes familiares, 2,6% (n=3) tiene antecedente de madre con serología positiva para anticuerpos anti-T.cruzi, el 16,9% (n=19) tiene otro familiar directo con enfermedad de Chagas y el 80% (n=90) restante no presenta antecedentes familiares. Del total de los pacientes con antecedentes familiares positivos para Chagas; el 50% se realizó la prueba para su detección.

En cuanto a las condiciones habitacionales que podrían favorecer la adquisición de la enfermedad, se observó que el 23,6% (n=30) presentaba techo de chapa, 7% (n=9) techo de paja, 4% (n=5) techo de cartón y el 65,30% (n=83) tenía techo de loza. (Gráfico N°4). Del total de viviendas el 0,8% (n=1) de las paredes eran de cartón, 2,6% (n=3) de chapa y 96,5% (n=109) revestimiento de cemento y de esto el 20% (n=17) presentaban deterioro o rasgaduras de las paredes. (Gráfico N°5)



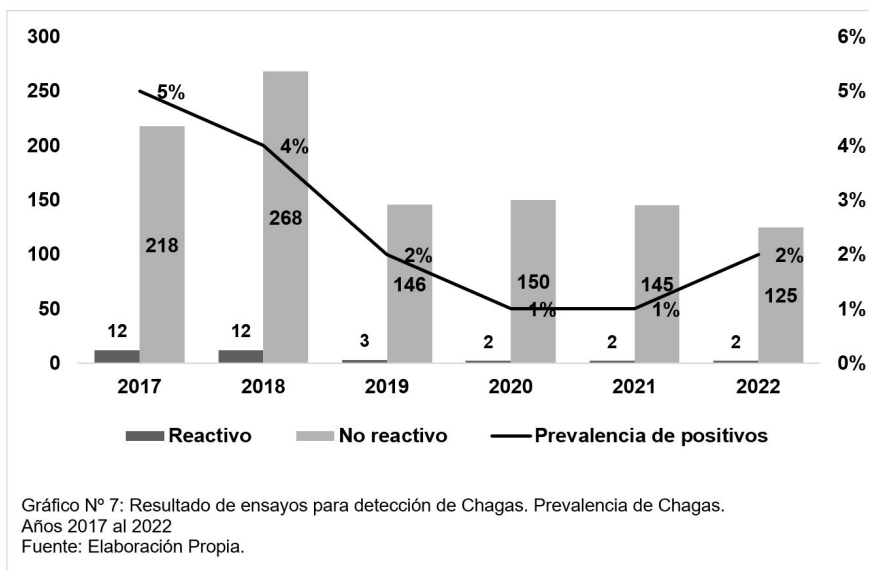


En referencia a el contacto con animales de granja el 20% (n=22) de las encuestadas están en contacto con gallineros, 7% (n=8) gallineros y corrales, y un 2% (n=2) contacto solo con corrales, el restante 71% (n=80) no tiene contacto con animales de granja. (Gráfico N° 6)



En la segunda etapa se realizó un relevamiento de 1386 Historias clínicas de pacientes con rango etario de 15 a 35 años que concurrieron a un hospital de tercer nivel para realizarse serología para anticuerpos anti-T.cruzi que se domiciliaban en los barrios que concentra el Caps. de La Cañada. Se excluyeron 78 pacientes por no cumplir con los criterios de inclusión, tener 2 pruebas serológicas para diagnóstico de Chagas.

Del total de historias clínicas valoradas, el 3% (n=33) fue reactiva para Chagas. Evaluando los diferentes años desde 2017 a 2022. Obtenemos un menor número de mujeres testeadas de 2019 en adelante con respecto a 2017 y 2018. También observamos una disminución de casos positivos lo que implica una disminución de la prevalencia de la enfermedad hasta 2021. (Gráfico N° 7) En 2022 aumenta nuevamente la prevalencia de positivos con respecto al año anterior.



En relación con las pacientes positivas a lo largo de estos 6 años, el 75% (n=25) tuvieron 1 o más hijos en el hospital. Por lo cual se accedió a la historia clínica de estos.

Se les realizó técnica de Strout a todos los niños (n=30) nacidos de madres positivas al momento del nacimiento, y a los 15 días posteriores del nacimiento, resultando todos negativos. De estos niños el 30% (n=9) se les realizó un control posterior de serología para anticuerpos anti-T.cruzi, resultando positivo el 22% (n=2). Mediante el sistema de registro que dispone el hospital no se tiene notificación de seguimiento posterior ni de tratamiento.

#### 4 CONCLUSIONES

El trabajo incluyó mujeres de entre 15 y 35 años, debido a que es la edad fértil de la mujer y de mayor riesgo de transmitir la enfermedad de forma vertical a los recién nacidos. La prevalencia de Chagas en el Caps. de La Cañada en la primera etapa del trabajo fue del 7%, este valor se encuentra por encima de la media Nacional de acuerdo a las diferentes bibliografías consultadas.

Es importante destacar que más del 50% de la población estudiada, no tiene conocimiento de la enfermedad y 54% no se había realizado anteriormente la prueba para diagnóstico, y de ellas el 40% tuvo embarazos previos. Lo que sugiere el poco conocimiento de la enfermedad y la insuficiente divulgación sobre el diagnóstico.

En cuanto al lugar de residencia en los últimos 10 años es importante destacar que el 10% de las mujeres encuestadas provenían de Bolivia, y de ellas, el 50% fueron

serología positiva para Chagas. Lo que es un dato nada menor dado que el país limítrofe tiene una alta prevalencia según bibliografía consultada. Por lo que el lugar de residencia y procedencia del paciente podría ser un punto clave característico a la hora de la sospecha y anamnesis del paciente.

Los antecedentes familiares es otro punto importante a la hora de indagar al paciente, en nuestra población en estudio, el 2.8% de las mujeres encuestadas tenían madres Chagásicas.

La transmisión vectorial esta favorecido por las condiciones habitacionales y en este sector, es un factor que contribuye a la posibilidad de contraer la enfermedad, dado que en esta población, los techos de chapa y paja representan el 30% de los techos de las viviendas y el contacto con gallineros y corrales representan el 29% de las encuestadas.

Teniendo en cuenta la segunda parte del trabajo podemos concluir que, a través de las historias clínicas, la prevalencia de Chagas desciende desde 2017 hasta 2021 desde un 5% a un 1%. En él años 2022 la prevalencia aumenta en relación al año anterior. Cabe destacar que los años 2020 y 2021 estuvieron sesgados de cierta manera por la pandemia y el acceso a la salud de este periodo.

En esta segunda etapa al revisar las historias clínicas de los niños hijos de madres con serología positiva vemos el insuficiente conocimiento sobre seguimiento y posterior control de los niños. Este dato esta sesgado dado que diversos pacientes y sus respectivas madres son derivados a un centro de referencia para confirmación, seguimiento y tratamiento y los sistemas de gestión hospitalarias no son compatibles entre sí.

Es importante tener en cuenta no solo el diagnóstico de laboratorio requerido en contextos determinados y puntuales nos van a permitir identificar la enfermedad de Chagas; sino también tener en cuenta aquellos factores que incrementen la posibilidad de adquisición de la misma como lo son el escenario ambiental, los antecedentes familiares y el lugar de procedencia. Estos elementos nos van a permitir sospechar la enfermedad y ofrecer como agentes de salud la detección del T. cruzi en población más vulnerable y evitar complicaciones en la mujer a largo plazo como así también disminuir el riesgo en futuros embarazos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Campos E. et al.; Confirmación diagnóstica del tamizaje de la enfermedad de chagas en Costa Rica: Revista costar salud publica 2013; 22:4-8.
2. Caraborin A. et al.; Enfermedad de chagas: una enfermedad olvidada: Elementos 2011; 84:5-11.

3. Carrada T. et al.; Trypanosoma Cruzi: historia natural y diagnóstico de la enfermedad: Revista mexicana de patología clínica 2004; 51:205-219.
4. Coura J. et al.; Chagas una enfermedad que no podemos olvidar: Is global instituto de salud global Barcelona 2009; 104:31-40.
5. Cucunuba Z. et al.; Primer consenso colombiano sobre chagas congénito y orientación científica a mujeres en edad fértil con diagnóstico de chagas: Revista de la asociación colombiana de infectología 2012; 16:5-20.
6. Dirección General de estadística y sistema de información: censo población de hogares y viviendas La Rioja 2008-2009.
7. Genero S. et al.; Trasmisión congénita en el departamento de San Fernando; provincia de Chaco: Revista argentina de salud pública 2012; 3:19-23.
8. Maratol L. et al.; Mal de chagas la enfermedad de la pobreza: RMC 2006; 2:66-73.
9. Merino F. et al.; Control de la infección por Trypanosoma cruzi / enfermedad de chagas en gestantes latinoamericanas y sus hijos: Revista Española Quimioter 2013; 26:253-260.
10. Murcia L. et al.; Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de chagas: Enfermedades infecciosas y microbiológicas clínicas 2013; 31:26-34.
11. Oschero E. et al.; Epidemiología de la enfermedad de chagas departamento general paz; argentina: Revista saude publica 2003; 37: 59-64.
12. Pesce H. et al.; Clínica de la enfermedad de chagas: Anales de la facultad de medicina 2088; 90:39-44.
13. Roberto Ch. et al.; El control de enfermedades de chagas en argentina. Sus resultados: Revista Federación Argentina de Cardiología 2012; 41:1151-1155.
14. Ruiz B. et al.; Prevalencia de la enfermedad de chagas en un hospital perinatólogo: Revista hospital infantil Ramón Sorda 1997; 16:57-59.
15. Russomado G. Et al.; Trasmisión congénita de la enfermedad de chagas en el Paraguay: men.int. investig.cienc.salud 2009; 72:55-64.
16. Salazar P. et al.; Presentación de dos casos de enfermedad de chagas aguda en México: Gaceta médica México 2011; 147:63-69
17. Sanmartino M. et al.; Conocimiento sobre la enfermedad de chagas y factores de riesgo en comunidades epidemiológicas diferentes de la Argentina: Revista panam salud publica 2000; 7:173-180.
18. Sociedad Argentina de Cardiología; Consenso de enfermedad de chagas Mazza: Revista argentina de cardiología 2011; 2011:55-564.
19. Villa L. et al.; Resultados del tratamiento de la enfermedad de chagas en menores de 15 años en el proyecto medico sin frontera en Tarija (Bolivia): Revista de pediatría de atención primaria 2005; 7:61-76.
20. Wener B. et al.; Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de chagas: Revista chilena de infectología 2008; 25:384-389.

# CAPÍTULO 9

## EL TIPO DE MALTA IMPACTA EN EL PERFIL Y ACTIVIDAD DE PROTEASAS<sup>1</sup>

Data de submissão: 30/01/2023

Data de aceite: 17/01/2023

### **Claudia Berenice López-Alvarado**

Instituto de Biotecnología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
San Nicolás de los Garza  
Nuevo León, México  
ORCID: 0000-0002-9797-0120

### **Jessica Giselle Herrera-Gamboa**

Instituto de Biotecnología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
San Nicolás de los Garza  
Nuevo León, México  
ORCID: 0000-0002-1524-7386

### **Jorge Hugo García-García**

Instituto de Biotecnología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
San Nicolás de los Garza  
Nuevo León, México  
ORCID: 0000-0001-8758-9919

<sup>1</sup> FUENTE DE FINANCIAMIENTO: Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo financiero a través del proyecto apoyado por el Programa de Estímulos a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación. CB. López-Alvarado y JG. Herrera-Gamboa recibieron becas CONACYT.

### **César Ignacio Hernández-Vásquez**

Instituto de Biotecnología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
San Nicolás de los Garza  
Nuevo León, México  
ORCID: 0000-0002-2067-1122

### **Esmeralda Pérez-Ortega**

Laboratorio de Investigación y  
Desarrollo, Cervecería Cuauhtémoc  
Moctezuma S. A de C. V.  
Monterrey, Nuevo León, México

### **Luis Cástulo Damas-Buenrostro**

Laboratorio de Investigación y  
Desarrollo, Cervecería Cuauhtémoc  
Moctezuma S. A de C. V.  
Monterrey, Nuevo León, México

### **Benito Pereyra-Alfárez<sup>2</sup>**

Instituto de Biotecnología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
San Nicolás de los Garza  
Nuevo León, México  
ORCID: 0000-0002-3726-0389

**RESUMEN:** La cebada malteada representa el principal componente del mosto cervecero y las enzimas proteasas juegan un papel fundamental en la calidad. Fue comparada la actividad proteolítica en cebadas malteadas,

<sup>2</sup> Autor correspondiente.

cultivadas bajo condición de riego (D1) y temporal (D3). La mayor actividad proteolítica se presentó a pH 7.0 (26.5 UAE/mg) para D1 y pH 5.0 (22.7 UAE/mg) para D3. Entre las proteasas observadas, sobresale una metaloproteínasa ca. 150 kDa en D1, mientras que D3 presentó una cisteinil proteasa ca. 37 kDa. El análisis de los mostos reveló mayor concentración de FAN (350 mg/L) y proteína soluble (700 mg/L) para D1 contra 273 mg/L de FAN y 400 mg/L de proteína para D3. La concentración de dimetil sulfuro (DMS) total fue de 172 ppb y 63 ppb para D1 y D3, respectivamente. Estos datos correlacionan con la cantidad (ppm) y perfil de aminoácidos, especialmente de ácido aspártico (5.13) y metionina (2.84) en D1 contra 4.17 y 2.02 en D3. Con respecto a los azúcares fermentables, D3 tuvo mayor porcentaje (p/p) de maltosa (6.1%), maltotriosa (1.3%) y fructosa (0.2%). La malta D3 proporciona mejores características al mosto.

**PALABRAS CLAVE:** Cebada malteada. Zimogramas. Hidrolasas. Calidad de la malta.

## DIFFERENT TYPES OF MALT IMPACT ON THE PROFILE AND ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES

**ABSTRACT:** Malted barley represents the main component of the brewing wort. The proteolytic and diastatic activity of the malted barley cultivated under irrigation (D1) and rainy (D3) conditions was compared. The highest proteolytic activity was obtained at pH 7.0 (26.5 EAU/mg) for D1 and pH 5.0 (22.7 UAE/mg) for D3. The proteases included a metalloproteinase with a molecular weight of ~150 kDa and an amylase of ~20 kDa. D3 contained a cysteinyl protease of ~37 kDa and two amylases of ~30-35 kDa. The analysis of the wort revealed higher free amino nitrogen (FAN) (350 mg/L) and soluble protein (700 mg/L) concentrations in D1 compared to 273 mg/L of FAN and 400 mg/L of protein in D3. The total dimethyl sulfide concentration was 172 ppb and 63 ppb in D1 and D3, respectively. These data correlate with the quantity and profile of amino acids, particularly aspartic acid (5.13 ppm) and methionine (2.84 ppm) in D1 compared with 4.17 ppm and 2.02 ppm in D3. The best diastatic activity occurred at pH 5.0-7.0 in both malts. Regarding the fermentable sugars, D3 had a higher percentage (w/w) of maltose (6.1%), maltotriose (1.3%) and fructose (0.2%). Malt D3 has better quality characteristics for beer production.

**KEYWORDS:** Malted barley. Zymograms. Hydrolases. Malt quality.

## 1 INTRODUCCIÓN

La cebada (*Hordeum vulgare*) es uno de los cereales más cultivados en el mundo y es ampliamente utilizado para las industrias de alimentos y bebidas (Guo et al., 2016). La cebada tiene el potencial de modificar las proteínas del endospermo, para adaptar su metabolismo y contenido enzimático (Wang et al., 2004). Esto le permite tener una gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales y de estrés biótico y abiótico, como son la limitación de agua y suelos salinos (Ouda y Gaballah, 2007). En México, la cebada es producida en dos ciclos de cultivo: primavera-verano (temporal) y otoño-invierno (riego). Actualmente, seis variedades corresponden a más del 70% de la producción total anual y son destinadas a la industria cervecera por su alta calidad:

Armida, Adabella, Esmeralda, Alina, Esperanza y Doña Josefa (Fernández, 2013). En la industria cervecera, la cebada es el principal ingrediente para la preparación del mosto fermentable y sus características bioquímicas estarán relacionadas con la calidad de la cerveza. La cebada antes de ser utilizada en el proceso cervecero debe ser sometida a un proceso de malteado, con el fin de activar las enzimas necesarias para transformar proteínas y almidones del endospermo, en nutrientes para la levadura. Las proteínas, almidones y enzimas en el grano de malta definirán la calidad de la malta y de la cerveza final, y dependerán de la variedad de cebada, condiciones de cultivo y proceso de malteado (Fang et al., 2019). Las proteasas de la malta determinan el tipo y concentración de aminoácidos en el mosto. Estos, serán metabolizados por la levadura, definiendo los sabores y olores en la cerveza. Las enzimas tienen un impacto en el desarrollo de métodos de malteo, durante el proceso se generan cuatro endoproteasas estables a 38 °C e inactivadas a 72°C. La actividad proteolítica está involucrada en los niveles de FAN (amino nitrógeno libre), mejoran la extracción de los azúcares fermentables al degradar las proteínas inhibitoras de la dextrinasa limitante y la  $\beta$ -amilasa (Hu et al., 2014). Actividades de tipo serino proteasas y aminopeptidasas pueden estar relacionadas a la generación de proteínas activas formadoras de turbidez (Jones, 2001). Diversos autores han diferenciado y comparado variedades de cebada malteada empleando zimogramas, con el fin de estudiar los perfiles enzimáticos y caracterizando bioquímicamente los sistemas hidrolíticos para encontrar enzimas que sirvan como marcadores de calidad de la cebada malteada (Wrobel y Jones, 1992). La obtención de un marcador de calidad podría ahorrarle a la industria cervecera una cantidad sustancial por año. La identificación de las enzimas presentes en la malta y el estudio bioquímico de su actividad (niveles de pH, temperatura, tiempo, etc.) podría dar la información necesaria para que los cerveceros ajusten de manera eficiente sus procesos, evitando operaciones innecesarias de acuerdo con el tipo de materia prima utilizada (López et al., 2016). En el presente estudio, se compararon bioquímicamente los perfiles hidrolíticos de dos cebadas malteadas del mismo genotipo, cultivadas bajo diferentes condiciones de riego, con el propósito de analizar diferencias entre condiciones y su relación con los parámetros de calidad del mosto y la cerveza.

## 2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS

Fueron evaluadas dos cebadas malteadas (*Hordeum vulgare* L.) del mismo genotipo (nombradas como D1 y D3 respectivamente) cultivadas bajo diferentes condiciones de cultivo, las cuales fueron proporcionadas por Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma

(CCM), México. Las muestras fueron almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Adicionalmente, fue utilizada la malta comercial 2-ROW como control, obtenida de la empresa Malteurop (Milwaukee, WI, USA).

## 2.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Las muestras de malta (10 g) fueron molidas hasta un polvo fino ( $<50\text{ }\mu\text{m}$ ) usando un molino de marca Foss Cyclotec 1093. Las proteínas fueron extraídas con buffer de extracción (Tris-HCl 25 mM;  $\text{MgCl}_2$  5 mM pH 7.5), según lo reportado por López et al. (2016). La concentración de proteína soluble total se determinó mediante el método de Bradford.

## 2.3 EFECTO DEL PH EN LAS HIDROLASAS PRESENTES EN LA CEBADA MALTEADA

La evaluación del efecto del pH sobre la actividad enzimática tipo amilasa fue realizada en microplaca de 96 pozos de acuerdo con la metodología descrita por Oliveira et al. (2019), con algunas modificaciones. Las pruebas fueron realizadas bajo diferentes condiciones de pH utilizando buffer de acetato de sodio 0.05 M (pH 3.0, 4.0 y 5.0) y buffer de fosfato de sodio 0.1 M (pH 6.0, 7.0 y 9.0). En cada pozo fueron colocados: 20  $\mu\text{l}$  de cada buffer a sus respectivos niveles de pH, 10  $\mu\text{l}$  de solución de almidón de papa al 0.2 % y 10  $\mu\text{l}$  de cada muestra. La microplaca fue incubada a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Terminado el tiempo de incubación, fueron añadidos 30  $\mu\text{l}$  de la solución de Lugol a una dilución 1:10 y 170  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada. Finalmente, la microplaca fue leída a 595 nm. El efecto del pH en la actividad de proteasa fue realizada de acuerdo con la metodología descrita por Secades y Guijarro (1999) con algunas modificaciones. Para este ensayo fue empleada azocaseína 1.0 % como sustrato disuelta en buffer Tris-HCl 25 mM con  $\text{MgCl}_2$  5mM en un rango de pH de 3.0 a 11.0. A 60  $\mu\text{l}$  de cada muestra de malta fueron agregados 240  $\mu\text{l}$  de azocaseína 1.0 %, mezclados por vórtex e incubadas a  $40^{\circ}\text{C}$  por 30 min. La reacción fue detenida con 300  $\mu\text{l}$  de TCA 10 %, incubado en hielo por 30 min y centrifugación a 15,000 g por 10min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pasado el tiempo fueron tomados 400  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y fueron neutralizados con 100  $\mu\text{l}$  de NaOH 1.8 N. Finalmente, se leyó la absorbancia a 420 nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad que produjo un aumento en A420 de 0.01 en 30 min a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se realizaron triplicados biológicos para todas las pruebas.

## 2.4 ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

La actividad enzimática fue evaluada mediante zimogramas de una dimensión como lo describen Herrera et al. (2018) y López et al. (2016) con algunas modificaciones.



En resumen, las muestras fueron ajustadas a 100 µg/µl de proteína total soluble y mezcladas con el buffer de corrida (125 mM Tris-HCl pH 6.8, glicerol 24 % [v/v], 0.02% [w/v] azul de bromofenol y 1 % SDS), la separación se realizó en geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones reductoras (1 % SDS) copolimerizado con 0.1 % [p/v] de gelatina (actividad proteasa) (Sigma, San Luis, Misuri, USA). Los geles fueron corridos a 50 voltios y 4 °C hasta que el frente del azul de bromofenol alcanzó el límite inferior del gel. Para la actividad de proteasas, las proteínas fueron renaturalizadas incubando los geles en agitación moderada durante 40 min en solución de tritón X-100 al 2.5 %. Posteriormente, los geles fueron lavados con agua bidestilada para quitar el exceso de tritón. Para la activación de las enzimas de tipo proteasas, los geles fueron incubados durante toda la noche a 40 °C en buffer Tris-HCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM en un rango de pH de 4.0 a 7.5. Para estos ensayos empleamos enzimas comerciales como control: tripsina de páncreas bovino (Cas. T1426) y bromelina de tallo de piña (Cas. B4882). Las enzimas fueron adquiridas de la compañía Sigma, San Luis, Misuri, (USA). Posteriormente, fueron realizados ensayos de inducción, para esto se empleó una concentración de proteína soluble de 200 µg/µl, suplementada con ácido giberélico a 10 µM e incubadas por 96 h a 4 °C (Koehler y Ho, (1988)). Después, 20 µl de volumen final de la reacción fueron combinados con buffer de corrida y corridos en zimogramas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. La actividad de proteasa fue revelada con tinción de azul brillante de Coomassie R250, fue observada por las bandas claras sobre el fondo del gel. Todos los zimogramas se realizaron por triplicado.

## 2.5 ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE MOSTOS 100 % CEBADA MALTEADA

Los mostos (mosto D1 y mosto D3) fueron preparados en el laboratorio de acuerdo con *limure et al.* (2012); 50 g de cebada malteada (malta D1 y malta D3) fueron mezclados con 200 ml de agua bidestilada desionizada. La mezcla se calentó a 45 °C por 30 min. Después la temperatura se incrementó a 70 °C (1 °C/min) y se agregaron 100 ml de agua bidestilada desionizada e incubada a 70 °C por 60 min. Finalmente, el mosto fue enfriado hasta temperatura ambiente (22 °C), filtrado y ebulldido durante 15 min. En cada cambio de temperatura, 5 ml de mosto fueron tomados y almacenados a -20 °C para su posterior análisis. La evaluación de los parámetros fue realizada siguiendo los métodos analíticos oficiales de la American Society of Brewing Chemists (Métodos de análisis ASBC) por el laboratorio de CCM. Las muestras de cada mosto fueron tomadas en condiciones asépticas.

### 2.5.1 Nitrógeno amino libre (FAN)

Fue utilizado el método colorimétrico de ninhidrina para determinar la cantidad de FAN en el mosto. (Método de Wort-12). Los mostos (1 ml) se diluyeron a 100 ml con agua destilada y 2 ml de la dilución fueron transferidos a tubos de ensayo por triplicado. Después, se añadió 1 ml de reactivo de ninhidrina ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.8 mM, ninhidrina 0.3 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.4 mM, pH 6.6 – 6.8) a cada muestra y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 16 minutos. La reacción se dejó enfriar durante 20 min en un baño de agua a 20 °C. Posteriormente, fueron añadidos 5 ml de la solución de dilución ( $\text{KIO}_3$  9.4 mM, etanol al 38.4 %) a cada muestra. Después de mezclar bien la reacción, la absorbancia es medida a 570 nm contra agua bidestilada. Fue utilizada solución de glicina 0.14 mM como solución estándar. Para los cálculos se utilizó la siguiente fórmula:  $\text{FAN (mg/ml)} = (\text{absorbancia neta de la solución de prueba} / \text{absorbancia neta de la solución estándar}) \times 2 \times \text{dilución}$ .

### 2.5.2 Determinación de azúcares en el mosto

Las muestras de mosto fueron analizadas por HPLC Agilent 1100 con detección ELSD. El solvente de HPLC fue 75 % de acetonitrilo en agua, a una tasa de flujo de 1 ml/min utilizando una columna de hidratos de carbono de Alltech de 4.6 mm × 250 mm. El ELSD se ajustó a un caudal de nitrógeno de 2 ml/min (a 87 ° DO). Las mediciones fueron realizadas por duplicado.

### 2.5.3 Color

El color fue determinado siguiendo el método Beer-10. 100 ml de volumen final de mosto es filtrado y mezclado con 5 g de tierra de diatomeas grado analítico. Se deja reposar por 5 min y se filtra nuevamente para clarificar completamente el mosto. La absorbancia se mide a 430 nm en una cubeta de espectrofotómetro (1/2 in.). El color es calculado por la fórmula:  $\text{Color} = 10 (\text{Absorbancia en } \frac{1}{2} \text{ cubeta a } 430 \text{ nm})$ .

### 2.5.4 pH

La concentración de iones hidrógeno se mide empleando un potenciómetro a temperatura ambiente.

### 2.5.5 Viscosidad

La viscosidad de los mostos se midió de acuerdo con el método Wort-13. Este método calcula la viscosidad absoluta o dinámica (en unidades centipoise) utilizando un viscosímetro Ostwald, con un rango de agua de 50 - 150 s y de acuerdo con el principio

de Hoesppler al medir el tiempo de rodadura de una bola a través de un capilar de vidrio inclinado lleno de 5 ml de agua o mosto a 20 °C. Cálculos: Viscosidad = Tiempo de flujo de mosto x Densidad de mosto x 1.002.

### 2.5.6 Análisis de aminoácidos libres

Fue determinado el perfil y concentración de aminoácidos presentes en cada mosto mediante el método de AccQ Tag Waters, utilizando el reactivo AccQ Flour (6-aminoquinolyl-N-hydroxisuccinimidyl carbamato, AQC); seguido de cromatografía de líquidos de alto desempeño reversa (High Performance Liquid Chromatography, HPLC||) para separar los derivados; finalmente, la cuantificación se realizó por medio de un detector de fluorescencia a 395 nm.

### 2.5.7 Determinación de DMS (libre, total y precursor)

Para la determinación de dimetil sulfuro (DMS) en mosto se emplea la cuantificación por cromatografía de gases acoplada a Headspace (HS/GC). Para la medición de DMS libre se utilizó directamente el mosto, mientras que para DMS-p (DMS precursor) se realizó un pretratamiento térmico en rotavapor con la adición de hidróxido de sodio, esto convierte los DMS-p en DMS, luego la solución se mide con HS/GC utilizando una columna GS-Q. El DMS total es la suma del DMS libre y DMS-p.

### 2.5.8 Monitoreo de las hidrolasas presentes en los mostos 100 % cebada malteada

Para el monitoreo de las hidrolasas presentes en los mostos 100 % cebada malteada fue empleada la metodología descrita en la sección 2.4.

## 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

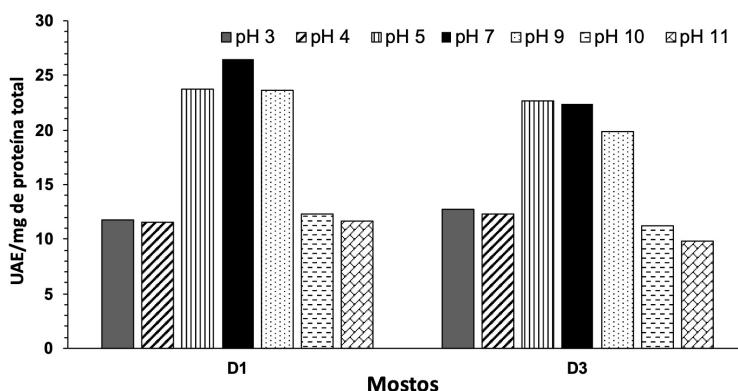
### 3.1 PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA MALTA CERVECERA

Las características bioquímicas de la cebada malteada influirán directamente sobre la elaboración y calidad de la cerveza. En este trabajo, caracterizamos dos maltas cerveceras y relacionamos sus características con la calidad del mosto. Las cebadas malteadas provienen de diferentes ciclos de cultivo (invierno y verano), ambas son comúnmente empleadas en la industria cervecera en México. Las diferencias en sus perfiles bioquímicos influirán en los siguientes parámetros: enzimas, concentración de proteína total soluble, niveles FAN, viscosidad, color, DMS, perfil de aminoácidos y de azúcares.

### 3.2 EFECTO DEL PH

El efecto del pH fue medido con el fin de caracterizar las proteasas presentes en dos maltas, nombradas D1 y D3, en un rango de 3.0 a 11.0. Ambas presentaron mayor actividad enzimática entre pH 5.0 a 9.0 (Fig. 1). Esto resultados demuestran que las maltas contienen proteasas ácidas (tipo cisteinil y aspártico proteasas) y alcalinas (tipo serino proteasas, carboxipeptidasas y aminopeptidasas) y coincide con lo reportado por Jones y Marinac (2002). La malta D3 presentó un mayor contenido de enzimas ácidas, mientras que la malta D1 contiene mayor contenido de enzimas alcalinas.

Figura 1. Efecto del pH en la actividad de proteasa en muestras de malta.

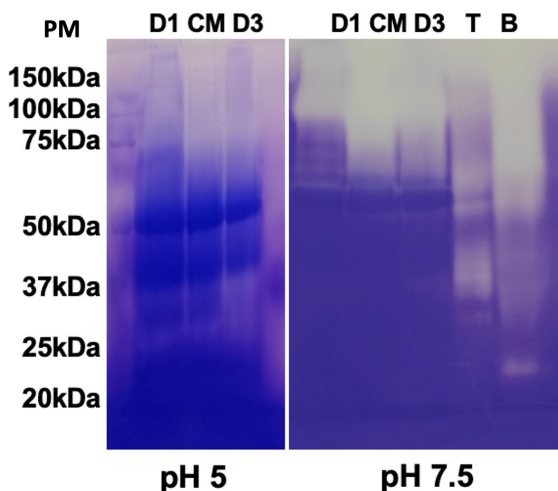


### 3.3 ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

La cebada contiene reservas de nutrientes, almidón y proteínas, que son necesarios para su desarrollo. Durante el malteado son activadas las enzimas que convertirán estas reservas en nutrientes asimilables por la levadura, logrando un buen desempeño durante la fermentación (Schmitt y Marinac, 2008). Cada malta varía de acuerdo con su variedad y condición de cultivo, por eso es necesario entender los sistemas hidrolíticos presentes en cada una. Con este estudio, ayudaremos a predecir el desempeño de la fermentación y tomar acciones preventivas, ya sea combinando lotes de malta o mediante la suplementación de enzimas durante el proceso. Se evaluó la actividad tipo proteasa utilizando zimogramas con gelatina como sustrato, las dos maltas mostraron un perfil diferente al ser incubadas a diferentes valores de pH. La malta D1 a pH 7.5 muestra 6 bandas con actividad proteolítica entre 50 y 150 kDa, mientras que la malta D3 mostró 4 bandas con actividad proteolítica con diferentes pesos moleculares 100 kDa, 60 kDa, 45 kDa y 30 kDa. Grudkowska et al. (2013) reportan una metaloproteinasas (150 kDa) y una proteinasas aspártica (110 kDa) similares. Las metaloproteinasas son relacionadas con la

calidad y pertenecen a un grupo de proteasas importantes en el proceso cervecero. Estas enzimas de alto peso molecular juegan un rol importante en la hidrólisis de proteínas de almacenamiento, relacionadas con el contenido de KI y FAN. A pH 5.0 ambas maltas (D1 y D3) no mostraron diferencias en los patrones de actividad, además, mostraron dos bandas de actividad de 23 y 35 kDa y sin bandas definidas de actividad a mayor peso molecular (Fig. 2).

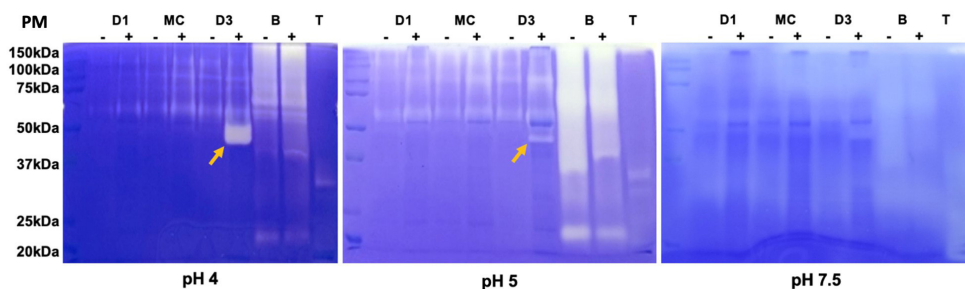
Figura 2. Determinación de la actividad proteolítica en muestras de malta. **D1.** Malta D1. **CM.** Malta comercial. **D3.** Malta D3. **B.** Bromelina de tallo de piña 30µg/µl. **T.** Tripsina de páncreas bovina 20 µg /µl.



El pH óptimo en el proceso de maceración es de 5.0, al no observar diferencias entre las maltas se procedió a la búsqueda de un cofactor u agente que estimulara la actividad enzimática de las proteasas. Koehler y Ho, (1988) purificaron y caracterizaron una cisteinil endoproteasa de la capa de la aleurona inducida durante 96 h con ácido giberélico 1 µM y visualizada mediante zimogramas nativos empleando hemoglobina como sustrato. La enzima purificada correspondía a la EP-A con un peso molecular de 37 kDa. Este tipo de proteasa está relacionada con la calidad de la malta ya que incrementa su expresión durante el proceso de germinación y es la responsable de degradar a las hordeínas (mayoritarias de la malta) (Koehler y Ho, 1990). La inducción de la actividad proteolítica se realizó siguiendo la misma metodología de Koehler y Ho. (1988) y para su visualización fueron empleados zimogramas con gelatina como sustrato. En la malta D3 incubada a pH 4.0 y 5.0 fue detectada una banda muy prominente de actividad proteolítica de 37- 50 kDa (Fig. 5, flecha amarilla), similar a la tiolproteasa EP-A reportada por Koehler y Ho. (1988). Este resultado indica que empleando esta malta dará un nivel óptimo de FAN y perfil de aminoácidos, lo que se traduce a una buena fermentación y

una cerveza con características deseables. Se puede observar que a pH 7.5 la actividad es inhibida en todas las maltas y controles (Fig. 3). Esto indica que las maltas poseen actividad de tipo cisteinil proteasas las cuales son inhibidas a este valor de pH incluso con el uso de inductores.

Figura 3. Inducción de la actividad proteolítica en muestras de malta **D1**. Malta D1. **MC**. Malta comercial. **D3**. Malta D3. **B**. Bromelina de tallo de piña 30µg/µl. **T**. Tripsina de páncreas bovina 20 µg /µl. - sin inductor. + con inductor.



### 3.4 PREPARACIÓN DEL MOSTO

Diferentes grupos de enzimas hidrolíticas participan durante el proceso de maceración y son activadas mediante los cambios de temperatura que ocurren en las diferentes etapas del proceso (Fig. 4).

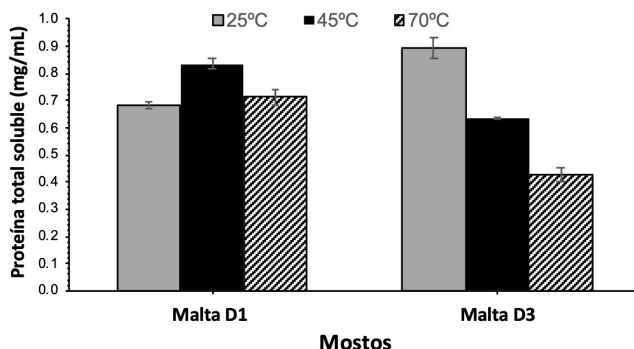
Figura 4. Curva de maceración de los mostos con 100 % malta.



Para relacionar las hidrolasas provenientes de la malta con la calidad del mosto, se prepararon mostos 100 % de cebada malteada (Iimure et al., 2012). La concentración de proteína total soluble fue medida en cada etapa de la maceración (Fig. 5) con el fin de estudiar cambios en el contenido de proteínas presentes durante el proceso. Los resultados muestran que en el mosto D1 no hubo disminución en el contenido de

proteínas durante todo el proceso de maceración en comparación con el mosto D3 que si disminuyó el 50 % de su contenido de proteínas. Steiner et al. (2011) mencionan que en mostos con 100 % de cebada, se pueden encontrar más compuestos proteicos disueltos prevaleciendo incluso en la cerveza. Estos compuestos pueden tener una influencia positiva en importantes características, tales como: cuerpo, sensación en la boca, la estabilidad y formación de la espuma.

Figura 5. Proteína total soluble en el proceso de maceración. Mostos preparados con 100% malta.



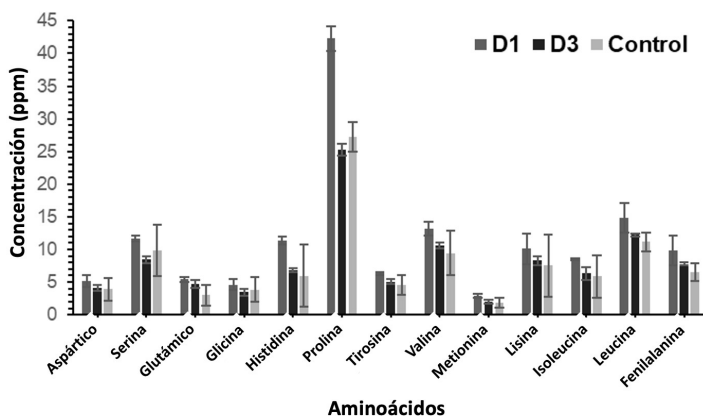
Otro parámetro analizado fue el FA,N importante para el crecimiento de la levadura. El mosto D1 obtuvo un valor más alto 327 mg/L en comparación con el mosto D3 (262 mg/ L), el cual fue similar al valor obtenido con el mosto de malta comercial (269 mg/ L) (Tabla 1). Estos resultados coinciden con las bandas de actividad proteolítica de alto peso molecular encontradas mediante zimogramas en la malta D1. Los valores FAN deben estar en los niveles adecuados para asegurar la disponibilidad de nutrientes nitrogenados a la levadura y no afectar el proceso de fermentación (Briggs et al., 2004). Los niveles bajos de FAN dan una baja propagación de la levadura, un mal desempeño de la fermentación y se generan subproductos no deseados (diacetilo, compuestos de azufre, etc.). Sin embargo, una muy alta concentración de FAN puede provocar reacciones no deseadas a través de la reacción de Maillard que tienden a producir colores altos en la cerveza (Steiner et al., 2011).

Tabla 1. Parámetros de los mostos producidos con diferentes maltas.

Parámetros de análisis	Mostos		
	D1	D3	Malta comercial
Proteína total soluble (mg/ L)	700	400	400
Alfa amino nitrógeno (mg/L)	350	273	269
Viscosidad (cps)	1,72	1,67	1,51
pH	5,9	6,0	5,9

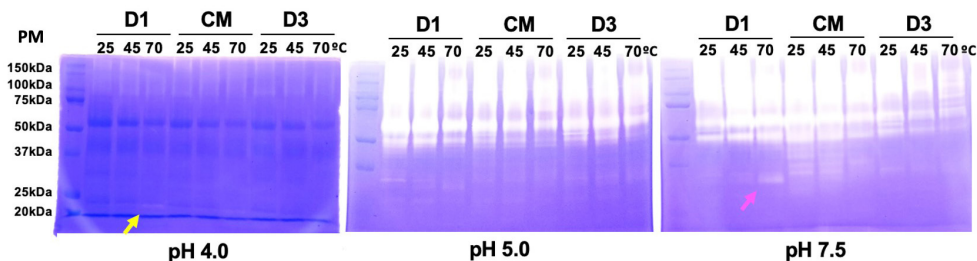
Estos resultados también concuerdan con los valores obtenidos respecto al color: mosto D1 ( $20.80 \pm 0.57$ ), mosto D3 ( $20.90 \pm 0.14$ ) y mosto control (8.4). Guzmán-Ortiz et al. (2018), reportaron resultados similares con mostos preparados con la variedad de cebada Doña Josefa y presenta un color tipo melano ( $16.26 \pm 0.19$ ) y tipo chocolate ( $27.73 \pm 0.79$ ), clasificándolas como cervezas tipo Weissbier y Double IPA, respectivamente. En cuanto al perfil de aminoácidos libres, el mosto D1 mostró mayor concentración con respecto al control y al mosto D3 (Fig. 6). Lingzhen et al. (2016), encontraron que la prolina y el ácido glutámico son importantes constituyentes en la formación de turbidez en la cerveza.

Figura 6. Perfil de aminoácidos de mostos 100 % malta.



Mediante zimogramas, observamos que las principales diferencias entre la malta D1 respecto a las maltas D3 y la comercial, son bandas de actividad presentes entre 25 y 37 kDa observadas principalmente a pH 5.0 y 7.5 (Fig. 7). Una pequeña banda de actividad de ca. 22 kDa fue observada en la etapa de maceración a 70 °C (pH 4.0), la cual está presente solo en esta malta (flecha amarilla). Otra de ca. 33 kDa (pH 7.0) que es más intensa en la malta D1 (flecha rosa). Estas dos bandas podrían estar relacionadas a los resultados descritos anteriormente.

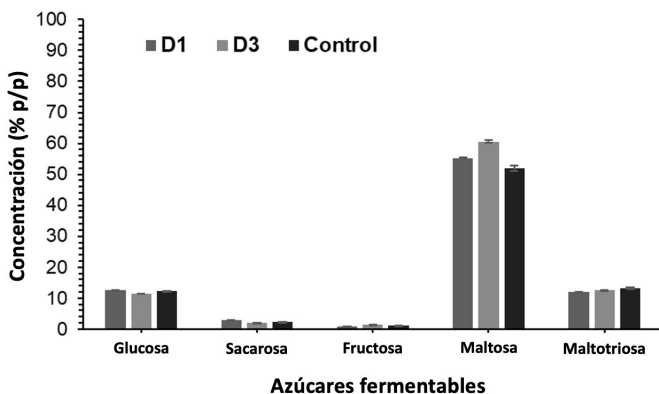
Figura 7. Actividad proteolítica presente en el proceso de maceración **D1**. Mosto preparado con malta D1. **CM**. Mosto preparado con malta comercial. **D3**. Mosto preparado con malta D3. **25, 45 y 70** representa la temperatura de cada etapa a diferentes valores de pH.





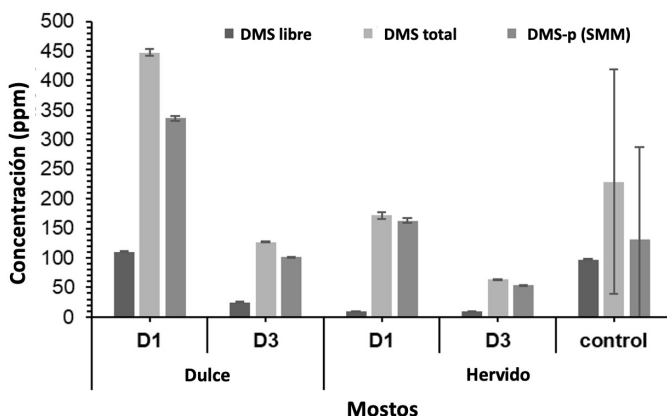
El perfil de azúcares de los dos mostos evaluados está dentro de los parámetros de calidad establecidos por la European Brewery Convention, 1998; donde casi el 60 % es maltosa, seguido de maltotriosa 15-17 %, glucosa 12-15 % y 1.3-1.9 % de fructosa (Fig. 8). Estos resultados indican que las condiciones de cultivo no afectan de manera significativa el perfil de azúcares fermentables, ya que los mostos preparados con esta variedad, producen el perfil óptimo para una buena fermentación y poseen niveles similares al mosto preparado con malta comercial. Sin embargo, el mosto D3 presentó niveles ligeramente más altos de fructosa, maltosa y maltotriosa.

Figura 8. Determinación de azúcares fermentables en los mostos.



Finalmente, evaluamos el DMS libre, total y el s-metilmetionina (SMM) precursor del DMS. El DMS es un importante contribuyente al sabor de la cerveza tipo lager, es beneficioso para el sabor y aroma en concentraciones moderadas entre 30 y 100 ppb pero a concentraciones superiores a su umbral aporta notas desagradables al aroma de la cerveza tal como aroma a pan de elote (Ferreira y Guido, 2018). Encontramos que el mosto D3 dulce cumple con los parámetros de calidad para este compuesto, detectándose niveles bajos (127 ppb mosto sin ebullición y 63 ppb con ebullición) y cae dentro del rango que no son percibidos. Por el contrario, el mosto D1 presentó niveles moderados (172 ppb) de DMS solo en los mostos después de la etapa de ebullición. Los mostos hervidos preparados con malta D1 y D3 presentaron niveles menores de DMS en comparación con el mosto de la malta comercial (229ppb). Por lo tanto, la malta D3 puede ser utilizada para preparar mostos dulces reduciendo el tiempo de maceración, mientras que, utilizando la malta D1 requerirá de la etapa de ebullición después de la maceración para disminuir los niveles de DMS (Fig. 10).

Figura 9. Determinación de Dimetil sulfuro en mostos 100 % malta.



No se había demostrado como impacta la aplicación de azufre y nitrógeno en los procesos de fertilización de la cebada, hasta que el grupo de Zhao et al. (2006) comprobaron que al aplicar concentraciones altas de azufre y nitrógeno puede afectar la concentración de DMS precursor en la cebada malteada, la calidad del malteo, el tamaño del grano y a su vez el sabor de la cerveza. Ellos recomiendan una adecuada concentración para que no se vea afectados los parámetros de calidad de la cebada. Estos resultados se relacionan con lo observado con el mosto D1, donde nuevamente las condiciones de cultivo impactan en las características de la cebada malteada, lo que significa que la cebada D1 en su condición de cultivo está más expuesta a suelos ricos en azufre y nitrógeno, de ahí sus niveles altos de DMS precursor y FAN.

#### 4 CONCLUSIONES

La producción de enzimas hidrolíticas depende principalmente de la variedad de cebada, condiciones de cultivo y condiciones ambientales. La actividad enzimática es activada durante el proceso de malteado de la cebada y maceración del mosto, y son pieza clave para la producción de cerveza. De estas actividades dependerán la cantidad de aminoácidos y azúcares disponibles para la levadura durante la fermentación. La malta D1 mostro una proteasa de 150 kDa similar a una metaloproteína reportada relacionada con el KI y FAN. Presenta niveles superiores de FAN y una mayor cantidad del aminoácido prolina relacionado con la presencia de turbidez en la cerveza. Este resultado se relaciona también con la presencia de mayor actividad proteolítica alcalina. La malta D3 muestra mayor actividad proteolítica ácida que se relaciona con un óptimo nivel de FAN y perfil de aminoácidos. Presenta una banda tipo tiolproteasa EP-A muy prominente ca. 37-40 kDa inducida con ácido giberélico, principal enzima de digestión de las hordeínas. Utilizando

la malta D3 para la preparación del mosto, se puede reducir el proceso de maceración eliminando el paso de ebullición, lo cual es benéfico para la industria cervecera.

Los resultados muestran que ambas maltas presentan buenas características para su uso en la producción de cerveza, teniendo mejores características la malta D3. Ambas dan un perfil óptimo de azúcares fermentables y de aminoácidos.

En este estudio pudimos observar que la malta preparada a partir de la misma variedad de cebada puede tener diferentes características de calidad según las condiciones de cultivo a la cual estuvo sometida. Fueron observadas importantes diferencias que se relacionan con el proceso cervecero o con la cerveza final. Esto permitirá establecer mejores criterios de selección de maltas, manejo y programación de preparación de mostos, reducción en los procesos de maceración y asociar la presencia de enzimas con el desempeño de la fermentación o de la cerveza final.

## 5 AGRADECIMIENTOS

Agradecemos Al Dr. Víctor E. Aguirre (Facultad de Agronomía-UANL) por su colaboración con material para la realización de los zimogramas. Al Dr. Jorge Hugo García García (IB-FCB-UANL) por su colaboración en la revisión del manuscrito.

## 6 CONTRIBUCIONES DEL AUTOR

CBLA y JGHG fueron designadas al proyecto y realización de la parte experimental del trabajo, BPA director del proyecto. CBLA escribió el manuscrito con el apoyo de JGHG y supervisión de BPA. JHGG y CIHV apoyaron con la revisión de los resultados. Todos los autores proporcionaron comentarios críticos y ayudaron a dar forma al proyecto y al artículo. EPO y LCDB dieron su aprobación a la versión final del documento.

## 7 CONFLICTO DE INTERESES

Todos los autores declaran no tener intereses financieros en competencia.

## REFERENCIAS

American Society of Brewing Chemists., 1996. ASBC Methods of Analysis, 8th revised edition. St Paul, MN, U.S.A.

Briggs, D.E., Boulton, C.A., Brookes, P.A., Stevens, R., 2004. Brewing: science and practice. Publishing W, editor: CRC Press, Cambridge UK.

European Brewery Convention, 1998. Analytica-EBC. Verlag Hans Carl Getranke Fachverlag, Nurnberg, Germany.

- Fang, Y., Zhang, X., Xue, D., 2019. Genetic Analysis and Molecular Breeding Applications of Malting Quality QTLs in Barley. *Frontiers in Genetics* 10, 352. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00352>.
- Fernández, Z., October 31, 2013. Research & production trends in Mexico. In: AMBA.
- Ferreira, I.M., Guido, L.F., 2018. Impact of Wort Amino Acids on Beer Flavour: A Review. *Fermentation* 4, 23, 2-13. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020023>.
- Grudkowska, M., Lisik, P., Rybka, K., 2013. Two-dimensional zymography in detection of proteolytic enzymes in wheat leaves. *Acta Physiologiae Plantarum* 35, 3477-3482. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1371-1>.
- Guo, B., Luan, H., Lin, S., Ly, C., Zhang, X., Xu, R., 2016. Comparative proteomics analysis of two barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) with contrasting grain protein content. *Frontiers in Plant Science* 7, 542. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00542>.
- Guzmán-Ortiz, F.A., Soto-Carrasquel, A., López-Perea, P., Román-Gutiérrez, AD., 2018. Valuation and use of a new variety of barley for brewing craft beer. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas* 11, 81-95. <http://dx.doi.org/10.5154/r.inagbi.2018.01.001>.
- Herrera-Gamboa, J.G., López-Alvarado, C. B., Pérez-Ortega, E., Damas-Buenrostro, L. C., Cabada-Amaya, J. C., Pereyra-Alfárez, B., 2018. Proteomic analysis of two malting barleys (*Hordeum vulgare* L.) and their impact on wort quality. *Journal of Cereal Science* 80, 150-157. ISSN 0733-5210, <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.02.004>
- limure, T., Nankaku, N., Kihara, M., Yamada, S., Sato, K., 2012. Proteome analysis of the wort boiling process. *Food Research International* 45, 262-271. ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.033>.
- Jones, B.L., 2001. Interactions of malt and barley (*Hordeum vulgare* L.) endoproteinases with their endogenous inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5975-81. <https://doi.org/10.1021/jf010611q>.
- Koehler, S., Ho, T.H.D., 1988. Purification and characterization of gibberellic acid-induced cysteine endoproteases in barley aleurone layers. *Plant Physiology* 87, 95-103.
- Koehler, S., Ho, T.H.D., 1990. A major gibberellic acid-induced barley aleurone cysteine proteinase which digests hordein. *Plant Physiology* 94, 251-258.
- Lingzhen, Y., Yuqing, H., Mei, L., Chengdao, L., Guoping, Z., 2016. The chemical components in malt associated with haze formation in beer. *Journal of the Institute of Brewing* 122, 524-529. <https://doi.org/10.1002/jib.353>.
- López-Alvarado, C.B., Herrera-Gamboa, J.G., Damas-Buenrostro, L.C., Pérez-Ortega, E., Pereyra-Alfárez, B., 2016. Evaluation of Protease Activity from Two Brewing Malts. *International Biotechnology Color Journal* 4, 23-29.
- Oliveira, H.M., Pinheiro, A.Q., Fonseca, A.J.M., Cabrita, A.R.J., Maia, M.R.G., 2019. Flexible and expeditious assay for quantitative monitoring of alpha-amylase and amyloglucosidase activities, *MethodsX* 6, 246-258. ISSN 2215-0161, <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.01.007>.
- Ouda, S.A., Gaballah, M.S., 2007. Effect of Using Stabilizing Agents on Increasing Yield and Water Use Efficiency in Barley Grown under Water Stress. *Aust. Journal of Basic and Applied Sciences* 1, 571-577.

Schmitt, M.R., Marinac, L., 2008. Beta-amylase degradation by serine endoproteinases from green barley malt. *Journal of Cereal Science* 47, 480-488. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.06.002>.

Secades, P., Guijarro, J.A., 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3969-3975.

Steiner, E., Auer, A., Becker, T., Gastl, M., 2011. Comparison of beer quality attributes between beers brewed with 100% barley malt and 100% barley raw material. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 803-813. <https://doi:10.1002/jsfa.4651>.

Wang, W., Vinocur, B. Shoseyov, O., Altman, A., 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9, 244-52. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006>.

Wrobel, R., Jones, B.L., 1992. Electrophoretic study of substrate and pH dependence of endoproteolytic enzymes in green malt. *Journal of the Institute of Brewing* 98, 471-478. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1992.tb01132.x>.

Zhao, F.J., Fortune, S., Barbosa, V.L., McGrath, S.P., Stobart, R., Bilsborrow, P.E., Booth, E.J., Brown, A., Robson, P., 2006. Effects of sulphur on yield and malting quality of barley. *Journal of Cereal Science* 43, 369-377. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.12.003>.

# CAPÍTULO 10

## HORMESIS UNDER OIL-INDUCED STRESS IN *CLITORIA* SPP USED FOR FORAGE PROTEIN PRODUCTION IN SOUTHEASTERN MEXICO<sup>1</sup>

Data de submissão: 12/01/2023

Data de aceite: 03/02/2023

**María del Carmen Rivera-Cruz<sup>2</sup>**

Colegio de Postgraduados  
Laboratorio de Microbiología Agrícola y  
Ambiental Colegio de Postgraduados  
H. Cárdenas, Tabasco, México  
<https://orcid.org/0000-0003-4178-7252>

**Mariana Valier-Mago**

Colegio de Postgraduados  
Postgrado Producción  
Agroalimentaria en el Tropicó  
H. Cárdenas, Tabasco, México

**Antonio Trujillo-Narcía**

Universidad Popular de la Chontalpa  
Cuerpo Académico Energía y  
Medioambiente  
H. Cárdenas, Tabasco, México  
<http://orcid.org/0000-0003-4431-9059>

**ABSTRACT:** The oil industry is an activity with inherent risks of environmental emergencies due to oil spills and their derivatives. A study was carried out under micro-tunnel conditions for 120 days with the objective of investigating the hormetic effect of oil in 12 variables

<sup>1</sup> Conflict of interest. The authors declare that there are no conflicts of interest.

<sup>2</sup> Acknowledgements: This study was financially supported by funds of Colegio de Postgraduados of Mexico. The first author thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of Mexico.

during the three phenological stages of two species of a legume. A completely randomized experimental design was established with a trifactorial arrangement, two plant species (*Clitoria* sp and *Clitoria ternatea*), five doses of medium fresh oil (0, 3, 10, 20 and 30 g/kg) and three exposure times according to phenological stage (days 30: growth, 75: flowering, and 120: fructification). The results show means with statistical differences in each exposure time in all the variables evaluated. Hormesis occurred in the three phenological stages in the two legumes, it occurred in 17 of the 36 dose-response combinations, both in *Clitoria* sp and *C. ternatea*, which represents 47.2% of the evaluated combinations, it was also found in 11 combinations, 30.5%, the phytotoxic effect of oil represented by the inverse dose-response relationship. The use of both species is recommended because of their adaptability and tolerance to medium crude oil and also because it accumulate crude protein in the foliage and in the pod.

**KEYWORDS:** Petroleum hydrocarbons. Nodule. Phenological stage. Leguminous.

### 1 INTRODUCTION

The response of the plant to exposure to chemical substances is manifested in the decrease in growth and production because the metabolic profiles are altered, they also produce secondary metabolites to overcome the stress conditions (Tadeo and Gómez-

Cárdenas, 2013; Jamil et al., 2018). The adaptation of plants to chemical substances to avoid cellular stress and ensure signaling functions such as the control of cell multiplication and death, has been explained by the control of the levels of reactive oxygen molecules that regulate an antioxidant defense network to avoid cellular toxicity (Mittler, 2002). In addition to these two responses of plants to chemicals, there are hormetic processes at low doses of pollutants (Plice 1949; Eaton and Klaassen, 2005).

Hormesis is a dose-response phenomenon in which both low and high doses stimulate plants (Calabrese, 2012), it is an adaptive response of an organism to a stress factor. The hormetic effect shows an inverted U-shaped dose-response curve, which shows an increase over the control treatment at low doses of oil followed by a decrease at higher doses. In contrast, an oil dose response that forms a J-shaped curve represents a decrease compared to controlling for lower oil doses, followed by an increase at lower doses (Calabrese and Blain, 2009; Calabrese, 2012).

The sensitivity of legumes to exposure to fresh oil has been studied in recent decades by various researchers around the world and they indicate that oil in concentrations equal to and/or greater than 50 g/kg cause damage to cell membranes and death of species such as *Crotalaria* sp, *Crotalaria retusa*, *Leucaena* sp, *Leucanthemum vulgare* and *Mimosa pigra*, also propose that between the ranges of 7.5 to 50 g/kg they are indicators of toxicity to contaminated sites and the indicators are based on growth parameters, biomass production plant and nodules (Rivera-Cruz et al., 2005; Sadat et al., 2014; Walakulu et al., 2020). In other plant species, oil in low and medium doses stimulates the production of root biomass, the number of plants in the tiller and the accumulation of protein in the foliage, and induces a hormesis effect because it increases the carbon content in the soil (Plice 1949; González-Moscoso et al., 2019; Orcio- Carrillo et al., 2019).

*Clitoria* is a tropical legume that is widely distributed in nature (Jamil et al., 2018) and in intensive cultivation in pure stands and associated with grasses to be grazed (Correa et al., 2014). The legume *Clitoria* is known as butterfly pea and blue pea in several countries (Mejía, 1984). This plant specie is a tall, slender, herbaceous climbing plant with five leaflets, while the flower color ranges from blue-white with a white or yellow center (Jain et al., 2003). In the humid Mexican tropics, *Clitoria* is found naturally in cattle grazing sites adjacent to oil infrastructure, exposure to fresh oil can occur through the soil and oil breeze, which according to Rivera-Cruz et al. (2016) the petroleum hydrocarbons reach the land with livestock use due to accidental spills of pipelines that carry oil from the wells to the industrial distribution centers.

The sensitivity of plants to exposure to the contaminant can vary according to the dose of oil and the phenological stage. High doses of oil induce in the soil a coating of

particles with an oily layer that hinders the absorption of water and exchange of nutrients (Li et al., 1997; Trujillo-Narcía et al., 2012). The development of the root is limited due to the difficulty to assimilate nutrients dissolved in water, as for example in N that its availability is essential for plants, which absorb it, mainly in the form of nitrates and ammonium, for use in the synthesis of protein and other plant organic compounds (Brady and Weil, 2008; Cooper and Scherer, 2012).

Studying the sensitivity of the toxic and hormetic response of the legume *Clitoria* by phenological stages will be a basic knowledge to propose its establishment in oil-contaminated sites in order to produce protein and recover soils degraded by the oil industrial activity. The objectives of this study are as follows, 1) To determine the hormesis effect on growth parameters, production and crude protein content, as well as number, diameter and leghemoglobin of nodules in *Clitoria* sp and *Clitoria ternatea* by phenological stage exposed to soil contaminated with fresh oil, 2) to analyze the type of *Clitoria* that supports stress from total oil hydrocarbons in the soil by phenological stage; finally, 3) recommend the production of integrated protein with native *Clitoria* from the Mexican humid tropics that is used as a forage supplement.

## 2 MATERIALS AND METODHS

### 2.1 SOIL AND *CLITORIA* CHARACTERISTICS

Uncontaminated soil (Gleysol) was collected in the Paso y Playa ejido, municipality of Cardenas, Tabasco, Mexico (UTM: 0461719 and 1985998). The soil was collected in March 2019 from a point on the surface horizon (0-30 cm). The soil was dried indoors, sieved through a mesh (2 mm diameter) and the chemical properties of a composite sample were determined before establishing the mixture with different concentrations of fresh oil. The properties of the uncontaminated soil were: clay texture (hydrometer method, Bouyoucos 1962), moderately acidic pH (6.4), extremely rich organic matter content (6.5%) (Walkley and Black, 1934), high inorganic N (55 ppm) (micro-Kjeldahl, vapor entrainment, DOF, 2002) and low cation exchange capacity (9.62 cmol/kg) (1N ammonium acetate method pH 7.0, DOF, 2002).

*Clitoria* sp (Clisp) and *Clitoria ternatea* L. (Clite) were selected, the first because it is a species that grows wild in the area of influence of particulate and gaseous emissions from the burning pit of the Paredón Battery, Huimanguillo, Tabasco, Mexico, while the Clite was collected in the municipality of Acayucan, Veracruz, Mexico where it is used as a source of protein for cattle.



## 2.2 EXPERIMENTAL DESIGN AND SOIL PREPARATION

The oil used is the same as that reported by Orocio-Carrillo et al. (2019). It is a medium crude with an API of 10.8°, specific gravity of 0.84 g/cm; the fractions are 56.4, 23.7 and 14% aliphatic, aromatic and polar + resin and asphaltenes, respectively. The experiment was based on a trifactorial arrangement consisting of the plant specie (*Clitoria* sp and *Clitoria ternatea*), the medium oil dose (0, 3, 10, 20 and 30 g/kg of oil) and exposure time associated with three phenological stages (growth, day 30; flowering, day 75 and fruiting, day 120). Each treatment had four repetitions. All treatments were established in a micro-tunnel for 120 days at a variable temperature between 28 to 34 °C. The initial oil concentration (g) in the experimental unit (UE) was sequentially: 0, 6, 20, 40 and 60 g of medium fresh oil in 2000 g of dry soil with a particle diameter of 2 mm. The soil and the oil were manually homogenized with a glass rod. Each UE consisted of a glass beaker (17.5 cm diameter and 22.3 cm high) with 2000 g of dry soil and planted with Clisp or Clite. The 120 UE with plants were irrigated every 24 hours with potable water, maintaining humidity at field capacity (32%). The 12 variables evaluated were plant length (PL), relative growth rate (GR), dry aerial (stem + leaf) biomass (AB), dry root biomass (RB), dry nodule biomass (NB), dry flower biomass (FB), dry pod biomass (PB), number of nodules (NN), nodule diameter (ND), leghemoglobin in nodule (LN), crude leaf protein (LP) and crude pod protein (PP).

## 2.3 ANALYSIS OF GROWTH, PRODUCTION AND CRUDE PROTEIN

The PL quantification was measured from the base of the stem to the apex using a graduated ruler (cm). The PL was used to determine the GR applying the formula of Hunt et al. (2002):  $GR = (\log PL_2 - \log PL_1) / (t_2 - t_1)$ . Where, long: natural logarithm, PL: plant length, and t: time. The values of AB, RB, NB, FB and PB was quantified by the gravimetric technique after drying the different biomasses at 60 °C for 72 h and weighing the dry materials on a semi-analytical balance (Ohaus, Scout Pro SP 202) with 0.01 g capacity. The NN was evaluated by direct counting, the nodules of each root were separated manually and counted. ND was measured using a Mitutoyo digital vernier with 0.01 mm precision, and leghemoglobin was determined by transverse and longitudinal cuts of the nodule, the presence of red or orange coloration within the nodule was observed. The extraction of N was carried out from 1.0 g of leaves and also of pod by digestion with sulfuric acid and quantified using the micro-Kjeldahl method (Jones et al. 1992). The crude protein content was calculated using the formula:  $Protein (\%) = mL\ HCl \times N \times 1.4 \times PM \times 6.25$  (AOAC, 1980), where, mL: volume of sulfuric acid, N: exact normality of HCl, and PM is weight of the sample expressed in grams.

## 2.4 STATISTIC ANALYSIS

The data was analyzed with the SAS version 8.01 program (SAS Inc, 2005). The Shapiro-Wilk test was first used to verify the normal distribution of the data. The equality of variances was tested with the Bartlett test. Analysis of mean variance (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) of the variables plant length, relative growth rate, dry biomass of the aerial part (stem and leaf), root, nodule, flower was carried out in each plant species and in each phenological stage (exposure time); also in the number of nodules, diameter of the nodule, presence of hemoglobin in nodule, protein in leaves and in the pod. Moreover, the pairwise correlation was evaluated with Pearson's correlation-coefficient, using linear regression, for normally distributed variables with a statistical significance of  $p < 0.05$  and  $0.01$ .

## 3 RESULTS

### 3.1 EFFECT OF OIL ON PLANT GROWTH

Oil inhibited plant growth in the three stages, the correlation between TPH and PL fluctuated from  $-0.655^{**}$  to  $0.418^*$  (Table 1). The exposure of the Clisp and Clite plants to five doses of crude oil, for 120 days, originated in the three middle phenological stages with statistically significant differences in PL and GR (Figures 1A and 1B, Table 1). The PL in the growth stage (day 30) was higher in Clisp, it grew 56.5 cm in soil contaminated with 3 g/kg of oil, higher concentrations inhibited the plant growth up to three times, showed U-inver type hormesis in Clisp (Table 2); on the other hand, the growth of Clite was not stimulated by exposure to oil, but not only that, the longest length was 25.1 cm in a plant established in control soil, a value that represents less than half compared to the other species, the hormetic effect was of the reverse type in Clite (Table 2).

This initial noticeable difference suggests that the Clisp species, which grows wild, has a greater natural rooting capacity that promotes initial growth. On the other hand, the responses during flowering (day 75) and fruiting (day 120) show that the oil induced hormesis (Table 2) in the growth of Clite exposed up to 20 g of oil, whereas in Clisp it only occurred during flowering due to the influence of 10 g/kg of oil (Figure 1A). Regarding GR, the trend was similar and complementary to legume stem elongation. The highest daily growth rate occurred in the growth stage of Clisp, the data varied from 0.04 to 1.65 cm/d (Figure 1B), the highest value corresponded to the plant established in soil with 3 g of oil, it was higher 77% compared to the control treatment (1.65 *versus* 0.93 cm). As for the Clite species, the rate registered a negative relationship with the amount of oil, fluctuated from 0.08 cm/d in the plant that grew in soil with 30 g of oil and increased to 0.41 cm in

control soil, the inhibition was 512%. The results in flowering were stimulated by the oil in Clite, it was evident that the greater amount of oil originated the highest daily growth that reached 0.65 cm.

Table 1. Relationships between plant growth, biomass production, nodulation and crude protein content and total petroleum hydrocarbons during the phenological stages of growth (day 30), flowering (day 75) and fruiting (day 120) of *Clitoria* legume.

	PL	GR	AB	RB	NB	FB	PB	NN	LP	PP
<b>Day 30</b>										
TPH	-.655**	-	-.704**	-.630**	NS	-	-	NS	-.710**	-
PL		.593**	.934**	.801**	NS	-	-	NS	NS	-
GR			.902**	.687**	NS	-	-	NS	NS	-
AB				.880**	NS	-	-	NS	NS	-
RB					-.463**	-	-	NS	NS	-
NB						-	-	.648**	NS	-
FB							-	-	-	-
PB								-	-	-
NN									-	-
LP										-
<b>Day 75</b>										
TPH	-.418*		-.731**	-.645**	-.704**	NS		.682**	NS	-
PL		.708**	.445*	NS	.446*	NS	-	NS	NS	-
GR		NS	-.507**	-.539**	-.382*	NS	-	.419*	NS	-
AB				NS	.653**	NS	-	NS	.559**	-
RB					NS	-.502**	-	-.549**	NS	-
NB						NS	-	-.547**	.519**	-
FB							-	NS	NS	-
PB								-	-	-
NN									NS	-
LP										-
<b>Day 120</b>										
TPH	-.597**		NS	NS	-.497**	NS	-.396*	.497**	NS	-.923**
PL		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
GR		NS	.407*	NS	NS	-.390*	NS	NS	NS	NS

TPH: total petroleum hydrocarbons, PL: plant length, GR: relative growth rate, AB: dry aerial (leaf and stem) biomass, RB: dry root biomass, NB: dry nodule biomass, FB: dry flower biomass, PB: dry pod biomass, NN: number of nodules, LP: crude leaf protein, PP: crude protein in pod. \*Means with significant differences (Tukey,  $p = 0.05$ ), \*\*highly significant (Tukey,  $p = 0.01$ ), and NS: non significant.

Table 2. Hometic types of dose-response curves of plant growth variables, biomass production, nodulation and protein content of *Clitoria* plants exposed to medium oil during the phenological stages of growth (day 30), flowering (day 75) and fruiting (day 120).

Variable	<i>Clitoria sp</i> / day			<i>Clitoria ternatea</i> / day		
	30	75	120	30	75	120
Plant length (cm)	U-inv	U-inv	Rever	Rever	Rever	U-inv
Relative growth rate (cm/d)	U-inv	Rever	U-inv	Rever	J	None
Root dry biomass (g)	Rever	Rever	Rever	Rever	Rever	Rever
Aerial dry biomass (g)	U-inv	Rever	U-inv	Rever	Rever	Rever
Nodule dry biomass (g)	U-inv	Rever	Rever	U-inv	U-inv	U-inv
Flower dry biomass (g)	None	U-inv	None	None	U-inv	None
Pod dry biomass (g)	None	None	Rever	None	None	Rever
Number of nodules	U-inv	J	J	U-inv	J	J
Nodule diameter (mm)	J	U-inv	Rever	J	U-inv	Rever
Leghemoglobin in nodule (%)	U-inv	J	Rever	U-inv	J	J
Crude protein in stem-leaf (%)	Rever	U-inv	U-inv	Rever	J	U-inv
Crude protein in pod (%)	None	None	Rever	None	None	Rever
Hometic curve	7	6	4	5	6	5
None (no curve)	3	2	1	3	2	2
Reverse (inverted curve)	2	4	7	4	4	5

U-inv: Inverted U-shaped dose-response curve, J: J-shaped dose-response curve, Rever: Inversely proportional trend, and None: no trend or no response from the variable.

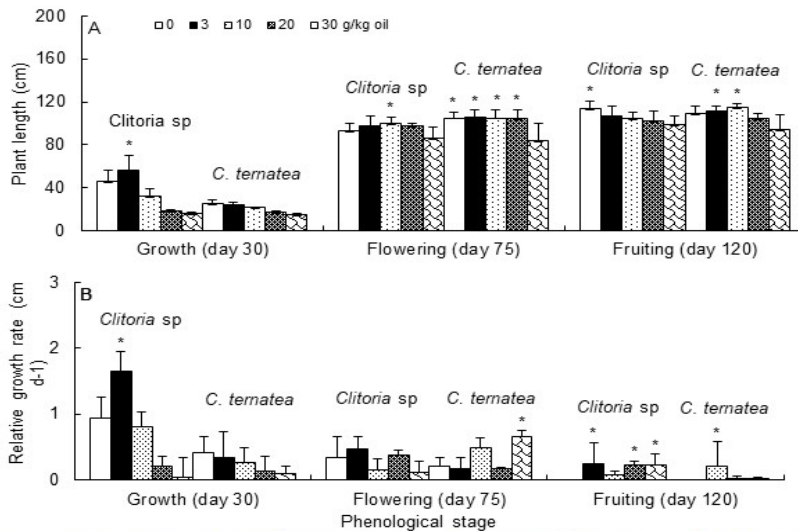


Figure 1 Effect of oil on length (A) and relative growth rate (B) of *Clitoria sp* and *Clitoria ternatea* exposed to crude oil during the three phenological stages. Values represent mean  $\pm$  SD, n = 4. Asterisk within each phase indicate significant difference at the 5% level according to the LSD test.

The exposure of the plant to oil caused hormesis (Table 2) during fruiting (day 120), it was more accentuated in Clisp, where doses 3, 20 and 30 g of oil promoted 0.21 to 0.24 cm of daily growth. On the other hand, in control soil it did not register growth. Oil inhibited the growth of the plant on day 30 (0.593\*\*), promoted (0.708\*\*) during flowering (day 75) and in the fruiting stage (day 120) it was not significant (Table 1).

### 3.2 EFFECT OF OIL ON THE PRODUCTION OF PLANT BIOMASS

Figure 2 shows that oil affected the formation of leaf, stem, root and nodule biomass throughout the vegetative cycle of the two legumes. Statistical differences occurred between the means of the evaluated treatments. The type of hormesis in the four types of plant biomass was varied. In the case of the root that interacts directly with oil, the two evaluated species were affected by oil, for this reason it was classified as reverse hormesis, otherwise it was in the NB because in four of the six cases it was of the hormetic type U-inver (Table 2). Comparison of the two species shows that Clisp response on day 30 (Figure 2A) was positive because in control soil it produced 0.37 g of RB, whereas in Clite it was 0.12 g, this difference represents 308%, these data suggest a better adaptation of the Clisp species to oil. The greater amount of roots in the flowering and fruiting stages was also noticeably higher in this species, in addition the oil caused phytotoxicity in the plants exposed to 3, 10, 20 and 30 g of oil. On day 75 the data of both legumes not exposed to oil was 1.8 and 0.65 g of RB, it was higher by 277% and decreased to 174% on day 120. Oil and root biomass registered negative correlation in the growth stage (-0.630\*\*) and in flowering (-0.645\*\*), there was no effect on fruiting (PB) (Table 1). The aerial biomass production also registered the same trend as the root biomass, although the adaptation process did occur due to the stress derived from the 3 g dose of medium oil (Figure 2B). Amounts less than 1.0 g of dry foliage and stems produced the plants of both legumes harvested on day 30 and increased significantly in the following two phenological stages. On day 75 Clite formed the highest amount of foliage and stems (AB), statistically it was similar in the plants exposed to 0, 3 and 10 g/kg of oil, the values varied from 24 to 25 g of foliage and stem; the phytotoxic effect of oil originated 44% lower foliage biomass. The data from the collection on day 120, in full fruiting period, show that example of U-inv hormesis, the value was 37 g, was 3 g (8.1%) higher than the biomass of the plant established in soil without oil.

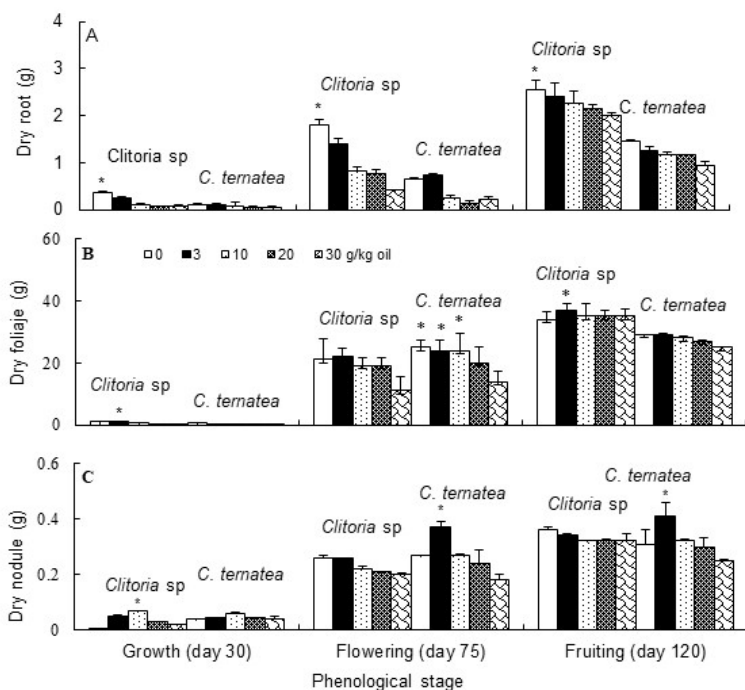


Figure 2 Effect of oil on dry biomass of root (A), foliage (stem and leaf) (B) and nodule (C) according to phenological stage of *Clitoria sp* and *Clitoria ternatea* exposed to crude oil for 120 days. Values represent mean  $\pm$  SD, n = 4. Asterisk within each phase indicate significant difference at the 5% level according to the LSD test.

Correlation between oil and AB (leaf and stem) was negative during growth (-0.704\*\*), fruting (-0.731\*\*) and there was no effect on fruting (Table 1). Regarding the biomass of the nodule, oil induced a U-inver type hormetic effect (Figure 2C, Table 2). On day 30, the highest amount of biomass was 0.07 g in Clisp under the effect of 10 g of oil and decreased to 0.02 g in the plant exposed to 30 g. The biomass increased in the samplings carried out during flowering and fruting, in both phenological stages the biomass of the nodules was higher in Clite exposed to 3 g of oil. The dry weight in the flowering stage was 0.37 g and in control it decreased to 0.27 g, equivalent to 37% less; the same information but corresponding to fruting increased to 0.41 in soil with 3 g of oil and 0.31 in the control, again it was lower 32% (Figure 2C). Oil affected the biomass of the nodule during flowering (-0.704\*\*) and also during fruting (-0.497\*\*) (Table 1). The FB collected on day 75 was also inhibited by oil in Clisp but hormesis occurred in Clite in soil with 3 g of oil; As for the PB of the pod on day 120, it was also inhibited by oil, the reduction was 43% in Clisp and increased to 53% in the other species (Table 3). Crude oil registered a negative correlation (-0.396\*) with the PB on day 120 (Table 1).

Table 3 Effect of oil on the production of dry flower and pod biomass of *Clitoria* sp and *Clitoria ternatea* plants exposed to crude oil for 120 days.

Dry biomass (g)			
Flower (day 75)		Pod (day 120)	
<i>Clitoria</i> sp	<i>C. ternatea</i>	<i>Clitoria</i> sp	<i>C. ternatea</i>
5.0 ± 0.08e*	5.72 ± 0.08b	11.54 ± 0.34a	9.59 ± 0.32ab
5.74 ± 0.01b	5.87 ± 0.04a	8.47 ± 0.55bc	7.60 ± 0.22bc
5.62 ± 0.03bcd	5.53 ± 0.05cd	7.83 ± 0.47bc	6.25 ± 0.05c
5.65 ± 0.07bc	5.68 ± 0.03b	8.37 ± 0.14bc	8.81 ± 0.33bc
5.51 ± 0.16d	5.62 ± 0.06bcd	8.08 ± 0.21bc	6.25 ± 0.27c

\*Different letters in columns of each plant organ indicate statistical differences (Tukey, p = 0.05, a> b, n = 4).

### 3.3 EFFECT OF OIL ON THE NUMBER, SIZE AND PRESENCE OF LEGHEMOGLOBIN OF NODULES

The exposure of legumes for 120 days to oil caused statistical differences in the quantity, size and presence of leghemoglobin in nodules in the three phenological stages, it caused type J hormesis in the three evaluated stages (Figure 3A, Table 2). The results of day 30 show that the amount of nodules was stimulated in Clite but mainly in Clisp that formed 84 nodules in plant exposed to 10 g of oil and increased to 125 nodules during flowering (day 75), these values represent increases of 551 and 227% with respect to the number of nodules of the control treatment. This trend was maintained in the fruiting stage in Clisp although with less difference compared to the control, the plants exposed to 30 g of oil formed 144 nodules and in the control plant it was 75 nodules, it decreased 48% (Figure 3A). The presence of oil in the soil induced increases in the number of nodules during flowering (0.682\*\*) and also in the fruiting stage (0.497\*\*). The nodule size was sensitive to oil, it only increased in size in both legumes exposed to 3 g of oil in the growth stage, it also occurred in Clisp at the same dose but in the flowering stage (Figure 3B). The largest size of the Clisp nodule on day 30 was 2.32 mm and the smallest size 1.21 mm in the control plant, the difference was 92%; the same trend but of a lesser magnitude was identified in Clite, it was 33%. The results obtained in flowering showed greater statistical differences in Clisp. The largest average nodule was also found in Clisp with 3.88 mm and in the control plant it was 3.49 mm, it decreased to 2.76 mm in the plant exposed to 30 g of oil, the size decreased to 41% due to the effect of exposure to oil.

The nodulation during fruiting did not register hormesis, on the contrary, only in the control plant the nodules with larger diameters (4.64 mm) were formed and it decreased in both legumes due to the increase in the amounts of oil added in the soil (Figure 3B). The viability of the N-fixing bacteria within the nodules, evaluated through the presence of reddish coloration derived from leghemoglobin, was positive in both plant species in the growth and flowering stages, and partially in fruiting (Figure 3C). Here inverted U-type hormesis occurred during the growth stage and J-type in flowering. Leghemoglobin in nodule reached 90% of the Clisp nodules exposed to 10 g of oil, whereas in the control soil was 66.7% and decreased to 36.7% in soil with 30 g of oil.

The response of the legume Clite showed the same trend but with less damaging effect, it varied from 36% in soil with 30 g of oil and increased to 76% when the plant was exposed to 10 g of oil. The largest percentage value was 86.7% in nodules during flowering in Clite and it was statistically similar in soils with 20 and 30 g of oil (Figure 3C). On day 120, Clisp showed that oil inhibited the leghemoglobin in nodules, in control it was 98% and decreased to 66.7% in the most contaminated soil; On the other hand, the Clite data show a positive trend, the oil promoted the accumulation in nodules: in the control plant, leghemoglobin was found in 56.7% of the nodules and increased to 83.3% in the plant exposed to 30 g of oil for 120 days.

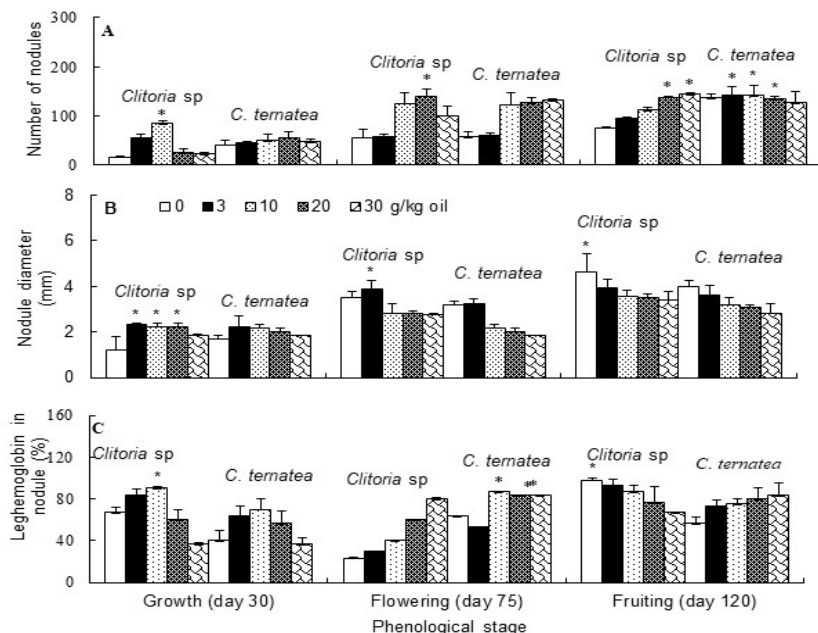


Figure 3 Effect of oil on number of nodule (A), nodule diameter (B) and presence of leghemoglobin in nodule (C) according to phenological stage of plants of *Clitoria sp.* and *Clitoria tematea* exposed to oil for 120 days. Values represent mean  $\pm$  SD, n = 4. Asterisk within each phase indicate significant difference at the 5% level according to the LSD test.



### 3.4 EFFECT OF OIL ON THE ACCUMULATION OF CRUDE PROTEIN IN FOLIAGE AND POD

The crude protein contents in the foliar biomass and in the pod of both plant species registered statistical differences (Figure 4). The amounts of protein in leaves were higher in Clite in the three stages evaluated (Figure 4A). On day 30 the values fluctuated from 9.08 to 15.7% in Clisp and in Clite from 12.35 to 18.43%, in the flowering stage it varied from 15.92 to 19.14% in Clisp and changed to 14.51 to 21.22% in Clite, finally, in the fruiting protein amounts in Clisp decreased in the range 13.63 to 14.87% and increased to 18.03 to 20.69% in Clite. The oil effect caused inverted U-type hormesis in both species during flowering and fruiting (Table 2) but hormesis did not occur in the initial growth stage. The crude protein accumulated in the pod of both legumes shows a constant decrease as the amount of oil in the soil increases (Figure 4B). The highest amount of protein in Clisp was 20.67% in the pod of the plant established in the soil without oil and decreased to 13.87% in the soil with 30 g of oil, the reduction was 49% compared to the control plant. The information corresponding to Clite registered a similar trend, the lowest was 13.85% in the most contaminated soil and increased to 21.17% in control soil, this represents 53% less protein (Figure 4B). The relationship between oil and crude protein in foliage biomass was affected ( $-0.710^{**}$ ) in the growth stage but not in flowering or fruiting. The correlation between the protein content in the pod and the oil dose was also negative ( $-0.923^{**}$ ) in the fruiting stage.

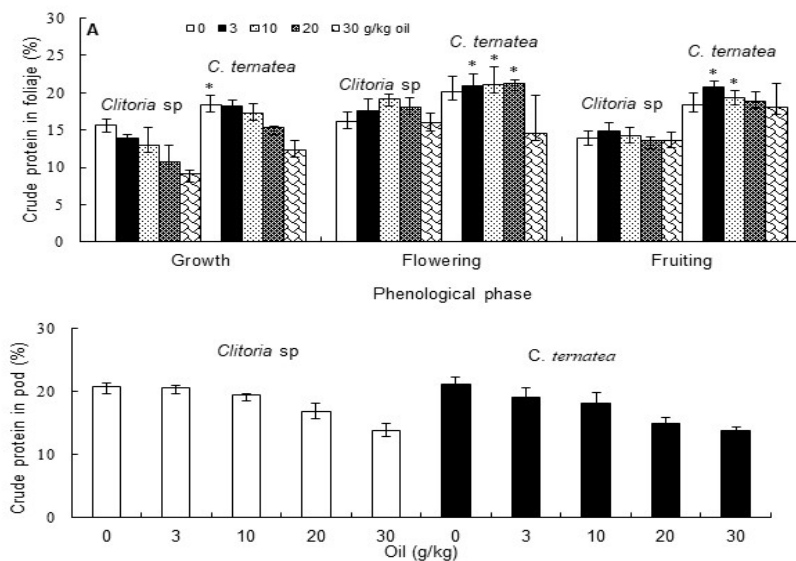


Figure 4 Accumulation of crude protein in aerial biomass (A) and in pod (B) of plants of *Clitoria* sp and *Clitoria ternatea* exposed for 120 days to different doses of crude oil. Values represent mean  $\pm$  SD, n 4. Asterisk within each phase indicate significant difference at the 5% level according to the LSD test.

## 4 DISCUSSION

### 4.1 EFFECT OF OIL ON PLANT GROWTH

Oil inhibited plant growth in all three phenological stages. The higher PL and GR of Clisp with respect to Clite was different because it registered, in less time, adaptation to oil during the first 30 days in the vegetative growth stage. The best response of the growth of Clisp is associated with the greater amount of the root system, it suggests greater absorption of nutrients, therefore this explains the greater daily growth rate. The best adaptation and tolerance of Clisp to oil occurred, probably, because it is a wild plant sensitive to environmental stimuli, but not Clite, which is a forage species introduced from Australia to Mexico in 1968 (Córdoba and Ramírez 1993), it has been improved in Mexico for half a century using conventional genetic procedures (Bravo, 1971; Villanueva et al., 2004; Medel et al., 2012; García-Ferrer et al., 2015). It is known that the stem and the root are structures capable of maintaining indefinite growth due to the permanent activity of vegetative meristems, which respond to adaptation to environmental changes and activate new development programs (Segura, 2013).

Our results show that the PL and GR of both species of *Clitoria*, exposed to 0, 3, 20 and 30 g of oil, show similar trends in the three phenological stages. Although the literature consulted only reports global data, that is, it does not separate the effect according to the phenological stage, different species of legumes exposed to TPH, or its derivatives, originate the decrease in PL (Adieze et al., 2012; Bento et al., 2012; Rivera-Cruz et al., 2012; Kreslavski et al., 2014) but in other cases hormetic effects occur because the pollutant promotes plant growth (Radwan et al., 2005; Bento et al., 2012; Kummerová et al., 2013; Agoun-Bahar et al., 2019; Walakulu et al., 2020).

In the first case, there are reports indicating that the height of *Centrosema* sp and *Pueraria* sp legumes is inhibited by exposure to soil contaminated with 10% oil, but 1% stimulated 6.4% the height of *Centrosema* sp (Adieze et al., 2012), our results also coincide in the decrease in the height of the legume *Leucaena leucocephala* exposed to 5 and 7.8% of fresh crude oil and also weathered (Rivera-Cruz et al., 2012). Other results (Bento et al., 2012) show that the plant response to exposure varies according to the species and type of oil. *Acacia angustissima* and *Mimosa caesalpinifolia* plants grew without limitations despite the presence of high levels of oil, on the other hand, *Mimosa artemisiiana* significantly decreased its growth (Bento et al., 2012). Regarding polyaromatic hydrocarbons, the effect of doses lower than 4 mg of naphthalene induces the growth of *Pisum sativum* and also the plant conserved the chlorophyll and carotenoid contents (Agoun-Bahar et al. 2019) but 7 mg/kg of fluoranthene caused toxic effects and inhibited

the growth of the root of *Pisum sativum* (Kummerová et al., 2013). Our results highlight that the PL of Clisp was greater in the growth stage (day 30) than that of Clite, but over time in the flowering stages (day 75) and fruiting (day 120) the length registered the same trend and scale in both species, it was only different in the Clisp flowering. The GR was higher in the growth, in the following two stages it decreased and it was similar, possibly caused by processes associated with the adaptation of the plant.

Oil causes alterations in the soil, in plant tissues and cells, also in the photosynthetic process. The hydrophobic effect causes a severe decrease in humidity in the soil, the loss of humidity reaches up to 58% of the field capacity, so that the nutrient transport decreases (Trujillo-Narcía et al., 2012), this causes nutritional disorders causing lower plant growth, incidence of chlorosis and foliar necrosis (Römheld, 2012). The repercussions on the tissue and the plant cell are manifested in the reduction of root hair growth, deformation of the primordia of the lateral roots, reduction of the cells of the rhizodermis and of the outer layers of the primary cortex, as well as the formation of white spots that later turn into necrotic lesions (Alkio et al., 2005; Kummerová et al., 2013). Other phytotoxic effects are revealed in the deformation of the chloroplast and the mitochondria, causing the collapse of these cellular structures (Liu et al., 2009). Although oil causes toxic effects in all plant organs, the ability to adapt to oil suggests new physiological processes associated with the radical exudates that induce hormesis. In this regard, it has been reported that as the time of exposure of the root to oil increases, it manages to break the surface tension in the soil through radical exudates such as suberin, which favors the exchange of nutrients (Newman and Reynolds, 2004), which suggests that it is an adaptation process represented by the expansion of the root system that improves the absorption and transport of nutrients.

#### 4.2 EFFECT OF OIL ON THE PRODUCTION OF PLANT BIOMASS

Oil caused phytotoxic effects in the biomass production of the legumes studied. The decrease in the amounts of leaf-stem, root and nodule biomass throughout the vegetative cycle was inversely related to the dose of oil incorporated into the soil. Unlike the ability of *Leersia hexandra* grass, which has the hormetic capacity to inhibit the decrease in root and leaf biomass (Orocio-Carrillo et al., 2019), various species of legumes are affected when exposed to oil. The legumes *Centrosema brasilianum* and *Calopogonium mucunoides* decreased biomass up to 15% due to the effect of 5% crude oil (Merkl et al., 2004), the same effect was caused by the polyaromatic phenanthrene, anthracene and fluorene in *Phaseolus vulgaris* (Paškova et al., 2006), the legumes *Pueraria* sp and *Centrosema* sp were also affected by exposure to 5 and 10% crude oil.

The root and fruit biomass in Clisp sp and Clite are sensitive to exposure to day 30, 75 and 120 of oil. The root is the first organ to be fully exposed to contaminants in the soil and therefore the effect on the roots is important in evaluating the susceptibility of plants to contaminants (Rivera-Cruz et al., 2012; Walakula et al. 2020). Root growth involves various biochemical and physiological processes (Masakorala et al., 2013a). Our findings of the negative effect of root oil are in agreement with previous studies on *Medicago sativa*, *Vigna radiata*, *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* grown in soil with hydrocarbons (Schwab et al., 2006; Masakorala et al., 2013b; Arias-Trinidad et al., 2017; Akhter et al., 2018). The inhibition recorded in the production of root biomass in Clisp and Clite at days 30, 75 and 120 of exposure to oil suggests that the composition of medium fresh oil that are hydrophobic compounds (e.g., benzene, toluene, ethylbenzene and xylene and short-chain aliphatic compounds) that can bind to the root surface, creating a hydrophobic environment that leads to limited water and nutrient uptake by the plant (Li et al., 1997; Issoufi et al., 2006; Trujillo-Narcía et al., 2012). The lack of exchange of solutes from the outside to the inside of the root cell alters the activity of the apical meristem in the formation of young cells and secondary roots at the tip of the root (Salisbury and Ross, 2000).

Another organ that decreases due to the oil effect is the fruit biomass in Clisp and Clite, it suggests that the contaminant was a stress factor that altered the route of transmission of information and gene regulation (Tadeo-Gómez and Cárdenas, 2013) altering the pollen-stigma protein recognition that inhibits the development of the pollen tube in the flower, which is basic for the formation of the seed (Agustí, 2013). However, in general Clisp produced higher pod biomass (8.86 g) compared to Clite with 7.72 g (Table 3).

The foliar biomass of Clisp to contaminated sites is stimulated by low doses of oil at days 31, 75 and 120 of oil exposure, suggesting that the processes of cell division, growth and elongation in aerial apical meristems develop in a more intense compared to Clite to form stem and leaf (Salisbury and Ross, 2000) as a response to stress induced by the contaminant. Flower formation in Clisp was stimulated by low and medium doses of oil, while Clite by low doses, an inverted U-shaped hormetic response (Table 2).

The increase in foliar biomass and flowers due to oil stress in the soil suggests the overcompensation and alteration of homeostasis in these legumes, which has been described as a response to organic and inorganic chemical substances from plants (Stebbing, 1982; Calabrese and Baldwin, 1997). It has also been suggested that this growth stimulus at low concentrations of a compound may be due to a feedback mechanism; and physiological control mechanisms in organisms are believed to have evolved to overreact to a small deviation from the physiological norm (Stebbing, 1982; Swart et al., 1995). Some

authors have even suggested that petroleum hydrocarbons may be promoters of plant growth and reproduction (Maliszewska-Kordybach and Smreczak, 2000).

#### 4.3 EFFECT OF OIL ON THE NUMBER, SIZE AND PRESENCE OF LEGHEMOGLOBIN OF NODULES

The exposure of both species of *Clitoria* to the five doses of oil for 120 days, caused different effects in the three phenological stages evaluated. According to our results, the number of nodules registered a hormetic response (Table 2) due to the influence of oil, promoted the formation of this important plant organ in the biological fixation of N. The distribution of the number of nodules per plant was variable but always greater in soils contaminated with 20 to 30 g of petroleum. Different studies coincide with our results because the amount of nodules increases, for example in *Vicia faba* exposed to 1% oil (Radwan et al., 2005) but other scientific reports identified that both oil in doses of 3 and 5% and with 75 mg of polycyclic aromatic hydrocarbons affected the formation and growth of nodules in *Medicago sativa* plants (Wetzel and Werner, 1995), *Centrosema brasilianum* and *Calopogonium mucunoides* (Merkl et al., 2004), and by effect of 60 to mg 80 mg of anthracene and pyrene over *Pachyrhizus erosus* and *Clitoria ternatea* (Somtrakoon et al., 2018).

The stimulation of NB in Clisp and Clite stands out with a J-shaped hormetic dose-response curve at day 30, and an inverted-U-shaped dose-response curve of Clite at days 75 and 120 induced by exposure to low dose (3 and 10 g of oil). This information suggests that Clite in the three times exposed to fresh oil regulates environmental stress by increasing plant cell division in the root, rhizobium site of interaction for the formation of nodule cell mass which is the site where rhizobium fixes N<sub>2</sub> and reduces to ammonia (Madigan et al., 2015). Another factor that influences the behavior of the NB is the relationship with the NN; at day 30 highly significant and positive relationship NB\*NN (0.648\*\*), at day 75 highly significant negative (-0.547\*\*) and at day 120 without any relationship between these variables.

An explanation of these relationships may be that the NN in Clisp and Clite at days 30, 75 and 120 present dose-response curves in the form of J (Figure 3A) while the NB in Clisp and Clite presents three different dose response curves (Figure 2C). The increase in NN suggests that *Clitoria* in oiled soil stimulates the release of flavonoids and the release of nod-factors by rhizobium multiplying in the rhizosphere (Lambers et al., 1998), rhizobium adhere to the root hairs of *Clitoria*, forms the infection filament, and the plant cell divides forming the nodule (Madigan et al., 2015). Similar results have been

reported in soil contaminated with chromium, where *Trifolium* is capable of nodulation, although chromium concentrations are lethal for a free-living rhizobium. The fact shows how symbiosis can offer bacteria a permissive niche in a toxic environment (Suartini, 2001).

#### 4.4 EFFECT OF OIL ON THE ACCUMULATION OF CRUDE PROTEIN IN FOLIAGE AND PODS

The crude protein content registered statistical differences in the three phenological stages in the aerial biomass (leaf) and also in the sheath of Clisp and Clite. The results show that the effect of doses of 3, 10 and 20 mg/kg of HTP caused hormesis in Clisp and Clite during flowering and fruiting (days 75 and 120) but not in the initial growth stage (day 30). On the other hand, the effect of oil, on the leaf and on the pod, was reverse hormesis since the plant reduced protein production in both species. This positive plant response is associated with adaptation mechanisms probably related to light growth factors, water, CO<sub>2</sub> and mineral nutrients (Gárate and Bonilla, 2013) which are the most important growth factors. The accumulation of protein in the plant is the result of physiological processes in the plant that interact with various environmental components. The factors light, temperature, air humidity, water availability, mineral nutrient content in the soil and carbon dioxide influence photosynthesis, in turn growth and the differentiation of plant organs (Azcon-Bieto et al., 2013). The content of essential nutrients in plant tissues is explained by the interaction of the genetic endowment, the availability of nutrients in the soil and by the phenological moment or age of the plant according to the organ or plant tissue considered (Gárate and Bonilla 2013). Unlike Orocio-Carrillo et al. (2019) that identified a strong hormetic effect in the exposure of *Leersia hexandra* grass up to 238 g/kg of TPH, our results show that Clisp and Clite can adapt to low doses of less than 30 g of TPH. Other studies have also shown that *Leucaena leucocephala* was also damaged and that the amount of N in plant tissue decreased sharply (Rivera-Cruz et al., 2012). The decrease in protein content may be related to the damage that oil causes in root hairs, cells, chloroplasts and mitochondria (Alkio et al., 2005; Liu et al., 2009; Kummerová et al., 2013), in the same way to the decrease in available water in the soil induced by the hydrophobic effect of oil (Li et al., 1997; Trujillo-Narcía et al., 2012).

#### 5 CONCLUSION

The effect of the combination species-dose-time of exposure to oil induced a better response in growth, biomass, number and diameter of nodules, as well as in the accumulation of crude foliar and pod protein in *Clitoria ternatea*.

*Clitoria* sp is a wild legume with a greater tendency to form hormesis in response to variables of growth, production, nodulation and raw protein accumulation. *Clitoria* sp showed 31 dose-response curves in the form of hormesis, while *C. ternatea* 26, in addition *Clitoria* sp formed higher root and aerial dry biomass, and also accumulated 17 and 18% aerial and pod protein. These responses suggest recommending the wild species *Clitoria* sp for establishment in environments stressed by oil contamination.

## REFERENCES

- Adieze, IE., Orji, JC., Nwabueze, RN. & Onyeze, GOC. (2012). Hydrocarbons stress response to four tropical plants in weathered crude oil contaminated soil in microcosms. *International Journal Environment Stud*, 69(3), 490-500. <https://doi.org/10.1080/00207233.2012.665785>
- Agoun-Bahar, S., Djebbar, R., Achour, N. & Abrous-Belbachir, O. (2019). Soil-to-plant transfer of naphthalene and its effects on seedlings pea (*Pisum sativum* L.) grown on contaminated soil. *Environmental Technology*, 40(28), 3713-3723. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1485752>
- Agustí, M. (2013). Crecimiento y Maduración del Fruto. In: Azcón-Bieto, J. & Talón, M. (Eds), *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (pp. 519-535). McGraw-Hill Interamericana de España, S.L.
- Akhter, A., Iqbal, M.Z., Shafiq, M., Kabir, M. & Farooqi, Z.U.R. (2018). Effects of crude oil polluted soil on the growth of legume crop species *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Biosci research*, 1(2), 1334-1341.
- Alkio, M., Tabuchi, T.M., Wang, X. & Colon-Carmona, A. (2005). Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *Journal Experimental Botany*, 56 (421), 2983-2994. <https://doi:10.1093/jxb/eri295>
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1980) *Official Methods of Analysis*, 13th edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- Arias-Trinidad, A., Rivera-Cruz, M.C. & Trujillo-Narcía, A. (2017). Fitotoxicidad de un suelo contaminado con petróleo fresco sobre *Phaseolus vulgaris* L. (Leguminosae). *Revista Internacional Contaminación Ambiental*, 33(3), 411-419. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.03.05>
- Azcon-Bieto, J., Fleck, I., Aranda, J. & Gómez-Casanovas, N. (2013). Fotosíntesis, Factores Ambientales y Cambio Climático In: Azcón-Bieto J, Talón, M. (Eds), *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (pp. 247-264), McGraw-Hill Interamericana de España, S.L.
- Bento, R.A., Saggin-Júnior, O.J., Pitard, R.M., Stralioetto, R., da Silva, R.E.M., Tavares, L.S.R., de Landa, G.F.H.T., Martins, L.F. & Volpon, T.A.G. (2012). Selection of leguminous trees associated with symbiont microorganisms for phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Water Air Soil Pollution*, 223(9), 5659-5671. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1305-3>
- Bonilla, I. (2013). Introducción a la Nutrición Mineral de las Plantas. Los Elementos Minerales In: Azcón-Bieto, J. & Talón, M. (Eds), *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. (pp. 103-121). McGraw-Hill Interamericana de España, S.L.
- Bouyoucos, G. (1962). Hydrometer method for particle-size analysis of soils. *Agronomy Journal*, 54(5), 464-465. <https://doi.org/10.2134/agronj1962.00021962005400050028x>
- Brady, C.N. & Weil, R.R. (2008). *The Nature and Properties of Soils*. Pearson Prentice Hall, New Jersey, Ohio, USA CABI (Centre for Agricultural Bioscience International).

- Bravo, O.F. (1971). Estudios sobre la composición química de la semilla de *Clitoria ternata* Linn (sic). *Técnica Pecuaria Mexicana*, 18, 97-100.
- Calabrese, E.J. & Baldwin, L. (1997). The dose determines the stimulation (and poison): development of a chemical hormesis database. *International Journal Toxicology*, 16(6), 545-555. <https://doi.org/10.1080/109158197226874>
- Calabrese, E.J. & Blain, R.B. (2009). Hormesis and plant biology. *Environment Pollution*, 157(1), 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.07.028>
- Calabrese, E.J. (2012). Hormesis: improving predictions in the low-dose zone. In: Luch, A. (Ed.) *Molecular, clinical and environmental toxicology*, vol 101. *Experientia*, Amherst, MA, USA. <https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4-19>
- CharvetInckot, R., Santos, G. de O., Souza, L.A. & Bona, C. (2011). Germination and development of *Mimosa pilulifera* in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206(3), 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2010.09.005>
- Cooper, J.E. & Scherer, H.W. (2012). Nitrogen Fixation. In: Marschner P (Ed.) *Marschner's Minerals Nutrition of Higher Plants*, (pp. 389-408), Academic Press Elsevier.
- Córdoba, B.R. & Ramírez, R.R. (1993). Conchita azul *Clitoria ternatea* cv Tehuana, leguminosa forrajera en el Istmo de Tehuantepec. Folleto Técnico N° 2. CIR-PS. Campo Agr. Exp. "Istmo de Tehuantepec", INIFAP-SAGAR. México.
- Correa, A.M.L., Mendonça, V.R.A., Silva, R.N., Pavesi, A.R., Siqueira, G.L., Magno, F.A., Drude, L.P. & Gesualdi, J.A. (2014). *Clitoria ternatea* L. as a potential high quality forage legume. *Asian Australian Journal Animal*, 27(2), 169-178. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2013.13343>
- DOF. (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación. D.F. México. <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69255.pdf>
- Eaton, D.L. & Klaassen, C.D. (2003). Principles of Toxicology. In: Klaassen, C.D. & Watkins, J.B. III (Eds) *Casarett and Doull's Essentials of Toxicology*. (pp. 6-20), McGraw-Hill.
- Gárate, A. & Bonilla, I. (2013). Nutrición Mineral y Producción Vegetal In: Azcón-Bieto, J. & Talón M. (Eds), *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, (pp. 143-164). McGraw-Hill Interamericana de España, S.L.
- García-Ferrer, L., Bolaños-Aguilar, E.D., Ramos-Juárez, J., Osorio, A.M. & Lagunes-Espinoza, L.C. (2015). Rendimiento y valor nutritivo de leguminosas forrajeras en dos épocas del año y cuatro edades de rebrote, *Revista Mexicana Ciencia Pecuaria*, 6(4), 453-468.
- Gomez, S.M. & Kalamani, A. (2003). Butterfly pea (*Clitoria ternatea*): A nutritive multipurpose forage legume for the tropics - an overview. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(6),374-379.
- González-Moscoso, M., Rivera-Cruz, M.C. & Trujillo-Narcía, A. (2019). Decontamination of soil containing oil by natural attenuation, phytoremediation and chemical desorption. *International Journal Phytoremediation*, 21(8), 768-776. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1566879>
- Hunt, R., Causton, D.R., Shipley, B. & Askew, P. (2002), A modern tool for classifical plant growth analysis. *Annal Botany*, 90(4), 485-488. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf214>
- Issoufi, I., Rhykerd, R.L. & Smiciklas, K.D. (2006). Seedling growth of agronomic crops in crude oil contaminated soil. *Journal Agronomy Crop Science*, 192(4),310-317. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2006.00212.x>



Jain, N.N., Ohal, C.C., Shroff, S.K., Bhutada, R.H., Somani, R.S., Kasture, V.S. & Kasture, S.B. (2003). *Clitoria ternatea* and the CNS. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 75 (2003), 529-536. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(03\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(03)00130-8)

Jamil, N., Mohd, Z.N.M., Mohd, N.A.N. & Pa'ee. (2018). Influences of environmental conditions to phytoconstituents in *Clitoria ternatea* (Butterfly Pea Flower). A Review. *Journal Science Technology*, 10(2), 208-228. <https://doi.org/10.30880/jst.2018.10.02.029>

Jones, J.B., Wolf, B. & Mills, H.A. (1992). Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide. Micro-Macro Publishing, Inc., USA

Kreslavski, V.D., Lankin, A.V., Vasilyeva, G.K., Luybimov, V.Y., Semenova, G.N., Schmitt, F.-J., Friedrich, T. & Allakhverdiev, S.I. (2014). Effects of polyaromatic hydrocarbons on photosystem II activity in pea leaves. *Plant Physiology Biochemistry*, 81, 135-142. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.02.020>

Lambers, H., Chapin, III F.S. & Pons, T.L. (1998). Plant Physiological Ecology. Springer-Verlag.

Li, X., Feng, Y. & Sawatsky, N. (1997). Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. I. Plant growth. *Plant and Soil*, 192(2), 219-226. <https://doi.org/10.1023/A:1004280626976>

Liu, H., Weisman, D., Ye, Y., Huang, Y., Colón-Carmona, A. & Wang, Z. (2009). An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 176(3), 375-382. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.12.002>

Madigan, T.M., Martinko, M.J., Bender, S.K., Buckley, H.D. & Stahl, A.D. (2015). Brock. Biología de los Microorganismos, Pearson Educación S.A.

Maliszewska-Kordybach, B. & Smreczak, B. (2000). Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) effect on plants. *Environment Technology*, 21(10), 1099-1110. <https://doi.org/10.1080/09593330.2000.9618996>

Marín, A., Carías, D., Cioccia, A.M. & Hevia, P. (2003). Valor nutricional de los forrajes de *Musa paradisiaca* y *Clitoria ternatea* como diluyentes de raciones para pollos de engorde. *Interciencia* 28(1), 51-56. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33907680>

Martí, M.C., Camejo, D., Fernández-García, N., Rellán-Álvarez, R., Marques, S., Sevilla, F. & Jiménez, A. (2009). Effect of oil refinery sludges on the growth and antioxidant system of alfalfa plants. *Journal Hazard Mater*, 171(1-3), 879-885. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.083>

Masakorala, K., Yao, J., Guo, H., Chandankere, R., Wang, J., Cai, M., Liu, H., & Choi, M.M.F. (2013a). Phytotoxicity of long-term total petroleum hydrocarbon-contaminated soil - A comparative and combined approach. *Water Air Soil Pollution*, 224(10), 1553-1565. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1553-x>.

Masakorala, K., Yao, J., Chandankere, R., Yuan, H., Liu, H., Yu, C. & Cai, M. (2013b). Effects of petroleum hydrocarbon contaminated soil on germination, metabolism and early growth of green gram, *Vigna radiata* L. Bulletin Environment Contamination Toxicology, 91(2), 224-230. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1042-3>.

Medel, C.C.I., Joaquín, T.B.M., Sánchez, H.M.A., Parra, L.L.P., Joaquín, C.S., Gómez, V.A. & Hernández, G.A. (2012). Evaluación de la distancia entre plantas sobre el rendimiento y calidad de semilla de *Clitoria ternatea* L. cv. Tehuana. *Tropical Subtropical Agroecosystem*, 15(3), 489-497. Mejía, M.M. (1984). Nombres científicos y vulgares de especies forrajeras tropicales. Scientific and common names of tropical forage species. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia.

Merkel, N., Schultze-Kraft, R. & Infante, C. (2014). Phytoremediation in the tropics - The effect of crude oil on the growth of tropical plants. *Bioremediation Journal*, 8(3-4), 177-184. <https://doi.org/10.1080/10889860490887527>

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*, 7(9), 405-410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)

Newman, L.A. & Reynolds, C.M. (2004). Phytoremediation of organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(3), 225-230. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.04.006>

Orocio-Carrillo, J.A., Rivera-Cruz, M.C., Aranda-Ibañez, M.E., Trujillo-Narcía, A., Hernández-Galvez, G. & Mendoza-López, M.R. (2019). Hormesis under oil-induced stress in *Leersia hexandra* Sw. used as phytoremediator in clay soils of the Mexican humid tropic. *Ecotoxicology* 28(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02106-1>

Pašková, V., Hilscherová, K., Felmannová, M. & Bláha, L. (2006). Toxic effects and oxidative stress in higher plants exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their *N*-heterocyclic derivatives. *Environmental Toxicology Chemistry*, 25(1), 3238-3245. <https://doi.org/10.1897/06-162R.1>

Plice, J.M. (1949). Some effects of crude petroleum on soil fertility. *Soil Science Society of America Journal*, 13(C), 413-416. <https://doi.org/10.2136/sssaj1949.036159950013000C0075x>

Radwan, S.S., Dashti, N. & El-Nemr, I.M. (2005). Enhancing the growth of *Vicia faba* plants by microbial inoculation to improve their phytoremediation potential for oily desert áreas. *International Journal Phytoremediation*, 7(1), 19-32. <https://doi.org/10.1080/16226510590915783>

Rivera-Cruz, M.C., Trujillo-Narcía, A., Miranda. de la C.M.A. & Maldonado-Chávez, E. (2005). Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleo nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia*, 30(6), 326-331.

Rivera-Cruz, M.C., Maldonado-Chávez, E. & Trujillo-Narcía, A. (2012). Effects of crude oil on the growth of *Brachiaria mutica* and *Leucaena leucocephala* and on soil and plant macronutrients. *Tropical Subtropical Agroecosystem*, 15(Sup 2), S30-S39.

Rivera-Cruz, M.C., Trujillo-Narcía, A., Trujillo-Rivera, E.A., AriasTrinidad, A. & Mendoza- López, M.R. (2016). Natural attenuation of weathered oil using aquatic plants in a farm in southeast Mexico. *International Journal and Phytoremediation*, 18(9), 877-884. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1156632>

Römheld, V. (2012). Diagnosis of Deficiency and Toxicity of Nutrients. In: Marschner P (ed.) *Marschner's Minerals Nutrition of Higher Plants*, (pp. 299-312). Academic Press Elsevier.

Sadat, N.A., Zare, M. & Alaie, E. (2014). *Leucanthemum vulgare* Lam. germination, growth and mycorrhizal symbiosis under crude oil contamination. *International Journal the Phytoremediation*, 16(9), 962-970. <https://doi.org/10.1080/15226514.2013.810577>

Salisbury, B.F. & Ross, W.C. (2000). *Fisiología de las Plantas. Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental*. Paraninfo. Thomson Editores.

SAS (Statistical Analysis Systems). (2005). *User's guide, version 9.1.3*. SAS Institute, Inc, Cary, NC, p. 664.

Schwab, P., Banks, M.K. & Kyle, A. (2006). Heritability of phytoremediation potential for the alfalfa cultivar riley in petroleum contaminated soil. *Water Air Soil Pollution*, 177(1-4), 239-249. <https://dx.doi.org/10.1007/s11270-006-9161-7>

Segura, J. (2013). Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. In: Azcón-Bieto J, Talón M (eds) Fundamentos de Fisiología Vegetal, (pp. 351-376). McGraw-Hill Interamericana de España, S.L.

Somtrakoon, K., Chouychai, W. & Lee, H. (2018). Potential of butterfly pea (*Clitoria ternatea*) and yam bean (*Pachyrhizus erosus*) plants for phytoremediation of anthracene- and pyrene-contaminated soil. *Songklanakarin Journal Science Technology*, 40(3), 725-731.

Stebbing, A.R.D. (1982). Hormesis-The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science Total Environmental*, 2(3), 213-234. [https://doi: 10.1016/0048-9697\(82\)90066-3](https://doi:10.1016/0048-9697(82)90066-3)

Suárez, H., Mercado, W., Ramírez, M., Bracho, B., Rivero, J. & García, D.E. (2012). Caracterización morfoagronómica y evaluación del contenido proteínico en dos genotipos de *Clitoria ternatea* L. cultivados en un sistema de espalderas. *Pastos y Forrajes*, 35(4),365.380.

Suartini, A. (2001). Functional Ecology of Rhizobium-Legume Symbiosis. In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (Eds). The Rhizosphere Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface. (pp. 297-326) Marcel Dekker.

Swart, R., Schults, D.W., Ozretich, R., Lamberson, J.O., Cole, F.A., De Witt, T.H., Redmond, M.S. & Ferraro, S.P. (1995). PAH: a model to predict the toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures in field-collected sediments. *Environmental Toxicology Chemistry*, 14(11), 1997-1987. <https://doi:10.1002/etc.5620141120>

Tadeo R, & Gómez-Cárdenas A (2013) Fisiología de las Llantas y el Estrés. In: Azcón-Bieto J, Talón M (eds) Fundamentos de Fisiología Vegetal (pp. 577-598). McGraw-Hill Interamericana de España, S.L.

Trujillo-Narcía, A., Rivera-Cruz, M.C., Lagunes-Espinoza, L.C., Palma-López, D.J., Sánchez-Soto S. & Ramírez-Valverde, G. (2012). Efecto de la restauración de un Fluvisol contaminado con petróleo crudo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 28(4), 361-374.

Walakulu, G.S.S., Masakorala, K., Brown, T.M. & Gamage, W.K.M.S. (2020). Tolerance of *Impatiens balsamina* L. and *Crotalaria retusa* L. to grow on soil contaminated by used lubricating oil: A comparative study. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 188, 109911. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109911>

Walkley A, Black IA (1934) An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci* 37(1):29-38. <https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>

# CAPÍTULO 11

## BACTERIAS CELULOLÍTICAS Y XILANOLÍTICAS AISLADAS DE LAS SALINAS DE CACHIYACU DE LUPUNA EN PERÚ

Data de submissão: 21/12/2022

Data de aceite: 10/01/2023

**Elizabeth Liz Chávez Hidalgo**

Universidad Nacional Mayor de  
San Marcos

Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Laboratorio de Biología Molecular

Lima - Perú

<https://orcid.org/0000-0002-2333-4201>

**RESUMEN:** Este estudio tuvo como objetivo aislar y caracterizar bacterias productoras de celulasas y/o xilanasas de las salinas de Cachiyacu de Lupuna. La evaluación de la producción de celulasas y xilanasas se realizó utilizando medios de cultivo suplementados con carboximetilcelulosa al 0,5% y xilano al 1%, respectivamente. Luego se realizaron pruebas fisiológicas, bioquímicas y nutricionales a los aislados que hidrolizaron carboximetilcelulosa y/o xilano. Además, se evaluó la producción de otras enzimas hidrolíticas con sustratos como almidón, *tween* 80 y *skim milk*. Se obtuvieron 141 bacterias, de las cuales 18 aislados hidrolizaron carboximetilcelulosa, 14 aislados hidrolizaron xilano y un aislado hidrolizó ambos sustratos. El 74.19% (23/31) de los aislados son Gram positivos, el 32.25% (10/31)

crece en un rango de NaCl entre 0.5 y 20.0% y el 19.35% (6/31) en un rango de pH entre 6 y 9. En cuanto a la producción de otras enzimas hidrolíticas, el 35.48% (11/31) de los aislados presentaron actividad amilolítica, el 25.80% (8/31) actividad lipolítica y el 32.25% (10/31) actividad proteolítica. Las bacterias aisladas son fuentes para la producción de celulasas y xilanasas con gran potencial biotecnológico. **PALABRAS CLAVES:** Celulasas. Xilanasas. Bacterias halotolerantes.

### CELLULOLYTIC AND XYLANOLYTIC BACTERIA ISOLATED FROM CACHIYACU OF LUPUNA SALTERN IN PERU

**ABSTRACT:** This study aimed to isolate and characterize bacteria that produce cellulases and/or xylanases from Cachiyacu of Lupuna salterns. The evaluation of cellulases and xylanases production was made with culture media supplemented with 0.5% carboxymethyl cellulose and 1% xylan, respectively. Physiological, biochemical and nutritional tests were made on the isolates that hydrolyzed carboxymethyl cellulose and/or xylan. In addition, the production of other hydrolytic enzymes was evaluated with substrates such as starch, tween 80 and skim milk. 141 bacteria were obtained, of which 18 isolates hydrolyzed carboxymethyl cellulose, 14 isolates hydrolyzed xylan, and one isolate hydrolyzed both substrates. The 74.19% (23/31) of the isolates are Gram positive,

32.25% (10/31) grow in a range of NaCl between 0.5 and 20.0% and 19.35% (6/31) in a range of pH between 6 and 9. Regarding the production of other hydrolytic enzymes the 35.48% (11/31) of the isolates amyolytic activity show, 25.80% (8/31) lipolytic activity and 32.25% (10/31) proteolytic activity. The bacteria isolated are sources for the production of cellulases and xylanases with have great biotechnological potential.

**KEYWORDS:** Cellulases. Xylanases. Halotolerant bacteria.

## 1 INTRODUCCIÓN

Las celulasas son enzimas que participan en la hidrólisis de los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 presentes en la celulosa y se clasifican en tres grupos: Endocelulasas, exocelulasas y  $\beta$ -glucosidasas. Los géneros bacterianos productores de celulasas reportados en diversos estudios son: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bactreiodes*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Eubacterium*, *Geobacillus*, *Microbispora*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Salinivibrio*, *Rhodothermus*, *Acetivibrio*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Thermobispora*, *Ruminococcus*, *Streptomyces*, *Thermonospora*, *Thermobifida*, *Kallotenue*, *Ornatilinea*, *Alicyclobacillus*, *Anaerobacterium*, *Caldicellulosiruptor*, *Herbinix*, *Siphonobacter*, *Cellulosimicrobium*, *Paracoccus*, *Ochrobactrum* y *Oricola* (Menéndez et al., 2015). Estas enzimas son utilizadas en el procesamiento del algodón, la industria alimentaria, la industria de lavandería y detergentes, la industria textil, la industria del papel, la producción de biocombustibles, la agricultura y la medicina (Menéndez et al., 2015; Jayasekara y Ratnayake, 2019).

En cuanto a las xilanasas son un grupo de enzimas que actúan en conjunto y sinérgicamente para degradar el xilano en azúcares simples. Los géneros bacterianos productores de xilanasas son *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Pseudoxanthomonas* y *Rhodothermus* (Chakdar et al., 2016). Las xilanasas son aplicadas en la industria del papel, la industria alimentaria, en la recuperación de azúcares de los residuos agrícolas para la producción de biocombustibles y la industria farmacéutica (Chakdar et al., 2016).

La importancia de sus aplicaciones ha llevado a la búsqueda de bacterias nativas productoras de celulasas y/o xilanasas, a mejoras en la producción y la purificación de estas enzimas, algunos trabajos relacionados a la búsqueda y caracterización de bacterias celulolíticas y/o xilanolíticas realizados son los siguientes:

Makhdoumi et al. (2011) Caracterizaron microorganismos halófilos de ambientes hipersalinos del desierto de Irán que presentaron diversas actividades hidrolíticas. La actividad celulolítica y xilanolítica fue evaluada en medios de cultivo sólidos con carboximetilcelulosa 0.5% y xilano 1% respectivamente. Para la caracterización molecular amplificaron los genes ribosómicos 16S. De un total de 293 aislados 7 hidrolizaron

carboximetilcelulosa y un aislado el xilano. Los géneros encontrados fueron *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Natrinema*, *Halovivax* y *Natronomonas*.

Attri y Garg (2014) Aislaron y caracterizaron bacterias de residuos agroindustriales de naranja y avena. La actividad celulolítica y xilanolítica fue evaluada con celulosa al 0.25% y xilano al 0.25% respectivamente, para revelar las placas y observar los halos de hidrólisis utilizaron una solución de rojo de Congo al 0.5%. De un total de 33 aislados bacterianos 10 aislados hidrolizaron xilano y 12 celulosa.

Viteri et al. (2016) Aislaron y caracterizaron bacterias de muestras de suelo de bosques nativos y fincas productoras de cereales. De los 97 aislados 20 mostraron halos de hidrólisis al ser cultivados en medios suplementados con carboximetilcelulosa utilizando la prueba del rojo Congo. Los géneros con actividad celulolítica reportados en este estudio son: *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Erwinia*.

Zerva et al. (2019) Estudiaron la diversidad y el potencial biotecnológico de los microorganismos presentes en los residuos del procesamiento de la naranja. Aislaron un total de 24 cepas microbianas usando medios de cultivo sólido donde el xilano fue la única fuente de carbono y energía. Los aislados microbianos que presentaron la mayor actividad xilanolítica mostraron una gran similitud filogenética con *Pseudomonas psychrotolerans* y *P. oryzihabitans*.

Ruginescu et al. (2020) Realizaron un estudio de bioprospección de nuevas fuentes halofílicas y halotolerantes de enzimas hidrolíticas en lagos salados de Rumania. Aislaron 182 bacterias, 22 arqueas y 40 hongos haciendo un total de 240 microorganismos. Se cultivaron estos aislados en medios específicos para evaluar la producción de proteasas, lipasas, amilasas, celulasas, xilanasas y pectinasas. Para la evaluación de celulasas y xilanasas utilizaron como sustratos carboximetilcelulosa y xilano respectivamente. Además, realizaron el estudio filogenético de aislados bacterianos y arqueas mediante métodos moleculares. De los 182 aislados bacterianos 53 fueron productores de xilanasas y 34 productores de celulosa.

Chantarasiri (2021) Aisló 83 bacterias de muestras de agua del lago Tonle Sap ubicado en Camboya. Luego de cultivar estos aislados bacterianos en agar carboximetilcelulosa como única fuente de carbono seleccionó 14 aislados bacterianos diferentes con actividad celulolítica. Para la caracterización molecular amplificó los genes ribosómicos 16S. Los géneros encontrados fueron: *Aeromonas* del Phylum Proteobacteria, *Bacillus* del Phylum Firmicutes y *Exiguobacterium* del Phylum Firmicutes con 98-99% de identidad.

En este contexto, el presente estudio está orientado a la caracterización de bacterias nativas con actividad celulolítica y/o xilanolítica aisladas de las salinas de Chachiyacu de Lupuna ya que la gran ventaja de las celulasas y xilanasas provenientes de estos microorganismos es su estabilidad en condiciones extremas como elevadas concentraciones de sal, altas temperaturas y gran actividad en un rango variable de pH.

## 2 METODOLOGÍA

### 2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS:

Se recolectaron muestras de lodos en frascos estériles de cuatro puntos equidistantes de las salinas de Chachiyacu de Lupuna ubicadas en la provincia de Tocache, departamento de San Martín. Los puntos de muestreo se denominaron como A, B, C y D. Al momento de la recolección se tomaron datos de la temperatura y el pH. Los frascos con las muestras se transportaron en frío en una caja hermética para su estudio y análisis en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

### 2.2 AISLAMIENTO DE BACTERIAS:

Para el aislamiento de las bacterias a partir de las muestras recolectadas se utilizaron medios de cultivo con agua de sales (SW) al 7.5%, extracto de levadura al 0.5% y agar al 1.5%. El agua de sales al 7.5% (g/L) contiene: NaCl 60.0,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  7.5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  8.75, KCl 1.75, NaBr 0.2,  $NaHCO_3$  0.05 y  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.125. Para estabilizar a los aislados se realizaron 3 pasajes utilizando medios sólidos y líquidos (Chávez, 2010). Finalmente, los aislados fueron cultivados en medio SW al 7.5% suplementado con glicerol al 20% y conservados a  $-20^\circ C$ .

### 2.3 SELECCIÓN DE BACTERIAS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y/O XILANOLÍTICA:

Se cultivaron todas las bacterias aisladas en medios sólidos con carboximetilcelulosa al 0.5% y xilano al 1% a  $37^\circ C$  por 48 horas, luego de este periodo se adicionó una solución de rojo de Congo al 0.5% a las placas de cultivo, tomando como positivo a la formación de halos de hidrólisis (Tether y Wood, 1982; Attri y Garg, 2014). Para una mejor visualización de los halos se adicionó una solución diluida de ácido acético. Las bacterias que resultaron positivas a una o ambas pruebas fueron seleccionadas para realizar la caracterización fenotípica.

## 2.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIAS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y/O XILANOLÍTICA:

En la evaluación macroscópica se realizó una descripción detallada de la morfología, color y tamaño de las colonias. En la parte microscópica se realizó la tinción Gram.

Para las pruebas fisiológicas se realizó la evaluación de los siguientes parámetros utilizando medios de cultivo con agua de sales (SW) y extracto de levadura al 0.5%: Concentración de sales, temperatura y pH.

Se realizó la prueba de catalasa, fermentación de azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa y lactosa. También se evaluaron la producción de otras hidrolasas utilizando los siguientes sustratos: *Tween* 80, se cultivaron los aislados en medio sólido con agua de sales (SW) al 7.5% y *tween* 80 al 1% a 37°C por 48 horas. Se consideró resultado positivo a la formación de halos de precipitación alrededor de las colonias (Cojoc et al., 2009; Chávez, 2010). Almidón, se cultivaron los aislados en agar almidón con agua de sales (SW) al 7.5% a 37°C por 48 horas y se revelaron con una solución de Lugol. Se consideró resultado positivo a la formación de halos alrededor de las colonias que indican hidrólisis del almidón (Cojoc et al., 2009; Rohban et al., 2009). *Skim milk*, se cultivaron los aislados en medio sólido con agua de sales (SW) al 7.5% y *skim milk* al 2% a 37°C por 48 horas. Se consideró resultado positivo a la formación de halos traslúcidos alrededor de las colonias (Hairong et al., 2007; Rohban et al., 2009). O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), la producción de  $\beta$ -galactosidasa se determinó cultivando las bacterias en medio líquido SW al 7.5% suplementado con extracto de levadura y lactosa a 37°C por 24 horas. Luego de este tiempo, se centrifugó 1mL del cultivo, se añadió a las células tampón PBS, los discos de ONPG y se incubó a 37°C por 6 horas. La coloración amarilla del medio se reportó como resultado positivo (Chávez, 2010).

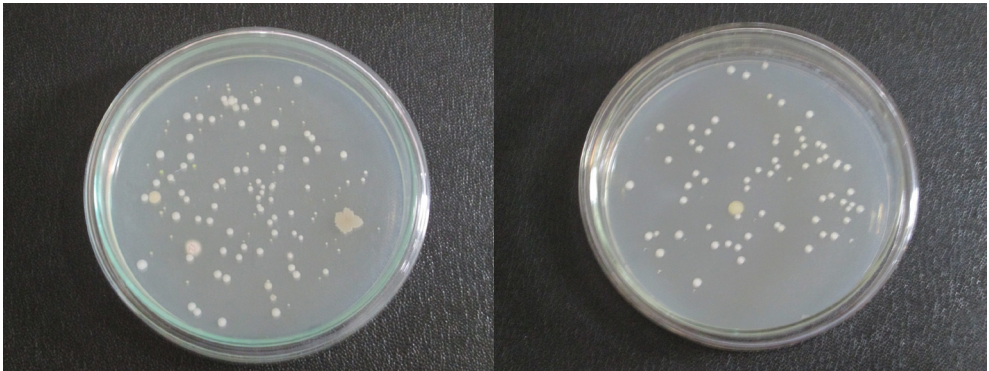
## 3 RESULTADOS

### 3.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS:

Se aislaron 141 bacterias con características en la formación de colonias diferentes tanto en el color, tamaño, consistencia y borde. Con respecto a los colores se observaron colonias amarillas, blancas, cremas y anaranjadas, en cuanto al tamaño se aislaron colonias grandes (mayor a 3 mm), medianas (entre 1 y 3 mm) y pequeñas (menor a 1 mm), además se observaron colonias con bordes irregulares y otras con borde liso (Figura 1).



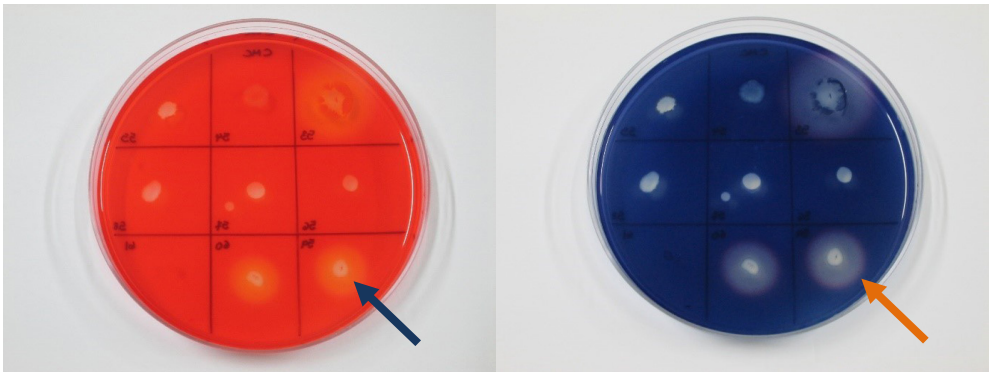
Figura 1. Colonias bacterianas aisladas de las Salinas de Cachiyacu de Lupuna.



### 3.2 SELECCIÓN DE BACTERIAS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y XILANOLÍTICA:

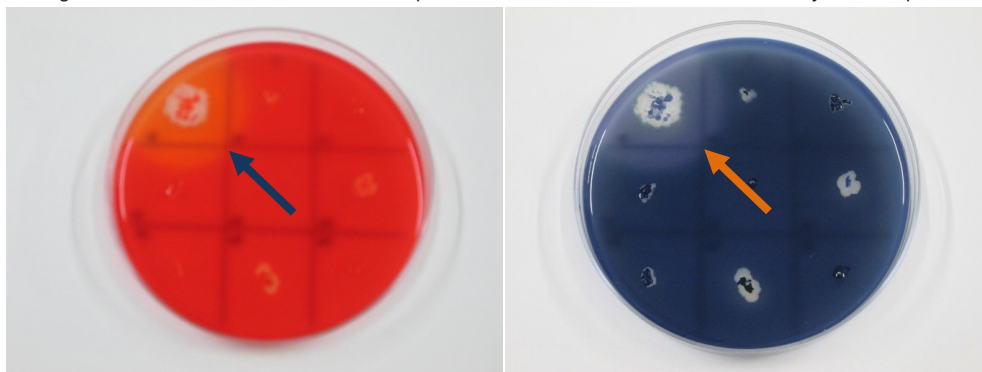
Los 141 aislados fueron cultivados en medios específicos como agar carboximetilcelulosa al 0.5% y agar xilano al 1%. Después de 48 horas de incubación se observó que el 12.76% (18/141) de los aislados hidrolizaron carboximetilcelulosa lo cual fue evidenciado por la formación de halos luego de adicionar a las placas de cultivo una solución de rojo de Congo. De los 18 aislados que hidrolizaron carboximetilcelulosa el 22.22% (4/18) presentaron halos mayores a 15 mm de diámetro (Figura 2).

Figura 2. Halos de hidrólisis en carboximetilcelulosa al 0.5% por bacterias aisladas de las Salinas de Cachiyacu de Lupuna.



Con respecto a los aislados bacterianos cultivados en agar xilano el 9.92% (14/141) hidrolizaron este sustrato. De estos 14 aislados el 21.42% (3/14) presentaron halos mayores a 15 mm de diámetro (Figura 3).

Figura 3. Halos de hidrólisis en xilano al 1% por bacterias aisladas de las Salinas de Cachiyacu de Lupuna.



Es importante resaltar que un aislado hidrolizó ambos sustratos observándose un halo de 18mm en agar carboximetilcelulosa al 0.5% y 20mm en agar xilano al 1%. Por ello para continuar con el trabajo se seleccionaron estos 31 aislados bacterianos.

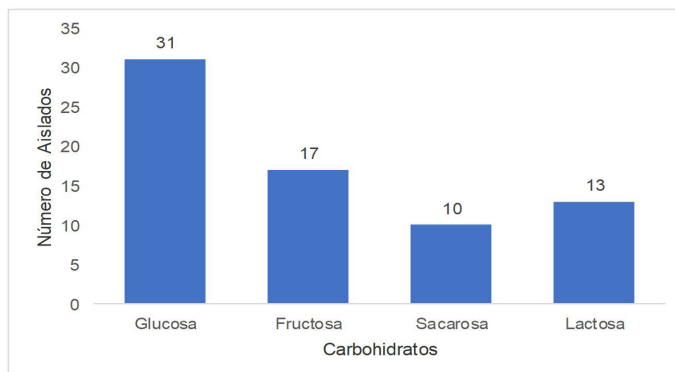
### 3.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIAS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y/O XILANOLÍTICA:

Luego de realizar la tinción Gram a los 31 aislados bacterianos se obtuvo que el 74.19% (23/31) de los aislados son Gram positivos y el 25.81% (8/31) Gram negativos.

Los resultados más relevantes de las pruebas fisiológicas son los siguientes: El 32.25% (10/31) de los aislados seleccionados crecieron en un rango de NaCl entre 0.5 y 20.0% y el 22.58% (7/31) entre el 5.0 y 15.0%. El 35.48% (11/31) crecieron óptimamente entre 20 a 45°C y el 19.35% (6/31) crecieron a pH entre 6 y 9.

Se observó que todos los aislados mostraron reacción positiva a la prueba de catalasa. En la prueba de fermentación de carbohidratos todos los aislados utilizaron glucosa, el 54.84% (17/31) fructosa, el 32.25% (10/31) sacarosa y el 41.93% (13/31) lactosa (Figura 4).

Figura 4. Utilización de carbohidratos de las bacterias celulolíticas y/o xilanolíticas aisladas de las Salinas de Cachiyacu de Lupuna.



Con respecto al sustrato almidón el 35.48% (11/31) de los aislados mostraron resultado positivo observándose la formación de los halos de hidrólisis luego de adicionar la solución de Lugol. En el 25.80% (8/31) de los aislados se observaron la formación de precipitados alrededor de las colonias lo que indica reacción positiva en el agar suplementado con *tween* 80. El 32.25% (10/31) de los aislados utiliza como sustrato *skim milk* lo cual fue evidenciado por la formación de halos traslúcidos alrededor de las colonias y el 41.93% (13/31) son  $\beta$ -galactosidasa positivos por el color amarillo del medio a las 6 horas de incubación a 37°C.

#### 4 DISCUSIÓN

Las Salinas de Cachiyacu de Lupuna se encuentran ubicadas en la provincia de Tocache, departamento de San Martín. Es un ambiente ecológico con características peculiares como: El clima tropical, las precipitaciones fluviales permanentes, las altas concentraciones de sales y las elevadas temperaturas que superan los 35°C durante el día. Estas características parecen inhóspitas para la vida, sin embargo, se ha descrito que estas condiciones son óptimas para el crecimiento de microorganismos como las bacterias halófilas y halotolerantes que soportan elevadas concentraciones salinas (Rampelotto, 2013; Didari et al., 2020). Además, estos ambientes son propicios para que los microorganismos desarrollen estrategias biológicas de adaptación y a la vez produzcan metabolitos con gran potencial biotecnológico.

El estudio se inició con la recolección de las muestras de lodos en las Salinas de Cachiyacu de Lupuna utilizando frascos estériles los cuales fueron transportados en frío al laboratorio para su estudio. Al respecto, Koa et al. (2005) manifiesta que los suelos son un potencial reservorio para estudiar y determinar la diversidad de microorganismos, que a diferencia de trabajar con muestras líquidas aumenta la probabilidad de aislar una mayor diversidad de microorganismos. Esto también se encuentra sustentado con los resultados reportados por Chávez (2010) quien aisló 86 bacterias con características diversas a partir de muestras de lodo de las Salinas de Pilluana.

Se aislaron 141 bacterias con características fenotípicas diferentes de color, forma y tamaño de las colonias, una cantidad de aislados mayor a lo reportado por Baati et al. (2010) quienes aislaron 40 microorganismos de muestras de las salinas de Túnez. Por otro lado, Shiping et al. (2018) aislaron 114 bacterias a partir de muestras de sedimentos marinos. A los 141 aislados se les evaluó la actividad celulolítica y xilanolítica en medios de cultivo sólidos con agar al 1.5%, carboximetilcelulosa 0.5% y xilano1%, los cuales son medios específicos para realizar la selección de bacterias productoras

de celulosas y/o xilanasas según lo reportado por Tether et al. (1982) y Attri et al. (2014). Luego de realizar los ensayos se logró obtener que el 12.76% (18/141) y el 9.92% (14/141) de los aislados hidrolizaba carboximetilcelulosa y xilano respectivamente, cabe destacar que un aislado hidrolizó ambos sustratos por ello para continuar con el estudio se consideraron 31 aislados. Govender et al. (2009) reportaron resultados similares de 87 bacterias aisladas de muestras de las salinas de Sua Pan en África donde 7 aislados hidrolizaron carboximetilcelulosa y 12 aislados hidrolizaron carboximetilcelulosa. Por otro lado, Makhdoumi et al. (2011) reportan de total de 293 aislados de ambientes hipersalinos del desierto de Irán 7 aislados hidrolizaron carboximetilcelulosa y un aislado xilano.

De acuerdo a las características de los 31 aislados con actividad celulolítica y/o xilanolítica, son bacterias halotolerantes, halófilas, aeróbicas y heterotróficas. En cuanto al perfil hidrolítico frente a diversos sustratos, los 31 aislados seleccionados muestran diferentes patrones, en la hidrólisis de almidón el 35.48% de los aislados hidrolizaron este sustrato, resultados menores a lo publicado por Shiping et al. (2018) quienes lograron obtener que el 45.61% de sus aislados procedentes de sedimentos marinos hidrolizaban almidón. La hidrólisis de *skim milk* resultó positiva en el 32.25% de los aislados, resultados similares fueron obtenidos por Rohban et al. (2009). El 25.80% de los aislados utilizaron como sustrato el *tween* 80 a diferencia del 43.4% reportado por Ruginescu et al. (2020) en ambientes salinos de Rumanía. Con respecto al sustrato ONPG el 41.93% de los aislados presentaron reacción positiva, resultados similares a los reportados por Chávez (2010) en las Salinas de Pilluana.

Finalmente, con la caracterización realizada se puede evidenciar que los 31 aislados son bacterias con actividad celulolítica y/o xilanolítica diferentes y con gran potencial biotecnológico en diversas industrias como la alimentaria, detergentes, textil, la producción de biocombustibles, la agricultura y la medicina.

## 5 CONCLUSIONES

De las muestras provenientes de las Salinas de Cachiyacu de Lupuna se aislaron 141 bacterias, de estos 31 presentaron actividad hidrolítica a carboximetilcelulosa y/o xilano. Además, existe un predominio de bacterias aeróbicas, halófilas, halotolerantes, bacilos Gram positivos, con crecimiento a temperaturas de 20 a 45 °C y pH de 6 a 9; y productoras de hidrolasas como lipasas, amilasas, proteasas y  $\beta$ -galactosidasas.

## 6 AGRADECIMENTOS

Este estudio fue financiado parcialmente por el proyecto CON – CON N°150403011. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Attri, S. y Garg, G. (2014). Isolation of microorganisms simultaneously producing xylanase, pectinase and cellulase enzymes using cost effective substrates. *Journal of Innovative Biology*, 1(1), 45-50.

Baati, H., Amdouni, R., Gharsallah, N., Sghir, A. y Ammar, E. (2010). Isolation and characterization of moderately halophilic bacteria from Tunisian solar saltern. *Current Microbiology*, 60(3), 157-161. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9516-6>

Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. y Kumar Srivastava, A. (2016). Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech*, 6, 150. <https://doi.org/10.1007%2Fs13205-016-0457-z>

Chantarasiri, A. (2021). Diversity and activity of aquatic cellulolytic bacteria isolated from sedimentary water in the littoral zone of Tonle Sap Lake, Cambodia. *Water*, 13(13), 1797. <https://doi.org/10.3390/w13131797>

Chávez, E. (2010). Bacterias halófilas moderadas con actividad lipolítica aisladas de las salinas de Pilluana - San Martín [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].

Cojoc, R., Merciu, S., Popescu, G., Dumitru, L., Kamekura, M. y Enache, M. (2009). Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(5), 4658-4664.

Didari, M., Bagheri, M., Amoozegar, M., Bouzari, S., Babavalian, H., Tebyanian, H., Hassanshahian, M. y Ventosa, A. (2020). Diversity of halophilic and halotolerant bacteria in the largest seasonal hypersaline lake (Aran-Bidgol-Iran). *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 18(2), 961-971. <https://doi.org/10.1007/s40201-020-00519-3>

Govender, L., Naidoo, L. y Setati, M. (2009). Isolation of hydrolase producing bacteria from Sua pan solar salterns and the production of endo-1, 4-bxylanase from a newly isolated haloalkaliphilic *Nesterenkonia* sp. *African Journal of Biotechnology*, 8 (20), 5458-5466.

Hairong, X., Linsheng, S., Ying, X., Man-Yee, T., Sergey, D. y Pei-Yuan, Q. (2007). Characterization of proteolytic bacteria from the Aleutian deep-sea and their proteases. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(1), 63-71. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0165-5>

Jayasekara, S. y Ratnayake, R. (2019). Microbial cellulases: An overview and applications. En *Cellulose*. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84531>

Koa, W., Wangb, I. y Annb P. (2005). A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 597-599. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.09.006>

Makhdoumi, A., Amoozegar, M. y Mahmodi, E. (2011). Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaeal strains isolated from salt lake. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 8(4), 705-714. <https://doi.org/10.1007/BF03326255>

Menéndez, E., García-Fraile, P. y Rivas, R. (2015). Biotechnological applications of bacterial cellulases. *Microbial biotechnology*, 2(3), 163-182. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2015.3.163>

- Rampelotto, P. (2013). Extremophiles and extreme environments. *Life*, 3(3), 482–485. <https://doi.org/10.3390/life3030482>
- Rohban, R., Amozegar, M. y Ventosa, A. (2009). Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(3), 333–340. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0500-0>
- Ruginescu, R., Gomoiu, I., Popescu, O., Cojoc, R., Neagu, S., Lucaci, I., Batrinescu-Moteau, C y Enache, M. (2020). Bioprospecting for novel halophilic and halotolerant sources of hydrolytic enzymes in brackish, saline and hypersaline lakes of Romania. *Microorganisms*, 8(12), 1903. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121903>
- Shiping, W., Beibei, L., Hongpeng, C., Rui, F., Ce, G. y Mingxue, S. (2018). Diversity of culturable moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes from marine sediments. *Bioscience Journal*, 34(6), <https://doi.org/10.14393/BJ-v34n6a2018-41757>
- Tether, R. y Wood, P. (1982). Use of Congo red - polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 43, 777-780.
- Viteri, P., Castillo, D. y Viteri S. (2016). Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. *Acta Agronómica*, 65(4), 362-367. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n4.50181>
- Zerva, I., Remmas, N. y Ntougias, S. (2019). Diversity and biotechnological potential of xylan-degrading microorganisms from orange juice processing waste. *Water*, 11(2), 274. <https://doi.org/10.3390/w11020274>

# CAPÍTULO 12

## ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *ANACYCLUS RADIATUS*

Data de submissão: 15/01/2023

Data de aceite: 03/02/2023

### Jaime Cardoso Ortiz

Universidad Autónoma de Zacatecas  
Unidad Académica de Ciencias Químicas  
Zacatecas, México  
<https://orcid.org/0000-0002-2644-6540>

### Ana Isabel Alvarado Sandoval

Universidad Autónoma de Zacatecas  
Unidad Académica de Ciencias Químicas  
Zacatecas, México

### Saúl Eduardo Noriega Medellín

Universidad Autónoma de Zacatecas  
Unidad Académica de Ciencias Químicas  
Zacatecas, México  
<https://orcid.org/0000-0001-5155-2188>

### María Argelia López Luna

Universidad Autónoma de Zacatecas  
Unidad Académica de Ciencias Químicas  
Zacatecas, México  
<https://orcid.org/0000-0001-8477-5169>

**RESUMEN:** Los gastroprotectores son fármacos de gran utilidad en el tratamiento de varias enfermedades crónicas asociadas a disfunciones gástricas, y como profilaxis en pacientes que usan medicamentos

ulcerogénicos. La planta *Anacyclus radiatus* es utilizada de forma tradicional como tratamiento de síntomas asociados a trastornos digestivos. El análisis fitoquímico demostró la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos en flor y hoja. El presente trabajo evalúa el efecto gastroprotector del extracto etanólico de *Anacyclus radiatus* en un modelo de ulceración ocasionado por indometacina empleando ratones Balb/c de 20-25 g. Los extractos fueron administrados antes de suministrar la indometacina, y los animales fueron sacrificados cinco horas después de la administración del agente ulcerogénico. Los estómagos fueron extraídos para la evaluación de las úlceras y la severidad de las lesiones. Se obtuvo una disminución altamente significativa del número y la severidad de las lesiones con el uso de las preparaciones del extracto. La cantidad más efectiva del extracto está en el rango de 100-250 mg, mientras que a 500 mg se observa hepatotoxicidad.

**PALABRAS CLAVE:** Fitoquímica. Gastritis. Úlcera. *Anacyclus*.

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND PRELIMINARY GASTROPROTECTIVE ACTIVITY AND OF *ANACYCLUS RADIATUS* ETHANOLIC EXTRACTS

**ABSTRACT:** Gastroprotective drugs are usually employed in the treatment of several gastrointestinal diseases as well as prophylaxis agents in patients taking ulcerogenic pharmaceuticals. *Anacyclus radiatus* is a

plant commonly used for the treatment of some symptoms related to gastrointestinal problems. Phytochemical analysis demonstrated the presence of flavonoids and phenolic compounds in the plant, especially in leaves and flowers. The aim of this study was to evaluate the potential gastroprotective activity of ethanolic extracts of this plant under an ulcerogenic model caused by indomethacin in mice. Once mice had taken indomethacin orally, ethanolic extracts of *Anacyclus radiatus* were administrated at different times in order to evaluate their gastroprotective effect. The most effective amount of extract ranged between 100-250 mg, while 500 mg caused sever hepatotoxicity.

**KEYWORDS:** Phytochemistry. Gastritis. Ulcer. *Anacyclus*.

## 1 INTRODUCCIÓN

La gastritis y úlcera gástrica son las principales patologías gastrointestinales de origen multifactorial que afecta al 3 % de la población mundial. Los hombres entre 46 a 65 años son la población que se ve afectada con mayor frecuencia. La úlcera gástrica es el resultado del desequilibrio entre los factores agresivos y defensivos de la mucosa gastroduodenal, dando como resultado un aumento en la secreción ácida. los síntomas más frecuentes de esta patología incluyen: dolor abdominal intenso, sangre en vómito y heces, así como daño irreversible en el tejido de la mucosa gástrica. Algunas especies del género *Anacyclus* son utilizadas en varias partes del mundo (India, México) como auxiliares en el tratamiento de diversas enfermedades tales como: diabetes y gastritis; además que los extractos de estas plantas presentan propiedades antiinflamatorias y antibióticas entre otras. *Anacyclus pyrethrum* es la más estudiada hasta el momento, debido a que la infusión de las raíces de esta planta ha demostrado tener actividad gastroprotectora e inmunoestimulante (Angós, 2016; González Coronel et al., 2016; Ortega-Cala et al., 2019; Usmani et al., 2016).

### 1.1 SISTEMA DIGESTIVO

La digestión y la absorción de nutrientes son las funciones primarias del sistema digestivo, por lo que se necesita de una cubierta epitelial sana e intacta que le permita resistir los efectos de sus propias secreciones ácidas. El transporte de alimento es en un solo sentido, y diferentes regiones del tubo digestivo se especializan en funciones distintas como: 1) motilidad (de alimentos a lo largo del sistema), 2) secreción (enzimas digestivas, HCl), 3) digestión (romper alimento en fragmentos más pequeños), 4) absorción, 5) almacenamiento y eliminación (Engevik et al., 2020).

El estómago es un órgano distensible encargado de almacenar alimentos, inicia la digestión de las proteínas e inhibe la proliferación de bacterias debido a la secreción de HCl, además de mover el quimo hacia el intestino delgado. La superficie interior del estómago contiene glándulas gástricas exocrinas y contienen varios tipos de células que



secretan diferentes productos: 1) células mucosas del cuello (secretan moco), 2) células parietales (secretan HCl), 3) células cimógenas (secretan pepsinógeno), 4) células enterocromafines (secretan histamina y 5-hidroxitriptamina), 5) células G (secretan gastrina hacia la sangre) y 6) células D (secretan somatostatina) (Engevik et al., 2020).

## 1.2 ACIDEZ GÁSTRICA

El término “gastritis” se refiere a la inflamación de la mucosa que recubre las paredes del estómago, puede ser de aparición aguda o crónica, originada por infecciones de *H. pylori*, uso de antiinflamatorios no esteroideos, consumo excesivo de alcohol, de origen inmune o toxicológico (Angós, 2016; Kishikawa et al., 2020).

A nivel global, se estima que el 25% de los adultos presenta al menos una vez al mes acidez y regurgitación, además, se considera que el 50% de la población mundial está infectada con la bacteria *H. pilory*, causante de gastritis crónica y úlcera péptica. El tratamiento para gastritis depende de la causa específica. La gastritis aguda causada por los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos o por el alcohol puede aliviarse dejar de consumirlos. Algunos tratamientos comunes incluyen antibióticos para eliminar *H. pylori*, inhibidores de la bomba de protones (H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPasa), bloqueadores H<sub>2</sub> y antiácidos locales (El-Zimaity & Riddell, 2021).

## 2 PLANTAS COMO AUXILIARES TERAPÉUTICAS

Las plantas medicinales siempre han estado presentes en la medicina y la humanidad las ha empleado en el tratamiento de enfermedades frecuentes. Su uso y conocimiento está catalogado como patrimonio de las culturas y según la Organización Mundial de la Salud (OMS) más del 80 % de la población utiliza la medicina tradicional para satisfacer las necesidades de atención primaria de salud, lo cual involucra el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Lozano et al., 2022).

La popularidad de los extractos naturales como agentes terapéuticos se debe a su escasa toxicidad y bajo costo de inversión. Sin embargo, también pueden ser empleados para el estudio y desarrollo de fitofármacos eficaces. Tal es el caso de *Rhizophora mangle*, una planta que llevó a la obtención y desarrollo de una forma farmacéutica sólida que presenta diversos mecanismos de acción como citoprotector, antisecretor de HCl, inhibidor de la disminución de prostaglandina PGE<sub>2</sub> y antibacteriano (Antepara et al., 2019).

El efecto gastroprotector de las planas se atribuye a la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos (da Silva et al., 2022). *Rhizophora mangle* resultó ser eficaz en los modelos de úlceras agudas producidas por indometacina, a dosis de 50, 125, 250, 500, 750 mg/kg, demostrando que la planta posee un efecto antiulcerogénico significativo

y citoprotector a dosis de 500 mg/kg, con un grado de ulceración de 1.6 mm. Durante el estudio del extracto acuoso de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) con modelos de úlceras agudas producidas por etanol, se demostró que la planta poseía un efecto antioxidante y gastroprotector. Tales efectos fueron atribuidos a los polifenoles y taninos (Gilani et al., 2019).

## 2.1 ANACYCLUS RADIATUS

Pertenciente a la familia *Asteraceae*, es una planta que se utiliza de manera tradicional para disminuir los síntomas asociados a trastornos digestivos. Tiene algunas sinonimias como *Anacyclus radiatus*, *Anthemis valentina*. Algunos nombres comunes incluyen coronilla y manzanilla de Valencia. Las asteráceas, también llamadas compuestas (*Compositae*), tienen cerca de 23,500 especies repartidas en 1600 géneros, siendo la familia de angiospermas de mayor diversidad biológica. De distribución cosmopolita, presentan cabezuelas florales compuestas por múltiples florecillas y suelen encontrarse en bosque templado y semidesierto, se caracterizan por la ausencia de látex. Presenta tallos variables entre 7-50 cm que pueden ser simples o ramificados, hojas pinnatisectas con flores de color amarillo hemiliguladas en 1-2 filas con ápice apical semicircular, florece de junio a octubre. Se ha demostrado que algunas especies de *Anacyclus* es utilizada globalmente, contienen metabolitos secundarios como: alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y fitoesteroles (Pérez et al., 2022).

La medicina tradicional (herbolaria) es una opción ampliamente utilizada por la población debido a la relación costo – beneficio y fácil acceso a materias primas. A pesar de haber existido por muchas décadas, continúa siendo una rama poco estudiada de la cual se pueden obtener tratamientos potencialmente efectivos, considerando que muchos fármacos actuales se desarrollaron a partir de extractos de plantas. Por estas razones y con el fin de evaluar el efecto gastroprotector de extractos de *Anacyclus radiatus*, a continuación, se describirá la búsqueda de metabolitos secundarios que potencialmente confieren a la planta un efecto sinérgico, curativo y promotor de protección de la mucosa gástrica para el tratamiento de gastritis en un modelo experimental con ratones Balb/c.

## 3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 3.1 RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA PLANTA

La planta se obtuvo de forma silvestre en la comunidad de Tenanguillo, municipio de Tabasco, en el estado de Zacatecas (México). Crece de forma natural en temporada de lluvias (Figura 1). La identificación taxonómica se realizó en el laboratorio de botánica

de la unidad Académica de Agronomía de la Universidad Autónoma de Zacatecas, donde se confirmó que se trata *Anacyclus radiatus*.

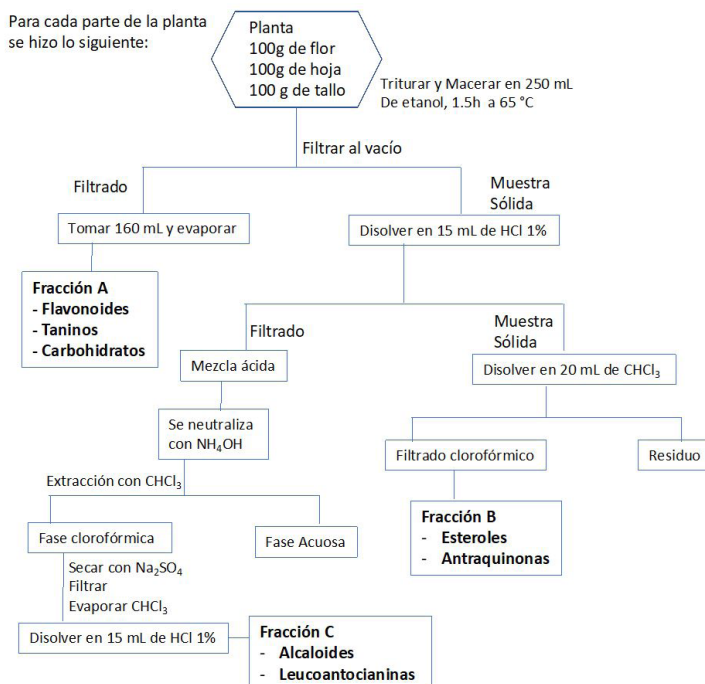
Figura 1. Zona de recolección de la planta *Anacyclus radiatus*, Zacatecas, México.



### 3.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Con el fin de realizar pruebas de tamizaje fitoquímico, se realizaron extractos con etanol, solución acuosa de HCl y cloroformo en los tallos, hojas y flores empleando el método de maceración con calor (Esquema 1).

Esquema 1. Diagrama para la obtención de los extractos de *Anacyclus radiatus*.



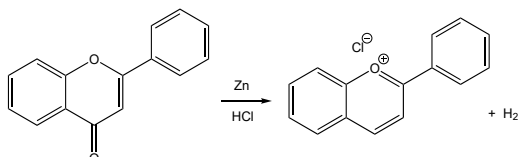
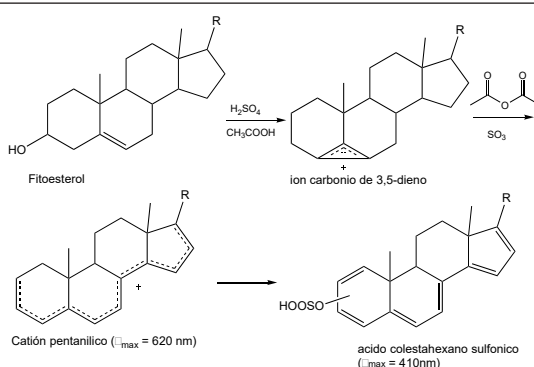
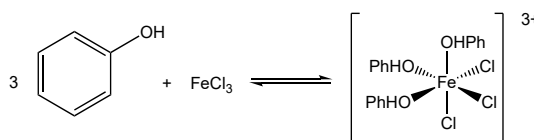
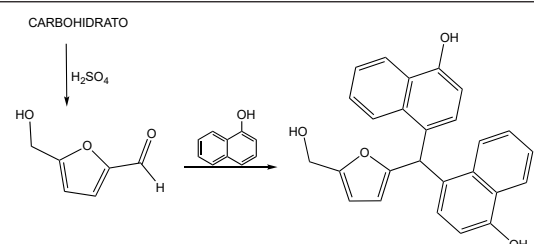
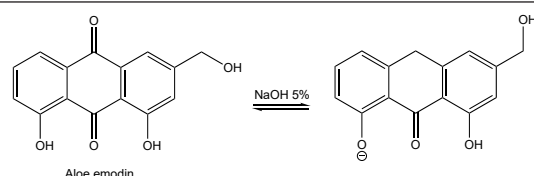
Para obtener el extracto con etanol se trituraron 100 g de cada una de las partes de *Anacyclus radiatus* en morteros distintos, para luego adicionar 250 ml de etanol. Se calentó a 60-70 °C dejando en maceración durante una hora y media. Se filtró al vacío en caliente y se almacenó. Para obtener el extracto de cloroformo se tomaron 160 ml (2/3) de la mezcla etanólica de cada parte de *Anacyclus radiatus* y se introdujeron en la estufa a una temperatura de 60-70 °C hasta completa evaporación. Se añadieron 15 ml de HCl (1%) y se filtró al vacío obteniéndose un sólido y el filtrado ácido. El sólido obtenido se disolvió con 20 ml de  $\text{CHCl}_3$ , y se filtró nuevamente, dando como resultado el filtrado clorofórmico. El extracto acuoso de cada una de las partes de la planta se obtiene a partir del filtrado ácido (descrito anteriormente). Se neutralizó dicho filtrado acuoso con  $\text{NH}_4\text{OH}$  y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido múltiple con  $\text{CHCl}_3$  en alícuotas de 15 ml por triplicado. Se descarta la fase orgánica y se conserva la fase acuosa. El extracto ácido se obtiene a partir de la fase clorofórmica, la cual fue tratada con  $\text{NaSO}_4$  anhidro para eliminar la humedad, se filtró al vacío y se evaporó el  $\text{CHCl}_3$  en su totalidad. El sólido obtenido tras la evaporación se disolvió en una solución de HCl al 1%.

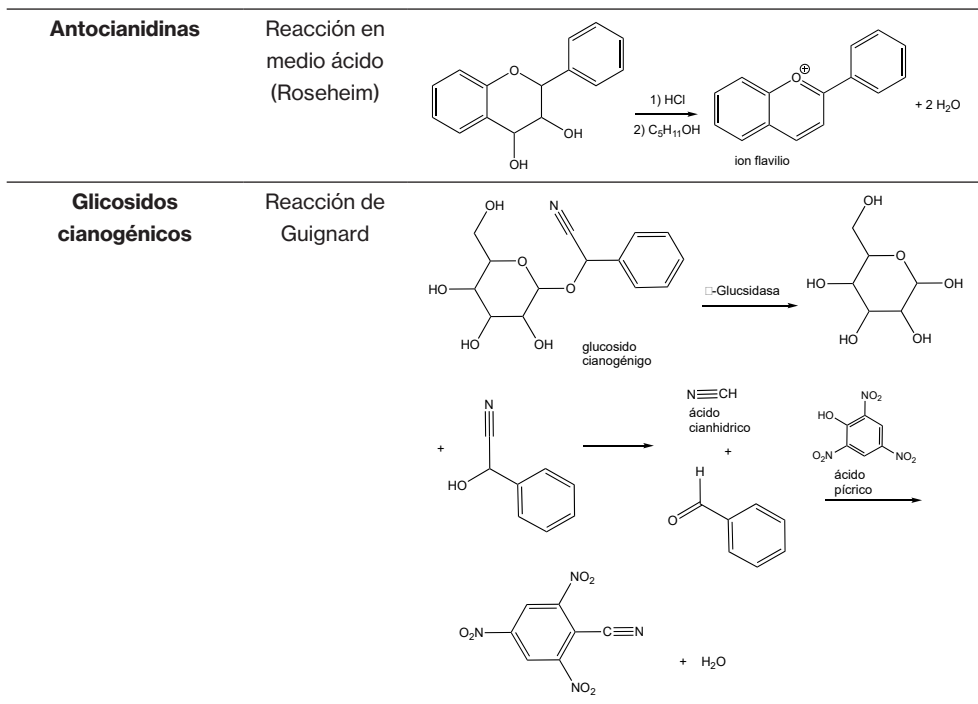
Una vez obtenidos los extractos, se evaporan por completo hasta obtener un polvo fino de cada una de las partes de la planta. Para la administración a los ratones, se disolvió el polvo de la **fracción A** (esquema 1) de la planta completa en agua destilada.

#### 4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación de productos naturales. Permite determinar cualitativamente los principales grupos funcionales presentes en una planta y con base en esa información, direccionar la extracción de los extractos para el aislamiento de los compuestos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados, identificando color y/o precipitación. Permite una evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. La tabla 1 muestra la propuesta de las reacciones químicas que ocurren en cada una de las pruebas mencionadas.

Tabla 1. Reacciones en la identificación cualitativa de metabolitos del tamizaje fitoquímico en extractos de *Anacyclus radiatus*.

Metabolitos	Prueba	Reacción
<b>Flavonoides</b>	Reacción de Shinoda	 <p> <chem>O=C1C=CC(=O)C=C1c2ccccc2</chem> <math>\xrightarrow[\text{HCl}]{\text{Zn}}</math> <chem>[O+]1C=CC(=O)C=C1c2ccccc2.[Cl-]</chem> + H<sub>2</sub> </p>
<b>Esteroles</b>	Reacción de Liebermann-Burchard	 <p>             Fitoesterol <math>\xrightarrow[\text{CH}_3\text{COOH}]{\text{H}_2\text{SO}_4}</math> ion carbonio de 3,5-dieno <math>\xrightarrow{\text{SO}_3}</math> ácido colestahexano sulfónico         </p> <p>             Cation pentanilico (<math>\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}</math>) <math>\rightarrow</math> ácido colestahexano sulfónico (<math>\lambda_{\text{max}} = 410 \text{ nm}</math>)         </p>
<b>Compuestos fenólicos</b>	Reacción con FeCl <sub>3</sub>	 <p> <math>3 \text{ PhOH} + \text{FeCl}_3 \rightleftharpoons \left[ \begin{array}{c} \text{OHPh} \\   \\ \text{PhHO} \cdots \text{Fe} \cdots \text{Cl} \\   \\ \text{PhHO} \\   \\ \text{Cl} \end{array} \right]^{3+}</math> </p>
<b>Alcaloides</b>	Reacción de Dragendorff	$\text{R}_3\text{N} + \text{HX} \longrightarrow [\text{R}_3\text{NH}]^+ + \text{X}^-$ alcaloide (X = aniones de ácidos = Cl <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , HSO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> , ...)
		$\text{R}_3\text{NH}^+\text{X}^- + \text{K[Bil}_4] \longrightarrow [\text{R}_3\text{NH}]^+[\text{Bil}_4]^- + \text{KX}$ Complejo colorido insoluble
<b>Carbohidratos</b>	Reacción de Molich	 <p>             CARBOHIDRATO <math>\xrightarrow{\text{H}_2\text{SO}_4}</math> <math>\xrightarrow{\text{Phenol}}</math> </p>
<b>Antraquinonas</b>	Reacción de Borntrager	 <p>             Aloe emodin <math>\xrightarrow{\text{NaOH } 5\%}</math> </p>



#### 4.1 FLAVONOIDES

Los flavonoides son compuestos polifenólicos con un grupo cetona de coloración amarillenta. Para identificar estos compuestos se usa la reacción de Shinoda, la cual consiste en agregar  $Zn^0$  y HCl. El  $Zn^0$  cede un par de electrones al C del carbonilo y el O se protona con el HCl del medio formando un OH, el cual se deshidrata por el medio ácido formando un heterociclo aromático de coloración que va desde el rosa débil hasta rojo (+).

#### 4.2 ESTEROIDES

Todos los esteroides vegetales contienen un OH y se denominan esterol. La principal función de los esterol en plantas es formar parte de las membranas y determinar su viscosidad y su estabilidad. La reacción de Liebermann-Burchard identifica la presencia de estos compuestos al adicionar  $H_2SO_4$  provocando la salida del grupo -OH, lo que resulta en una deshidratación que genera la aparición de un color verde o azul (+) (Adu et al., 2019).

#### 4.3 COMPUESTOS FENÓLICOS

Moléculas orgánicas que contienen al menos un grupo fenol. Algunos son solubles en solventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos y por lo tanto solubles

en agua, y otros son polímeros muy grandes e insolubles, se identifican con la reacción de  $\text{FeCl}_3$  formando un complejo de coloración verde oscuro (+).

#### 4.4 ALCALOIDES

Metabolitos secundarios con tres características particulares: 1) solubles en agua, 2) contienen al menos un átomo de N y 3) presentan alguna actividad biológica. Son mayoritariamente heterocíclicos, aunque pueden ser alifáticos y se pueden identificar mediante la reacción de Dragendorff. Se hacen reaccionar con  $\text{BiI}_4$  produciendo precipitado colorido (-) (Raal et al., 2020).

#### 4.5 HIDRATOS DE CARBONO

Son sustancias orgánicas formadas por C, H y O. Aportan energía a las plantas y dan estructura. Se identifican con la reacción de Molish, que consiste en adicionar  $[\text{H}_2\text{SO}_4]$  formando compuestos furfúricos (las pentosas dan furfural y las hexosas dan hidroximetilfurfural). Los furfurales se condensan con el reactivo de Molish (solución alcohólica de  $\alpha$ -naftol), generando un producto violeta (-).

#### 4.6 ANTRAQUINONAS

Compuestos derivados del antraceno, sirven como esqueleto básico para sus pigmentos. Se identifican con la reacción química de Bortrager, la cual se lleva a cabo en medio alcalino donde se desprotona el  $-\text{COOH}$  o el OH fenólico de la antraquinona, formando cargas negativas, las cuales entran en resonancia en el anillo generando un compuesto de color rojo en solución (+).

#### 4.7 LEUCOANTOCIANIDINAS

Son flavan-3,4-cis-dioles, están presentes en las plantas y son precursores de las antocianinas, catequinas y taninos, su identificación se lleva a cabo con la reacción de Rosenheim, en donde los OH alifáticos se protonan con HCl, provocando una deshidratación dando como resultado insaturaciones que aumentan la conjugación en la molécula presentando una coloración entre carmesí hasta rosa pálido (+).

#### 4.8 SAPONINAS

Tienen este nombre debido a las propiedades similares a las del jabón: están constituida por un elemento soluble en lípidos (esteroides o triterpenoides) y un elemento

soluble en agua (azúcar), y forman una espuma cuando se las agita en agua. Para identificarlas se realiza una prueba de espuma. donde una porción de la planta es disuelta en agua caliente, esta disminuye la tensión superficial, por lo que al agitar la solución se formara una espuma abundante y relativamente estable (+).

#### 4.9 GLICÓSIDOS CIANOGENICOS

Son compuestos nitrogenados no tóxicos, pero se degradan cuando la planta es aplastada liberando sustancias volátiles tóxicas como HCN. Se identifican mediante la reacción de Guignard, donde se adiciona  $\text{CHCl}_3$  produciendo una hidrólisis enzimática con liberación de HCN, este reacciona con el picrato de sodio reduciéndolo a isopurpurato de coloración rojiza (-) (Demirbolat & Kartal, 2019; Gurgur et al., 2020).

Los metabolitos encontrados cualitativamente fueron: flavonoides, compuestos fenólicos, carbohidratos, esteroides, antraquinonas y saponinas (tabla 2).

Tabla 2. Distintos metabolitos encontrados en los extractos de *Anacyclus radiatus*.

Fracción A	Flavonoides	OH fenolicos	Carboidratos
<b>Tallo</b>	+	+++	++
<b>Hoja</b>	++	+++	-
<b>Flor</b>	++	+++	++
Fracción B	Esteroides	Antraquinonas	
<b>Tallo</b>	++	++	
<b>Hoja</b>	++	++	
<b>Flor</b>	++	++	
Fracción C	Alcaloides	Leucoantocianinas	
<b>Tallo</b>	-	-	
<b>Hoja</b>	-	-	
<b>Flor</b>	-	-	
Reacción directa	saponinas	Glicosidos Cianogenicos	
<b>Planta seca</b>	+	-	

#### 5 EVALUACIÓN DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DE LOS EXTRACTOS

Para evaluar el efecto gastroprotector del extracto de *Anacyclus radiatus* se utilizó un modelo de úlcera gástrica en ratón provocado por indimetacina (Suleyman et al., 2010). Como referencia se utilizaron tres medicamentos (ranitidina,  $\text{Al}(\text{OH})_3$  y omeprazol). El extracto etanólico de la planta completa (flores, hojas y tallo) fue utilizado para evaluar la actividad gastroprotectora. La administración, cada uno de los medicamentos y extractos fueron disueltos en la misma cantidad de agua destilada como se indica en la tabla 3.



Tabla 3. Cantidades utilizadas para la dilución de fármacos y extracto.

<b>mg utilizados</b>	<b>µL de agua destilada utilizados</b>
4.5 mg de ranitidina	300 µl
8.6 mg de Al(OH) <sub>3</sub>	300 µl
6 mg de omeprazol	300 µl
40 mg de indometacina	300 µl
100 mg extracto	300 µl
150 mg extracto	300 µl
200 mg extracto	300 µl
250 mg extracto	300 µl
500 mg extracto	300 µl

Primeramente, se realizó la evaluación con una cantidad fija de extracto (100 mg) y medicamento en ratones con un peso promedio de 25 g. A cada ratón se le administraron las cantidades correspondientes de medicamentos y extracto, treinta minutos después se administraron 40 mg de indometacina (tabletas) por vía oral para inducir daño en la mucosa gástrica. Los ratones con los medicamentos de referencia fueron sacrificados 5 horas después, mientras que el grupo de ratones con el extracto fueron sacrificados 1, 2, 3, 4 y 5 horas después de ser administrado. En total se utilizaron 10 ratones (tabla 4).

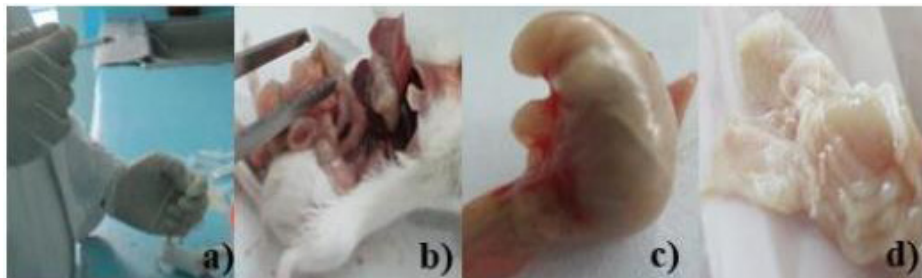
Tabla 4. Administración de agente ulcerante y tratamiento gastroprotector.

<b>Ratón</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo para sacrificio</b>
1	Testigo	<b>5 h</b>
2	Indometacina	<b>5 h</b>
3	Ranitidina y 30 min después se administra Indometacina	<b>5 h</b>
4	Al(OH) <sub>3</sub> y 30 min después se administra Indometacina	<b>5 h</b>
5	Omeprazol y 30 min después se administra Indometacina	<b>5 h</b>
6, 7, 8, 9 y 10	Extracto y 30 min después se administra Indometacina	<b>1 h, 2 h, 3 h, 4 h y 5 h.</b>

Previo al estudio, todos los especímenes se mantuvieron en ayuno durante veinticuatro horas dejando agua a libre demanda. Medicamentos y extractos se administraron vía oral mediante cánula intragástrica. Los animales se sacrificaron por desnucamiento, e inmediatamente se efectuó una laparotomía para extraer el estómago. Se hizo una incisión en el estómago sobre la curvatura mayor y se limpió el contenido.

El manejo de los animales se realizó con base en normas oficiales mexicanas donde se establece las técnicas de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, sacrificio y la disposición final de los residuos.

Figura 2. Manipulación de los especímenes. **a)** Administración de fármacos y extracto. **b)** Laparotomía. **c)** Extracción de estómago. **d)** Estómago diseccionado.



Al analizar macroscópicamente los estómagos del grupo experimental que recibió indometacina (grupo control), se encontró una gran distensión en el estómago (Figura 3b). La mucosa presentó irritación y ulceraciones. Los grupos administrados con medicamentos (Figura 3c, 3d y 3e) y el extracto (Figura 4a, 4b, 4c, 4d y 4e) mostraron menor distensión, irritación e inflamación. Además, no se encontraron ulceraciones, poniendo de manifiesto un efecto de protección a la mucosa gástrica. Durante este primer experimento, se observó que las formulaciones de omeprazol, y  $\text{Al}(\text{OH})_3$  tuvieron un efecto considerablemente menor sobre la disminución de la irritación e inflamación de la mucosa. Sin embargo, cuando se usó ranitidina se observó una considerable mejora en la apariencia macroscópica de la mucosa, ausencia de úlceras y menor enrojecimiento. Estas características en el estómago de los ratones tratados con ranitidina son similares al estómago de los ratones tratados con el extracto de *Anacyclus radiatus*, demostrando que tanto la ranitidina como los extractos de la planta son eficaces para disminuir los signos típicos de enfermedades de la mucosa.

Figura 3. Observación macroscópica de estómago. **a)** Tejido sano. **b)** Tejido dañado. **c)** Ranitidina. **d)**  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . **e)** Omeprazol.

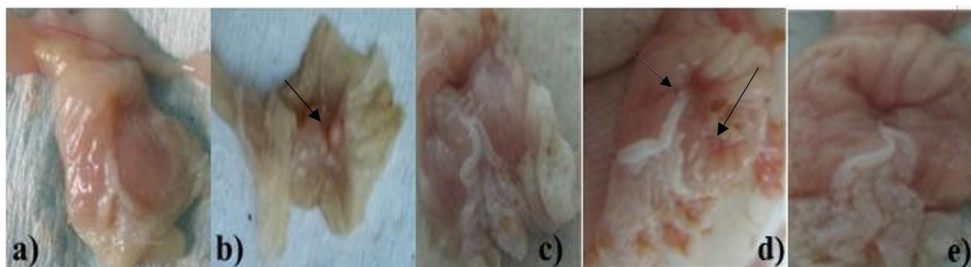
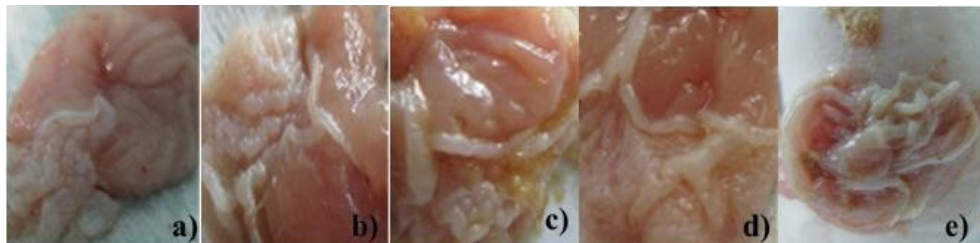
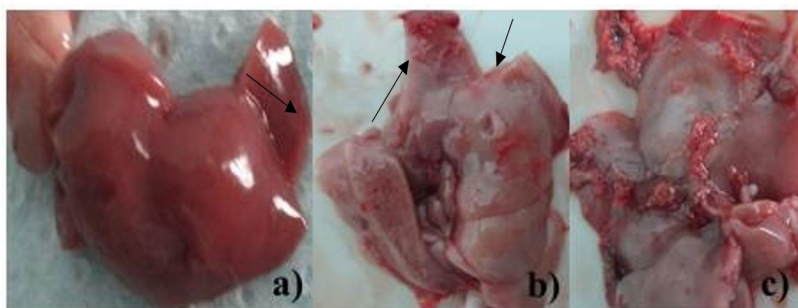


Figura 4. Observación macroscópica de estómago. **a)** Extracto a 1 h. **b)** Extracto a 2 h. **c)** Extracto a 3 h. **d)** Extracto a 4 h. **e)** Extracto a 5h.



Posteriormente, se realizó la administración de diferentes cantidades del extracto de *Anacyclus radiatus* (100-500 mg) bajo condiciones experimentales similares a las descritas anteriormente. Se observó que la cantidad de extracto que ofrece los mejores efectos de gastroprotección esta entre 100 y 200 mg. Es importante mencionar que todas las cantidades empleadas de extracto ofrecieron un efecto de protección. Sin embargo, cuando se usaron 500 mg, se observó un efecto hepatotóxico severo en los ratones. La observación macroscópica del hígado muestra ulceraciones y erosión del tejido hepático (Figura 5b y 5c) en comparación con el hígado de los otros animales expuestos a dosis menores (Figura 5a). Estos primeros resultados del análisis de los componentes y actividad de *Anacyclus radiatus* son prometedores para posteriores estudios encaminados a desarrollar formulaciones auxiliares en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Aunque debe tenerse en cuenta el efecto hepatotóxico observado, el cual es un efecto secundario relativamente frecuente de los productos naturales extraídos de plantas.

Figura 5: Observación de hígado. **a)** hígado sano. **b)** hígado dañado cara anterior. **c)** hígado dañado cara posterior.



## 6 CONCLUSIONES

El extracto etanólico de *Anacyclus radiatus* contiene diversos componentes como flavonoides y compuestos fenólicos, sustancias orgánicas a las que se les han atribuido propiedades gastroprotectoras. El proceso conocido como marcha fitoquímica es una serie de pasos relativamente fáciles de llevar a cabo en casi cualquier laboratorio

encaminado al estudio de la química orgánica o de los productos naturales. Utiliza reactivos seguros y poco tóxicos para los humanos, con reacciones fácilmente identificables debido a la formación y cambios de color en las muestras. Estas características le confieren gran importancia cualitativa al momento de iniciar un proceso de identificación, separación, caracterización y evaluación de la actividad biológica de los componentes de una fuente natural como las plantas. *Anacyclus radiatus* es una planta silvestre popular en la medicina herbolaria para el tratamiento de padecimientos como gastritis y úlceras, en el presente trabajo se evidenció que esta planta posee un efecto gastroprotector comparable a ranitidina bajo un modelo de ulceración por indometacina. En México, el uso de ranitidina está suspendido desde octubre de 2019, por lo que esta planta puede ofrecer una alternativa potencialmente gastroprotectora. La cantidad más efectiva del extracto está en el rango de 100-250 mg. Mientras que a partir de la administración de 500 mg se observa un efecto hepatotóxico identificado macroscópicamente. Se puede implementar el uso del extracto para la prevención y tratamiento de síntomas asociados a enfermedades gastrointestinales, ya que representa un alivio rápido si se usa en la dosis adecuada. Vale la pena mencionar que esta planta es silvestre y no requiere condiciones especiales para su recolección y almacenamiento.

## REFERENCIAS

- Adu, J. K., Amengor, C. D. K., Kabiri, N., Orman, E., Patamia, S. A. G. & Okrah, B. K. (2019). Validation of a simple and robust liebermann–burchard colorimetric method for the assay of cholesterol in selected milk products in ghana. *International Journal of Food Science*, 2019.
- Angós, R. (2016). Gastritis. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(2), 66–73.
- Antepara, B. A. V., Franco, M. J. S., Sánchez, N. R. E. & Mena, A. V. V. (2019). Hemorragia digestiva alta por ulcera péptica o duodenal. *RECIMUNDO*, 3(2), 894–914.
- da Silva, C. J., de Arruda Nascimento, E., da Silva, B. I. M., do Nascimento, M. S. & dos Santos Aguiar, J. (2022). Biological activities associated with tannins and flavonoids present in *Hymenaea stigonocarpa* and *Hymenaea courbaril*: A systematic review. *Research, Society and Development*, 11(12), e174111234196–e174111234196.
- Demirbolat, I. & Kartal, M. (2019). Prulaurasin content of leaves, kernels and pulps of *Prunus lauracerus* L.(Cherry Laurel) during ripening. *Journal of Research in Pharmacy*, 23(1).
- El-Zimaity, H. & Riddell, R. H. (2021). Beyond *Helicobacter*: dealing with other variants of gastritis – an algorithmic approach. *Histopathology*, 78(1), 48–69.
- Engevik, A. C., Kaji, I. & Goldenring, J. R. (2020). The physiology of the gastric parietal cell. *Physiological Reviews*, 100(2), 573–602.
- Gilani, S. M. U., Ahmed, S., Baig, S. G. & Hasan, M. M. (2019). Ethnopharmacognosy, phytochemistry and pharmacology of genus *Caesalpinia*: A review. *J. Pharm. Phytochem*, 8, 2222–2229.

González Coronel, M. A., Vásquez García, Á., Castro Lino, A., Palacios López, C. R., León Garcés, E. A. & Soto López, I. (2016). *Evaluación fitoquímica, fisicoquímica y farmacológica de Maguey Morado (Rhoeo discolor)*.

Gurgur, E., Oluyamo, S. S., Adetuyi, A. O., Omotunde, O. I. & Okoronkwo, A. E. (2020). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles and zinc oxide–silver, zinc oxide–copper nanocomposites using *Bridelia ferruginea* as biotemplate. *SN Applied Sciences*, 2(5), 1–12.

Kishikawa, H., Ojira, K., Nakamura, K., Katayama, T., Arahata, K., Takarabe, S., Miura, S., Kanai, T. & Nishida, J. (2020). Previous *Helicobacter pylori* infection–induced atrophic gastritis: A distinct disease entity in an understudied population without a history of eradication. *Helicobacter*, 25(1), e12669.

Lozano, Y. Y., Giraldo, S. E., Castro, H. S. & Sánchez, R. M. (2022). Plantas medicinales con potencial actividad neuroprotectora estudiadas en cepas transgénicas de *Caenorhabditis elegans*. Revisión sistemática 2010–2021. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 10(5), 812–836.

Md Noh, M. F., Gunasegavan, R. D.-N., Mustafa Khalid, N., Balasubramaniam, V., Mustar, S. & Abd Rashed, A. (2020). Recent techniques in nutrient analysis for food composition database. *Molecules*, 25(19), 4567.

Ortega-Cala, L. L., Monroy-Ortiz, C., Monroy-Martínez, R., Colín-Bahena, H., Flores-Franco, G., Luna-Cavazos, M. & Monroy-Ortiz, R. (2019). Plantas medicinales utilizadas para enfermedades del sistema digestivo en Tetela del Volcán, Estado de Morelos, México. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 18(2), 106–129.

Pérez, A. H., Montiel, R. G. C., Palestina, C. U. L., Fuentes, A. D. H. & Maldonado, A. J. (2022). Plantas medicinales de la familia Asteraceae con actividad hipoglucemiante en México. Una revisión. *Boletín de Ciencias Agropecuarias Del ICAP*, 8(16), 14–17.

Raal, A., Meos, A., Hinrikus, T., Heinämäki, J., Române, E., Gudienė, V., Koshovyi, O., Kovaleva, A., Fursenco, C. & Chiru, T. (2020). Dragendorff's reagent: Historical perspectives and current status of a versatile reagent introduced over 150 years ago at the University of Dorpat, Tartu, Estonia. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(7), 299–306.

Suleyman, H., Albayrak, A., Bilici, M., Cadirci, E. & Halici, Z. (2010). Different mechanisms in formation and prevention of indomethacin-induced gastric ulcers. *Inflammation*, 33(4), 224–234.

Usmani, A., Khushtar, M., Arif, M., Siddiqui, M. A., Sing, S. P. & Mujahid, M. (2016). Pharmacognostic and phytopharmacology study of *Anacyclus pyrethrum*: An insight. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(3), 144–150.

## CAPÍTULO 13

### INVESTIGAÇÃO SOBRE A RELAÇÃO DO COBRE COM A FOTOSSÍNTESE EM MICROALGAS: ESTUDO DE CASO UTILIZANDO *SCENEDESMUS QUADRICAUDA*

Data de submissão: 15/12/2022

Data de aceite: 10/01/2023

**Rafael Barty Dextro**

Centro de Energia Nuclear em Agricultura  
CENA – Universidade de São Paulo (USP)  
Piracicaba - SP  
<https://orcid.org/0000-0002-0602-7584>

**Jaqueline Carmo da Silva**

Universidade Federal de São Carlos  
UFSCar  
São Carlos - SP  
<https://orcid.org/0000-0001-6763-513X>

**RESUMO:** Diversos metais são utilizados no metabolismo de microrganismos para funções vitais, seja como cofatores em reações ou como parte estrutural nos centros reativos de diversas enzimas. O cobre é um exemplo de micronutriente essencial, cuja carência ou excesso ocasionam mudanças no metabolismo intracelular. Para organismos fotossintetizantes, o cobre assume um papel ainda mais importante, uma vez que a proteína móvel plastocianina, que é uma transportadora de elétrons entre o complexo citocromo b6-f do fotossistema II (PSII) para o PSI, dependente deste metal para sua ação. Assim, visando compreender o efeito direto do cobre nos potenciais fotossintéticos microalgais, utilizou-

se como modelo biológico a *Scenedesmus quadricauda*, uma clorófito cosmopolita de água doce. Utilizando um eletrodo íon-seletivo de cobre, foram apuradas as concentrações de cobre livre no meio, utilizado para agrupar os efeitos observados em densidade celular e nas eficiências fotossintéticas nos cultivos expostos a concentrações de cobre que variaram de valores considerados ambientais até contaminações elevadas. Os resultados da densidade celular mostraram que nas menores concentrações de cobre o processo de divisão celular não foi afetado, sendo que nas maiores concentrações houve uma redução significativa no número total de células. O rendimento fotossintético efetivo apresentou um declínio linear, similar ao observado na dissipação fotoquímica (qP). Este estudo de caso demonstra que o cobre é um micronutriente essencial para a fotossíntese, mas dependendo de sua concentração biodisponível pode afetar a fisiologia fotossintética da microalga *Scenedesmus quadricauda*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cobre. Fotossíntese. Microalga. *Scenedesmus*.

INVESTIGATING THE RELATIONSHIP BETWEEN COPPER AND PHOTOSYNTHESIS IN MICROALGAE: A CASE STUDY USING *SCENEDESMUS QUADRICAUDA*

**ABSTRACT:** Several metals are used in the metabolism of microorganisms with vital functions, such as cofactors in reactions

or integrating the structure of reactive centres of enzymes. Copper is an example of essential micronutrient, whose deficit or excess are negative to intracellular metabolism. For photosynthetic organisms, copper takes a central role, since the mobile protein plastocyanin, responsible for transporting electrons between the cytochrome b6-f from Photosystem I (PSI) to PSII, is copper-dependent. To comprehend the direct effect of copper in the microalgal photosynthetic potentials, the Chlorophyta *Scenedesmus quadricauda* was selected as biological model due to its cosmopolitan distribution in freshwater environments. Using a copper ion-selective electrode, the amount of free copper in the medium was measured. The cell density and photosynthetic yields were determined in each culture exposed to copper concentrations that varied from environmental relevant up to toxic contaminations. The results of cell density showed that lower copper concentrations did not affect the cellular division process, with a significant reduction in total cell number at higher copper. The effective photosynthetic yield displayed a linear decline, similar to what was observed for the photochemical dissipation (qP). This case study shows that copper is an essential micronutrient for photosynthesis but, according to its bioavailable concentration, it can affect the photosynthetic physiology of the microalgae *Scenedesmus quadricauda*.

**KEYWORDS:** Copper. Microalgae. Photosynthesis. *Scenedesmus*.

## 1 INTRODUÇÃO

O cobre (Cu) é um metal de transição amplamente utilizado na informática e na construção civil. Seu uso excessivo tem causado um aumento gradual das concentrações ambientais mensuradas (NRIAGU, 1996), expondo a biota de comunidade aquáticas, que representa o destino final mais comum de poluentes metálicos, a concentrações que podem causar danos celulares (LANGSTON, 2017). Portanto, monitorar as respostas fisiológicas do fitoplâncton em várias concentrações de cobre tem grande importância ecológica, somado ao fato de que estes organismos também estão relacionados com a captura de CO<sub>2</sub> da atmosfera, influenciando toda a biosfera (SCHOO et al., 2013).

De acordo com medições reportadas na literatura, o cobre total encontrado em reservatórios de água doce varia de  $\sim 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> a  $\sim 10^{-7.5}$  mol L<sup>-1</sup> (ASARE et al., 2018; ASHRAF et al., 1991; MCKNIGHT, 1981; VAN HULLEBUSCH et al., 2003), representando concentrações suficientes para causar efeitos fisiológicos em algumas espécies de microalgas (ECHEVESTE et al., 2017; LOMBARDI; MALDONADO, 2011). No entanto, o cobre é importante para processos fisiológicos e metabólicos em microalgas (SUNDA; HUNTSMANN, 1998), com efeitos prejudiciais sendo observados tanto em sua escassez quanto em seu excesso (LOMBARDI; MALDONADO, 2011). A fotossíntese é um destes processos afetados pelos íons de cobre. A plastocianina, uma proteína móvel que transporta elétrons entre o complexo Citocromo b6-f do fotossistema II (PSII) até

o fotossistema I (PSI), é cobre dependente (KNAUERT; KNAUER, 2008) e a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) possui íons Cu em seu centro ativo (JIANG et al., 2016). O cobre também atua no transporte de elétrons da respiração mitocondrial (STRYER, 1988) e desempenha um papel na absorção de ferro através da ferrioxamina (MALDONADO et al., 2006).

As microalgas são organismos fisiologicamente versáteis com tolerâncias espécie-específicas aos íons de Cu, relacionadas a suas histórias evolutivas (JOHNSON et al., 2007; LEVY et al., 2008). Algumas microalgas produzem agentes quelantes para lidar com íons metálicos do meio ambiente (MOFFETT; BRAND, 1996) enquanto outras capturam o cobre e outros metais em suas cápsulas mucilaginosas evitando sua internalização quando as concentrações ambientais são muito elevadas (LOMBARDI et al., 2002).

Uma das ferramentas utilizadas para avaliar a saúde fotossintética de um microrganismo autotrófico é através da medição da fluorescência da Clorofila *a*, por meio da técnica de fluorimetria de amplitude modulada (PAM), no qual podemos inferir suas eficiências fotossintéticas (RALPH; GADEMANN, 2005; YENTSCH; LEE, 1966). O Cu causa efeitos específicos no metabolismo fotoquímico, como a redução da taxa de transporte de elétrons e decréscimos na eficiência de captação de luz (PERALES-VELA et al., 2007; CHEN et al., 2016). Quando há excesso de cobre intracelular, é observado uma redução no transporte de elétrons entre os fotossistemas (PSII e PSI), diminuindo a produção de ATP e a eficiência fotossintética (FALKOWSKI; RAVEN, 2007; MALLICK; MOHN, 2003).

*Scenedesmus quadricauda*, a microalga utilizada neste estudo de caso, é uma clorofícea de distribuição global. Estudos com outra espécie deste mesmo gênero (*S. subspicatus*) demonstraram que sua parede celular possui capacidade de reter os íons de cobre, reduzindo os efeitos tóxicos mediados por este metal (KNAUER et al., 1997). Para investigar a interação do cobre com a fotossíntese desta microalga, cultivos foram expostos a quatro concentrações de cobre ( $6 \times 10^{-10}$  até  $9 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> livre) captando desde cenários ambientais até concentração acima daquelas reportadas para corpos d'água não contaminados. A densidade celular ao longo de 96h de crescimento foi monitorada e os rendimentos fotossintéticos mensurados. Os resultados mostraram que tanto a eficiência da fotossíntese quanto a capacidade de divisão celular de *S. quadricauda* foram afetadas pelo cobre. Isto indica que é preciso monitorar a concentração da forma livre deste metal em ambientes aquáticos, a fim de prevenir consequências ecossistêmicas negativas causadas pelo seu excesso.



## 2 METODOLOGIA

### 2.1 CULTIVO MICROALGAL E CONDIÇÃO EXPERIMENTAL

*Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta) foi obtida do Centro Canadense de Cultivo Microbiano (Universidade da British Columbia, Vancouver) e mantida no Laboratório de Biotecnologia de Algas, Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos (Brasil). Ela foi cultivada em meio LC Oligo concentrado (AFNOR,1980) esterilizado (autoclavado, 20 min). Seu crescimento foi estimulado usando  $130 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) em um ciclo claro-escuro (12:12 h) em temperatura controlada de  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . As culturas experimentais foram expostas a 4 concentrações de cobre que variaram de  $6 \times 10^{-10}$  até  $9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  livre (com réplicas) durante 96 h. Todas as garrafas de polycarbonato utilizadas no experimento foram previamente lavadas em  $\text{HNO}_3$  para a remoção de metais, enxaguadas com água milli-Q e autoclavadas com o meio de cultura. Para reduzir o risco de contaminação, somente materiais plásticos foram usados.

### 2.2 MEDIÇÃO DO COBRE E DAS TAXAS FOTOSSINTÉTICAS

A concentração de cobre livre no meio de cultura antes do inóculo das células foi determinada com um eletrodo íon-seletivo de cobre (Orion, modelo 94-29) acoplado a um eletrodo de referência de dupla junção (LOMBARDI et al., 2007). Utilizar o cobre livre permite afirmar a concentração de metal que está dissolvida no meio de cultura e, portanto, biodisponível para ser absorvido pela microalga. A densidade celular foi avaliada diariamente após coleta de uma amostra de cada cultivo, sendo preservada em lugol para posterior contagem numa câmara Fuchs-Rosenthal utilizando um microscópio óptico (Nikon Eclipse modelo 22 E200, Japão).

Para mensurar a eficiência fotossintética máxima do PSII ( $\Phi_m$ ), utilizou-se um fluorômetro com pulso de luz de amplitude modulada (Phyto-PAM, Heinz Walz GmbH, Alemanha). Ao longo do experimento, alíquotas retiradas de cada réplica foram expostas a pulsos de luz (20 s) com a mesma intensidade luminosa do cultivo para medir a eficiência fotossintética efetiva ( $\Phi'_m$ ) e as dissipações fotoquímica ( $q_P$ ) e não-fotoquímica (NPQ) (JUNEAU et al., 2002).

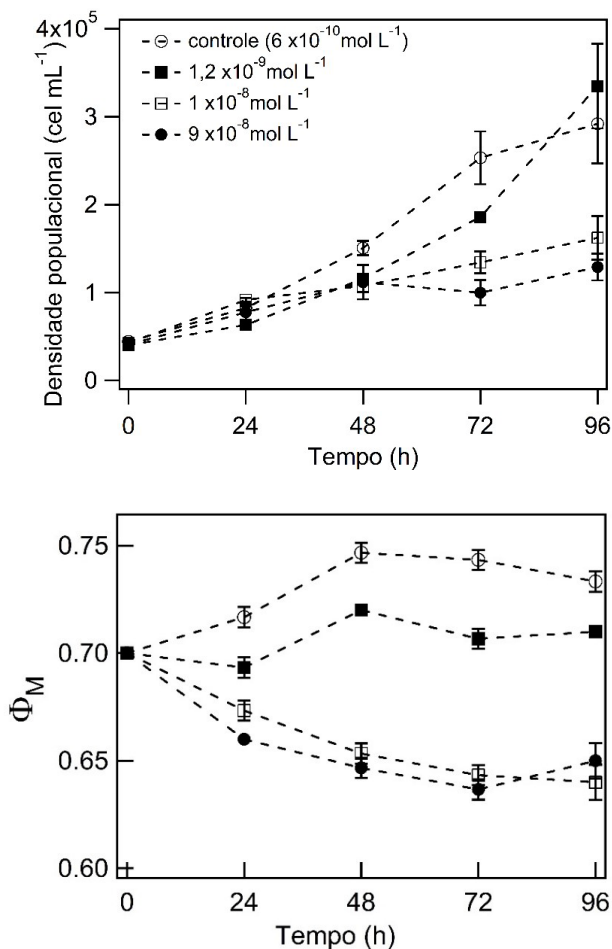
## 3 RESULTADOS

### 3.1 DENSIDADE CELULAR E RENDIMENTO FOTOSSINTÉTICO MÁXIMO

A densidade celular mensurada variou de acordo com a concentração de cobre no meio (Figura 1). A concentração mais baixa (controle,  $6 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  livre) e a

subsequente não afetaram a divisão das células e nem a eficiência máxima da fotossíntese,  $\Phi_m$ , que permaneceu acima de 0,7 durante todo o período experimental. As duas maiores concentrações reduziram tanto a densidade celular quanto  $\Phi_m$  ( $>0,7$ ).

Figura 1. Densidade populacional de cada cultivo de *Scenedesmus quadricauda* (em célula por mL) em função do tempo (acima) e eficiência fotossintética máxima ( $\Phi_m$ ) em função do tempo (abaixo). Os símbolos representam a concentração de cobre livre em cada tratamento e as barras de erro representam o desvio médio ( $n = 3$ ).

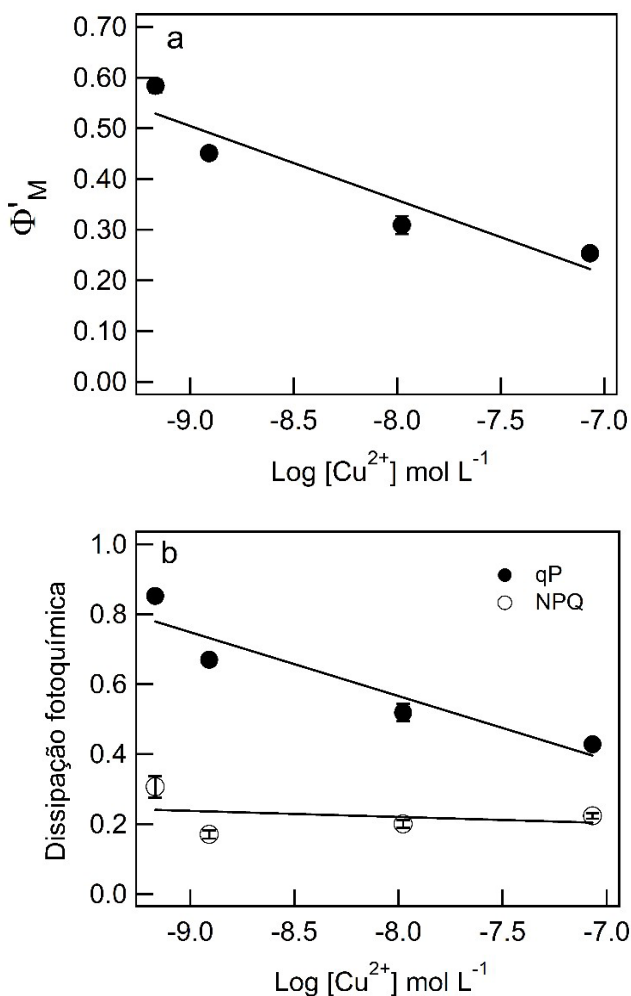


### 3.2 EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA EFETIVA E DISSIPAÇÕES FOTOQUÍMICA E NÃO-FOTOQUÍMICA

Houve um evidente declínio na eficiência fotossintética efetiva com o aumento do cobre (Figura 2). Esta eficiência fotossintética foi mais sensível em captar diferenças entre os tratamentos quando comparada a  $\Phi_m$  (Fig. 1). O menor valor registrado foi abaixo de 0,3 na maior concentração de cobre ( $9 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ). Houve uma diminuição linear

em qP, com valores acima de 0,8 em baixa concentração de cobre até ~0,45 nas células expostas a  $9 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>. Não foi observada alteração associada a concentração de cobre no meio nas medições de NPQ.

Figura 2. **a)** Eficiência fotossintética efetiva ( $\Phi'_M$ ) e **b)** dissipações fotoquímica (qP) e não-fotoquímica (NPQ) em função do logaritmo de [Cu<sup>2+</sup>] livre (em mol L<sup>-1</sup>) com barras de erro representando o desvio médio (n = 3).



#### 4 DISCUSSÃO

O acúmulo de cobre na parede celular e na cápsula mucilaginosa de diversas espécies de microalgas mostram a importância destas estruturas como barreiras para agentes externos. Os exopolissacarídeos aderem metais como o cobre (LOMBARDI; VIEIRA, 2000; LOMBARDI et al., 2005), variando em capacidade de aderência de acordo com a fase de crescimento e com a espécie testada. A ligação de íons metálicos de

cobre na parede celular de *Scenedesmus subspicatus* preveniu internalização extrema (KNAUER et al., 1997). Em certo ponto neste estudo de caso, teoriza-se que após a saturação da capacidade quelante da parede, o cobre adentrou as células de maneira proporcional ao seu incremento externo, causando a redução no crescimento e diminuição dos rendimentos fotossintéticos indicando que possivelmente o aparato fotossintético da microalga *Scenedesmus quadricauda* foi danificado.

Efeitos tóxicos associados ao excesso de cobre foram observados tanto na densidade celular quanto na eficiência fotossintética efetiva, que foram reduzidas em concentrações elevadas deste metal em sua forma livre ( $>10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>). A sensibilidade ao cobre aferida em parâmetros fotossintéticos foi reportada para diversas espécies de macroalgas marinhas (BAUMANN et al., 2009) e também em *Chlamydomonas reinhardtii* (JIANG et al., 2016), atingindo valores de  $\Phi_m$  inferiores a 0,3, como observado neste estudo de caso para *S. quadricauda*. A dissipação fotoquímica (qP) pode ser considerada uma avaliação da condição e saúde do aparato fotossintético, tendo sido afetada pelo aumento de cobre neste estudo de caso e também em diversos outros organismos reportados na literatura (CHEN et al., 2016; JIANG et al., 2016; MALLICK; MOHN, 2003). A redução causada pelos íons de cobre em qP pode ser interpretada como uma perturbação nos centros de reação que reduz a eficiência do PSII, além da alteração da taxa de transferência de elétrons (FALKOWISK; RAVEN, 2007). É possível relacionar a redução na capacidade fotossintética com a diminuição na densidade celular, uma vez que células expostas a estresse tendem a não se dividir a fim de sobreviver (PERALES-VELA et al., 2007). Este efeito já foi relatado também em cianobactérias e em co-cultivos de microalgas (DEXTRO et al., 2018; DEXTRO, 2021).

A energia que não é usada na fotossíntese pode ser convertida em calor e medida através do NPQ (LOMBARDI; MALDONADO, 2011). O aumento de NPQ como reflexo da alta concentração de cobre já foi observado em diversas microalgas de água doce (DEWEZ et al., 2005; ECHEVESTE et al., 2017; JIANG et al., 2016; PERALES-VELA et al., 2007). Contudo, neste estudo de caso não se observou alterações nos valores de NPQ mensurados. Este parâmetro, que reflete o destino da energia sobressalente do aparato fotoquímico, nem sempre consegue captar a saúde das células em condições extremas. Em um cenário de completa inibição do PSII causada pelo cobre, NPQ pode não ser um parâmetro fotossintético sensível o bastante para monitorar o estado celular (JUNEAU et al., 2002).

Conclui-se que, apesar de ser um micronutriente essencial, acima das concentrações requeridas, o cobre inibiu a capacidade fotossintética da microalga *Scenedesmus quadricauda*, reduzindo sua densidade celular, eficiência fotossintética

efetiva e dissipação fotoquímica. Apesar da parede celular atuar como barreira protetora em microalgas, esta função tem um limite associado a concentração de íons de cobre presentes no meio externo. Isso reforça a ideia de que é necessário monitorar os níveis de metais livres nos corpos d'água, para evitar riscos ecológicos associados ao declínio dos produtores primários nestes ambientes.

## 5 AUTORIZAÇÕES E AGRADECIMENTOS

Ambos os autores expressam que não existem conflitos de interesse referentes a esta obra e agradecem aos órgãos de fomento federais (CAPES e CNPq), bem como estaduais (FAPESP) pelas bolsas de pós-graduação que permitiram o desenvolvimento deste trabalho. Os autores também agradecem a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Teresa Lombardi, coordenadora do Laboratório de Biotecnologia de Algas onde o experimento deste estudo de caso foi conduzido.

## REFERÊNCIAS

AFNOR, F. Association Française Normalisation, Norme expérimentale. T90-304. **Essais deseaux**. Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus quadricauda* par une substance, Paris, France, 1980.

ASARE, M.L., COBBINA, S.J., AKPABEY, F.J., DUWIEJUAH, A.B., ABUNTORI, Z.N. Heavy Metal Concentration in Water, Sediment and Fish Species in the Bontanga Reservoir, Ghana. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, 10(1), 49-58, 2018.

ASHRAF, M., TARIQ, J., JAFFAR, M. Contents of trace metals in fish, sediment and water from three freshwater reservoirs on the Indus River, Pakistan. **Fisheries Research** 12, 355-364, 1991.

BAUMANN, H.A., MORRISON, L., STENGEL, D.B. Metal accumulation and toxicity measured by PAM – chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 72, 1063-1075, 2009.

CHEN, Z., SONG, S., WEN, Y., ZOU, Y., LIU, H. Toxicity of Cu (II) to the green alga *Chlorella vulgaris*: a perspective of photosynthesis and oxidant stress. **Environmental Science and Pollution Research** 18, 17910-17918, 2016.

DEXTRO, R.B., MOUTINHO, F.H.M. AND NORDI, C.S.F. Growth and special structures production of *Nostoc paludosum* (Nostocaceae, Cyanobacteria) under nutrient starvation and different light intensities. **Revista Ambiente & Água**, 13, e2191, 2018.

DEXTRO, R.B. Growth dynamic on a co-cultivation of two Chlorophyta microalgae exposed to copper. **Acta Limnologica Brasiliensia**, 33, e16, 2021.

DEWEZ, D., GEOFFROY, L., VERNET, G., POPOVIC, R. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. **Aquatic Toxicology** 74, 150-159, 2005.

ECHEVESTE, P., SILVA, J.C., LOMBARDI, A.T. Cu and Cd affect distinctly the physiology of a cosmopolitan tropical freshwater phytoplankton. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 143, 228-235, 2017.

FALKOWSKI, P.G., RAVEN, J.A. **Aquatic Photosynthesis**. Princeton University Press, UK, 2007.

JIANG, Y., ZHU, Y., HU, Z., LEI, A., WANG, J. Towards elucidation of the toxic mechanism of copper on the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Ecotoxicology** 25, 1417-1425, 2016.

JOHNSON, D.J., SANDERSON, H., BRAIN, R.A., WILSON, C.J., SOLOMON, K.R. Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 67, 128-139, 2007.

JUNEAU, P., BERDEY, EL., POPOVIC, R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 42, 155-164, 2002.

KNAUER, K., BEHRA, R., SIGG, L. Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyta). **Journal of Phycology** 33, 596-601, 1997.

KNAUERT, S., KNAUER, K. The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae. **Journal of Phycology** 44, 311-319, 2008.

LANGSTON, W.J. Toxic effects of metals and the incidence of metal pollution in marine ecosystems. In **Heavy metals in the marine environment**, CRC Press, US, pp. 101-120, 2017.

LEVY, J.L., ANGEL, B.M., STAUBER, J.L., POON, W.L., SIMPSON, S.L., CHENG, S.H., JOLLEY, D.F. Uptake and internalisation of copper by three marine microalgae: comparison of copper-sensitive and copper-tolerant species. **Aquatic Toxicology** 89, 82-93, 2008.

LOMBARDI, A.T., HIDALGO, T.M.R., VIEIRA, A.A.H. Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae). **Chemosphere** 60, 453-459, 2005.

LOMBARDI, A.T., HIDALGO, T.M.R., VIEIRA, A.A.H., SARTORI, A.L. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalga *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycology** 46, 74-78, 2007.

LOMBARDI, A.T., MALDONADO, M.T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis Research** 108, 77-87, 2011.

LOMBARDI, A.T., VIEIRA, A.A., SARTORI, L.A. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales). **Journal of Phycology** 38, 332-337, 2002.

LOMBARDI, A.T., VIEIRA, A.A.H. Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. **Phycology** 39, 118-125, 2000.

MALDONADO, M.T., ALLEN, A.E., CHONG, J.S., LIN, K., LEUS, D., KARPENKO, N., HARRIS, S.L. Copper-dependent iron transport in coastal and oceanic diatoms. **Limnology and Oceanography** 51, 1729-1743, 2006.

MALLICK, N., MOHN, F.H. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 55, 64-69, 2003.

MCKNIGHT, D. Chemical and biological processes controlling the response of a freshwater ecosystem to copper stress: A field study of the CuSO<sub>4</sub> treatment of Mill Pond Reservoir, Burlington, Massachusetts. **Limnology and Oceanography** 26, 518-531, 1981.

MOFFETT, J.W., BRAND, L.E. Production of strong, extracellular Cu chelators by marine cyanobacteria in response to Cu stress. **Limnology and Oceanography** 41, 388-395, 1996.

NRIAGU, J.O. A history of global metal pollution. **Science** 272 (5259), 223-223, 1996.

PERALES-VELA, H.V., GONZÁLEZ-MORENO, S., MONTES-HORCASITAS, C., CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). **Chemosphere** 11, 2274-2281, 2007.

RALPH, P.J., GADEMANN, R. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. **Aquatic Botany** 82, 222-237, 2005.

SCHOO, K.L., MALZAHN, A.M., KRAUSE, E., BOERSMA, M. Increased carbon dioxide availability alters phytoplankton stoichiometry and affects carbon cycling and growth of a marine planktonic herbivore. **Marine Biology** 8, 2145-2155, 2013.

STRYER, L. **Biochemistry** (3rd Edition). W.H. Freeman and Company, New York, USA, 1988.

SUNDA, W.G., HUNTSMAN, S.A. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems. **Science of Total Environment** 219, 165-181, 1998.

VAN HULLEBUSCH, E., CHATENET, P., DELUCHAT, V., CHAZAL, P.M., FROISSARD, D., BOTINEAU, M., BAUDU, M. Copper accumulation in a reservoir ecosystem following copper sulfate treatment (St. Germain Les Belles, France). **Water, Air and Soil Pollution** 150, 3-22, 2003.

YENTSCH, C., LEE, R.W. A study of photosynthetic light reactions, and a new interpretation of sun and shade phytoplankton. **Journal of Marine Research** 24, 319-337, 1966.

## ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE *Spodoptera* sp.

Data de submissão: 20/12/2022

Data de aceite: 13/01/2023

### Ninfa María Rosas-García

Laboratorio de Biotecnología Ambiental  
del Centro de Biotecnología Genómica del  
Instituto Politécnico Nacional  
Reynosa, Tamaulipas, México  
ORCID: 0000-0002-3411-6250

### Jesús Manuel Villegas-Mendoza

Laboratorio de Biotecnología Ambiental  
del Centro de Biotecnología Genómica del  
Instituto Politécnico Nacional  
Reynosa, Tamaulipas, México  
ORCID: 0000-0002-4644-8826

### Maribel Mireles-Martínez

Laboratorio de Biotecnología Ambiental  
del Centro de Biotecnología Genómica del  
Instituto Politécnico Nacional  
Reynosa, Tamaulipas, México  
ORCID: 0000-0001-7626-8378

### Jorge Alberto Torres-Ortega

Laboratorio de Biotecnología Ambiental  
del Centro de Biotecnología Genómica del  
Instituto Politécnico Nacional  
Reynosa, Tamaulipas, México  
ORCID: 0000-0001-8022-9638

**RESUMEN:** Este capítulo trata sobre el trabajo que nuestro grupo de investigación

ha realizado durante dos décadas para ofrecer alternativas al control de *Spodoptera frugiperda* y *S. exigua*. Estas plagas son de mucha importancia en México ya que atacan a una gran variedad de cultivos causando pérdidas económicas. Las alternativas amigables al ambiente que hemos estudiado son el uso de la bacteria *B. thuringiensis*, sola o en conjunto con baculovirus. Hemos estudiado alternativas de uso de derivados de plantas tales como los aceites esenciales y otros extractos con actividad insecticida. Se utilizaron parasitoides y hongos con capacidad de controlar a estos insectos. Y se exploró la síntesis de algunos compuestos sintéticos con actividad farmacéutica, para su uso en el control de estas plagas. Los resultados aquí mencionados pueden ser de utilidad en la aplicación del control biológico de estos insectos, que ya han desarrollado resistencia a los insecticidas químicos y su control se vuelve más difícil, brindando alternativas de solución amigables al ambiente.

**PALABRAS CLAVE:** Control biológico. Lepidópteros. Entomopatógenos. Insecticida. Insecto-plaga.

### STRATEGIES TO CONTROL *Spodoptera* sp.

**ABSTRACT:** This chapter deals with our research group's work for two decades to offer alternatives to control *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua*. These pests are significant in Mexico since they attack a wide variety of crops, causing economic losses. The environmentally



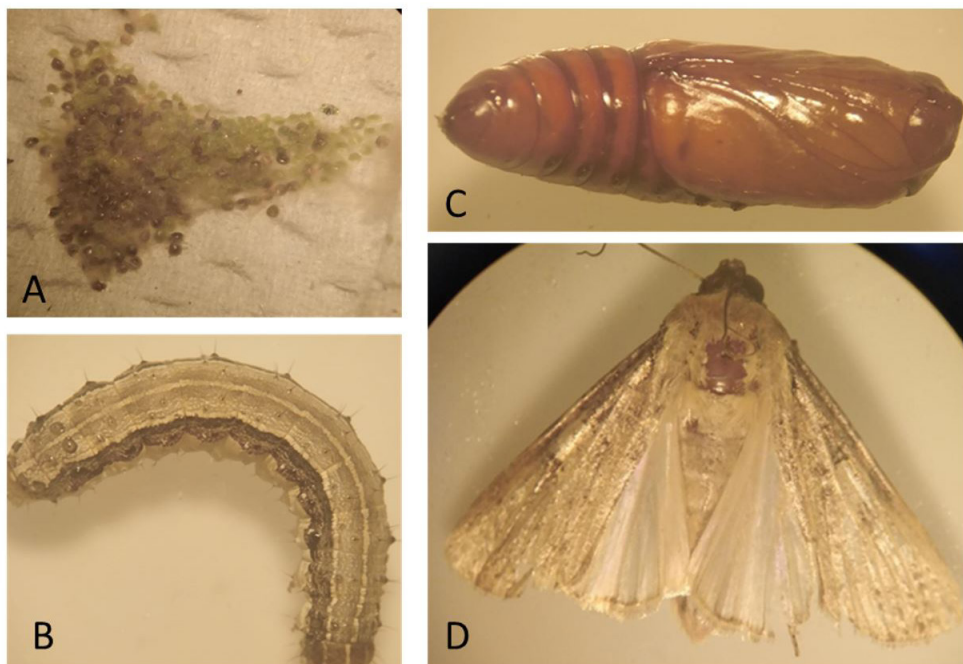
friendly alternatives we have studied include the bacterium *B. thuringiensis* alone or in conjunction with baculovirus. We have learned choices for using plant derivatives, such as essential oils and other extracts with insecticidal activity. Parasitoids and fungi able to control these insects were used, and we explored the production of synthetic compounds with pharmaceutical activity for their use in controlling these pests. The results mentioned here can be helpful in the application of biological control of these insects, which have already developed resistance to chemical insecticides, and their control has become more complex, providing alternative solutions that are friendly to the environment.

**KEYWORDS:** Biological control. Lepidoptera. Entomopathogens. Insecticide. Insect-pest.

## 1 INTRODUCCIÓN

*Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y *Spodoptera exigua* (Hübner) ambos pertenecientes al orden Lepidoptera y a la familia Noctuidae, son dos plagas de insectos de importancia económica que atacan a una gran variedad de cultivos, principalmente maíz, arroz y algodón. En la Fig. 1 se observan las fases de desarrollo de *Spodoptera frugiperda*.

Fig. 1. Fases de desarrollo de *Spodoptera frugiperda*. A) huevecillos, b) larva, C) pupa, D) adulto.



### 1.1 SPODOPTERA FRUGIPERDA

*Spodoptera frugiperda* se conoce comúnmente como el gusano cogollero y causa serios daños al follaje de las plantas y a los frutos. *S. frugiperda* es un insecto nativo de las regiones tropicales del hemisferio oeste que abarca desde Estados Unidos hasta

Argentina tiene un ciclo de vida completo de 30 días en verano, pero éste puede alargarse hasta 90 días en invierno. Los huevecillos tienen forma de domo y la base es aplanada, la ovipostura por hembra tiene un promedio de 1500 a 2000 huevecillos. La etapa larvaria tiene usualmente seis instares y puede llegar a medir hasta 34.2 mm. Las larvas varían de color según su edad pasando del verdoso al anaranjado hasta llegar al parduzco. Tiene líneas blancas laterales y subdorsales y la cara está marcada por una Y invertida de color blanco. El proceso de pupación se lleva a cabo en el suelo en donde la larva construye un capullo suelto utilizando partículas de suelo y seda, la pupa es de color café rojizo, puede medir hasta 18 mm de largo y tiene una duración de 8 a 9 días.

El adulto es una palomilla con una envergadura alar de hasta 40 mm. En los machos el ala anterior tiene un sombreado gris y café, en la hembra varía de un color café grisáceo a un moteado fino gris y café.

Las larvas son muy voraces y se alimentan de las hojas en las cuales forman hoyos. Este insecto ataca frecuentemente a las plantas de maíz ya que se introduce en el cogollo en donde hace unas características perforaciones en hilera en las hojas. Por lo general hay una larva por planta ya que tienen un comportamiento caníbal. Las larvas también se introducen entre las hojas del elote y se alimentan de sus granos y a veces barrenan el elote. En este insecto se han identificado dos cepas genéticamente diferentes que se han denominado cepa maíz y cepa arroz, las cuales presentan características diferentes en su preferencia a las plantas hospederas (Capinera, 2014; Juárez et al., 2012).

## 1.2 SPODOPTERA EXIGUA

*Spodoptera exigua* conocido comúnmente como el gusano soldado, es originario del sureste asiático y fue descubierto en Norteamérica en 1876. Su ciclo de vida completo es de 24 días y su actividad varía de acuerdo al clima. Las hembras ovipositan en racimos de hasta 150 huevecillos y puede producir hasta 600 en su vida fértil. Los huevecillos son de color verdoso a blanco y están cubiertos de una capa de escamas blancosas. Las larvas presentan normalmente cinco instares y son de color verde o amarillo pálido cuando son jóvenes y después adquieren rayas pálidas que luego se oscurecen. La pupación ocurre en el suelo y el capullo está construido de arena y partículas del suelo pegadas con una secreción oral que se endurece al secar. La pupa es de color café claro, mide hasta 20 mm de largo y dura de 6 a 7 días. Los adultos son de tamaño moderado y su envergadura alar mide hasta 30 mm. Las alas anteriores están moteadas de color gris y café y tienen un patrón de bandeo irregular. Las alas traseras son de color gris o blanco con una línea oscura en el margen.

El gusano soldado ataca a una gran variedad de cultivos entre ellos el espárrago, frijol, col coliflor, lechuga, cebolla, maíz, apio, espinaca, camote, tomate, algodón, soya, sorgo, etc. Las larvas se alimentan del follaje y del fruto, son gregarias y son tan voraces que comen el follaje hasta dejar el esqueleto. Conforme crecen, las larvas se vuelven solitarias y se alimentan formando grandes hoyos irregulares en las hojas. También barrenan las coronas de las cabezas de lechuga o los brotes de col (Capinera, 2020; Garza-Urbina, 2007).

Debido a los importantes daños que estos insectos-plaga causan a una gran variedad de cultivos (Fig. 2), su combate se ha realizado desde hace muchos años con la aplicación de diversos insecticidas químicos (Tabla 1).

Fig. 2. Daños causados en hojas de maíz por *Spodoptera* sp. 1) hoja sana, 2) daño ligero, 3) daño medio, 4) daño elevado, 5) daño muy elevado, 6) daño severo, 7) muerte de la hoja.

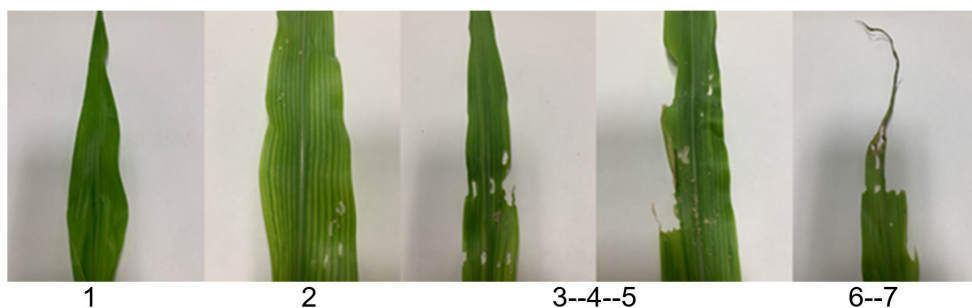


Tabla 1. Insecticidas clasificados por grupo químico usados en el control de *Spodoptera* sp.

Piretroides	Organofosforados	Organoclorados	Carbamatos	Benzoil urea	Diamidas antranilicas	Neonicotinoide	Oxadiazinas	Avermectina	Espinosin
Cialotrina-lamba <sup>a</sup>	Diazinón	Endosulfán	Tiodicarb	Teflubenzurón <sup>a</sup>	Clorantraniliprol	Imidaclopid	Indoxacarb <sup>a</sup>	Benzoato de emamectina	Spinosad
Fluvalinato <sup>a</sup>	Diclorvos <sup>b</sup>		Metomil						
Cipermetrina <sup>b</sup>	Malatión		Carbaryl						
Permetrina <sup>b</sup>	Clorpirifos <sup>b</sup>		Carbofuran						
Fenvalerato <sup>b</sup>	Sulprofos								
Tralometrina	Paratión metílico								
Bifentrin <sup>a</sup>	Profenofos								
Tetrametrina	Dimetoato								
Esfenvalerato <sup>b</sup>	Metamidofos								
Deltametrina	Acefato								
Fenpropatrina	Sulprofos								
Ciflutrina-beta <sup>b</sup>									

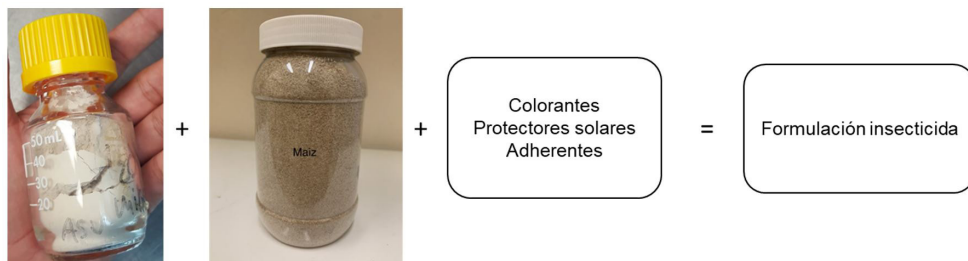
a= clorado, fluorado, b= clorado, c= bromado. (Yu, 1991; Garza-Urbina & Terán-Vargas, 2007; Abdu-Allah, 2001; Barrientos-Gutiérrez et al., 2013; Bentivenha et al., 2019).

## 2 ESTRATEGIAS DE CONTROL

### 2.1 USO DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

La bacteria *Bacillus thuringiensis* ha sido ampliamente utilizada en el control de plagas de insectos, sin embargo, ha sido un reto controlar a *S. frugiperda* y *S. exigua*. Existen algunas cepas de *B. thuringiensis* con alta actividad tóxica hacia estos insectos, pero están protegidas en organizaciones de colección de cultivos, por lo que no es posible acceder a ellas. En este sentido la búsqueda de nuevas cepas de *B. thuringiensis* con buenas actividades tóxicas se vuelve una tarea importante. Si bien existen algunas cepas que presentan cierta actividad tóxica, es necesario incrementar la ingestión por parte del insecto para que la cepa pueda ser efectiva, en este sentido se han preparado diversas combinaciones de formulaciones que están diseñadas para ser agradables al gusto y así incrementar la respuesta alimenticia por parte del insecto. La respuesta visual del insecto también es importante por lo que el uso de colorantes facilita la atracción del insecto y que la formulación sea ingerida (Fig. 3).

Fig. 3. La mezcla de *Bacillus thuringiensis* más fagoestimulantes y otros aditivos da como resultado una formulación insecticida.



Este proceso asegura la ingestión de una dosis suficiente de la bacteria que mate al insecto. Muchas cepas de *B. thuringiensis* poco activas pueden convertirse en agentes más tóxicos si la formulación es atractiva y apetecible al insecto (Rosas-García et al., 2009; Villegas-Mendoza & Rosas-García, 2013).

### 2.2 USO DE *BACILLUS THURINGIENSIS* Y BACULOVIRUS

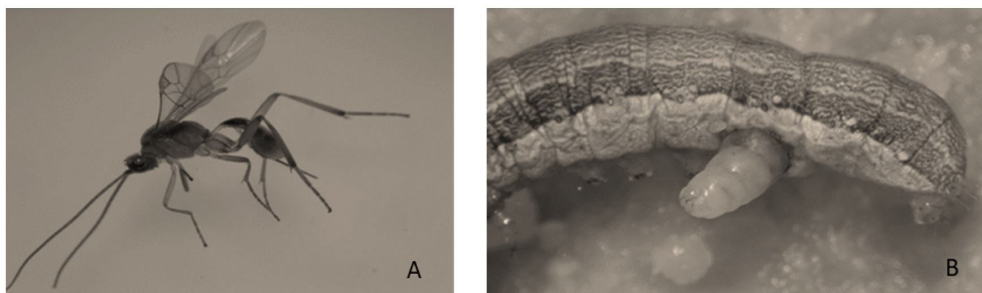
Los virus de la poliedrosis nuclear múltiple (MNVP) han sido considerados como buenos agentes para el control de *S. frugiperda* y *S. exigua*. Estos virus son muy específicos y altamente patogénicos, pero su acción de control tarda varios días. En el interés de mejorar las actividades patogénicas que tiene tanto el MNVP y *B. thuringiensis* por sí solos, se realizaron formulaciones en las cuales se combinó el complejo espora-

crystal (cec) de la cepa HD-133 de *B. thuringiensis* con los cuerpos de oclusión (OBs) SeMNVP y/o SfMNVP a diferentes concentraciones. Gracias a las combinaciones realizadas, las concentraciones utilizadas para controlar a *S. exigua* fueron menores que las necesarias para controlar a *S. frugiperda*, mostrando esta última plaga mayor resistencia a las combinaciones. Es importante señalar que hubo una actividad sinérgica en la combinación de *B. thuringiensis* con SeMNVP contra *S. exigua* y las combinaciones de *B. thuringiensis* y SfMNVP mostraron una interacción aditiva contra *S. frugiperda* (Guido-Cira et al., 2017).

### 2.3 USO DE PARASITOIDES

*S. frugiperda* y *S. exigua* ofrecen por lo general resistencia a distintas cepas de *B. thuringiensis*, por lo que el uso de parasitoides surge como una alternativa más al control de estos insectos. Los parasitoides son insectos que atacan insectos. El parasitoide coloca sus huevecillos en la larva hospedera (Fig. 4), la larva del parasitoide se desarrolla interna o externamente en el hospedero causando su muerte (Grimaldi & Engel, 2005).

Fig. 4. A) Adulto del parasitoide *Meteorus* sp., B) larva hospedera de *S. frugiperda* parasitada por *Meteorus* sp. (Fotografía tomada de Villegas-Mendoza et al., 2015).



La mayoría de los parasitoides pertenecen a los órdenes Hymenoptera e Ichneumonidae. Un himenóptero identificado como *Meteorus laphygmae*, resultó ser un importante controlador de *Spodoptera* sp. Este parasitoide fue encontrado en Durango, México y aunque su parasitismo de manera natural no es muy abundante, las liberaciones masivas de este insecto pueden brindar un buen control para estas especies de *Spodoptera*.

### 2.4 USO DE DERIVADOS DE N-ÓXIDO

No obstante, la eficacia de los insecticidas químicos, en las últimas décadas estos compuestos han disminuido su capacidad tóxica en virtud de la resistencia que estas especies de *Spodoptera* han desarrollado. Sin embargo, la búsqueda de nuevos

compuestos no ha cesado y los compuestos químicos con actividades novedosas han sido evaluados contra estas especies. Los derivados de *N*-óxido, obtenidos a partir de la quinoxalina y el benzofurano que son compuestos que tienen un amplio espectro de actividades biológicas (Patidar et al., 2011), fueron producidos en el laboratorio mediante sustitución del segundo y tercer sustituyentes de la amina. Los cinco derivados obtenidos denominados como QX1, QX2, QX3, QX4 y QX5 fueron evaluados en larvas de dos días de edad de *S. frugiperda* mediante bioensayos de incorporación a la dieta y de pulverización, para observar el efecto tanto de la ingestión de los compuestos como del contacto con ellos (Fig. 5).

Fig. 5. Clave y estructura química de los derivados de *N*-óxido (Rosas-García, et al. 2014).

QX1		QX3		QX5	
QX2		QX4		QX6	

Mediante la ingestión, las quinoxalinas no causaron una mortalidad significativa, pero sí causaron efectos sub-letales de inhibición del crecimiento en las larvas sobrevivientes. Las quinoxalinas aplicadas por contacto causaron una mortalidad por debajo del 10%, por lo que para fines de control de plagas este valor no es útil (Rosas-García et al., 2014).

## 2.5 USO DE ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales se han usado desde épocas milenarias para el tratamiento de enfermedades en el ser humano y en épocas más recientes utilizados como ingredientes predominantes en diversos tipos de industrias tales como la farmacéutica, alimenticia y cosmética entre otras. Están constituidos por compuestos naturales y se caracterizan por su fuerte olor (Bakkali et al., 2008). Son metabolitos secundarios producidos por las plantas y que han demostrado actividades antimicrobianas, antivirales, antifúngicas e inclusive entomotóxicas (Isman, 2000). Según Konecka et al. (2018) los aceites esenciales matan a los insectos alterando su metabolismo y por consiguiente el desarrollo de su ciclo de vida. En un experimento se probaron 15 aceites esenciales puros comerciales (eucalipto, ciprés, romero, limón, hierbabuena, menta, chocolate, orégano, pino, canela, lavanda, geranio, mandarina y citronela) mediante fase de vapor (inhalación), contacto e ingestión en larvas neonatas de *S. exigua* (Fig. 6).

Fig. 6. Métodos utilizados para determinar la actividad tóxica de aceites esenciales en larvas neonatas de *Spodoptera exigua*. A) Fase de contacto en denta artificial, B) Fase de ingestión en hojas, C) Fase de vapor en frascos.



La inhalación de los aceites esenciales provocó mayor mortalidad que las otras dos vías de exposición, sin embargo, este tipo de exposición no puede aplicarse en campo ya que este insecto habita en espacios abiertos. Los aceites esenciales que mataron a menos del 50% de las larvas evaluadas tuvieron un efecto en el peso. Los aceites de menta, canela, clavo, geranio y citronela disminuyeron el peso larvario hasta en un 43%, mientras que el de limón, hierbabuena y mandarina causó un incremento en el peso de las larvas hasta de un 37%. El aceite que redujo más la ovispostura fue el de clavo y los aceites de clavo, geranio y citronela disminuyeron la eclosión a porcentajes de 40%, 76% y 72% respectivamente (Rosas-García et al., 2021). Este estudio demuestra que los aceites esenciales pueden utilizarse en el control de estas plagas, ya que al causar daños sub-letales, se reduce el daño que el insecto ocasiona a las plantas.

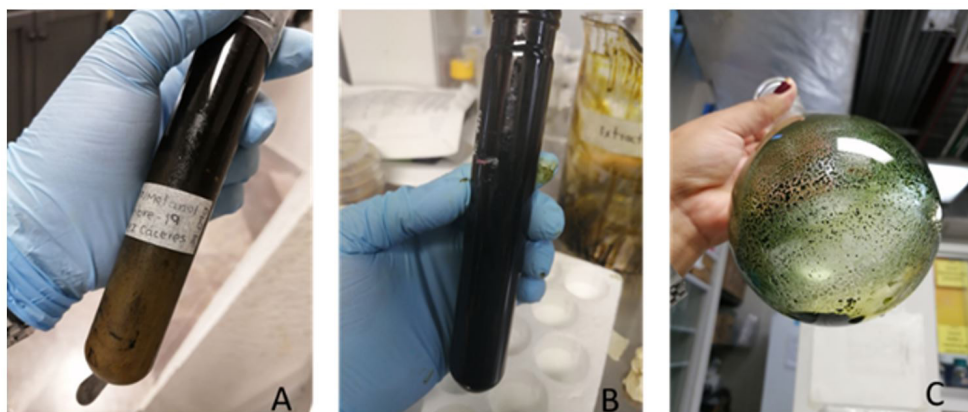
## 2.6 EXTRACTOS DE PLANTAS

Algunos estudios han demostrado que las plantas pueden producir metabolitos con actividad insecticida (Santos et al., 2013), por lo que se consideró la planta *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) conocida comúnmente como ruda para obtener algunos metabolitos de utilidad en el control de *S. frugiperda*. De esta planta se han obtenido diversos metabolitos con actividad citotóxica, por lo que resultó de interés probar los metabolitos con esta especie. La extracción de metabolitos se realizó en el tejido foliar con solventes de diferente polaridad (acetato de etilo, etanol y agua). Los metabolitos extraídos fueron identificados como psoralen, 2-undecanona y rutina, los resultados de mortalidad indicaron que la 2-undecanona puede ser utilizada en el desarrollo de nuevos insecticidas para el control de *S. frugiperda* (Ayil-Gutiérrez et al., 2015).

Por otra parte, la planta *Phitecellobium dulce* (Roxb.) Benth. (Fabaceae), comúnmente conocida como guamúchil es un árbol que da un fruto cuya pulpa es comestible. Las diferentes partes de este árbol se han utilizado para remediar algunos problemas bucales en el ser humano tales como úlceras bucales o dolor de muelas,

así mismo tienen propiedades antipiréticas. La extracción hexánica de las semillas de esta planta fue capaz de controlar al 100% a las larvas neonatas de *S. exigua* a una concentración de 50 mg/ml. La composición del extracto no fue determinada por lo que el compuesto con actividad insecticida se desconoce, sin embargo, es un importante hallazgo ya que los extractos de esta planta nunca habían sido evaluados contra insectos lepidópteros y ahora resultan ser una novedad en el control de *S. exigua* (Del Ángel-Casto et al., 2019). También se elaboraron extractos de orégano, los cuales mostraron una alta actividad tóxica por contacto causando un 65% de mortalidad. (Fig. 7).

Fig. 7. Extractos crudos de la planta de orégano obtenidos mediante arrastre de vapor. A) Orégano con metanol, B) Extracto del orégano, C) Extracto del orégano concentrado.



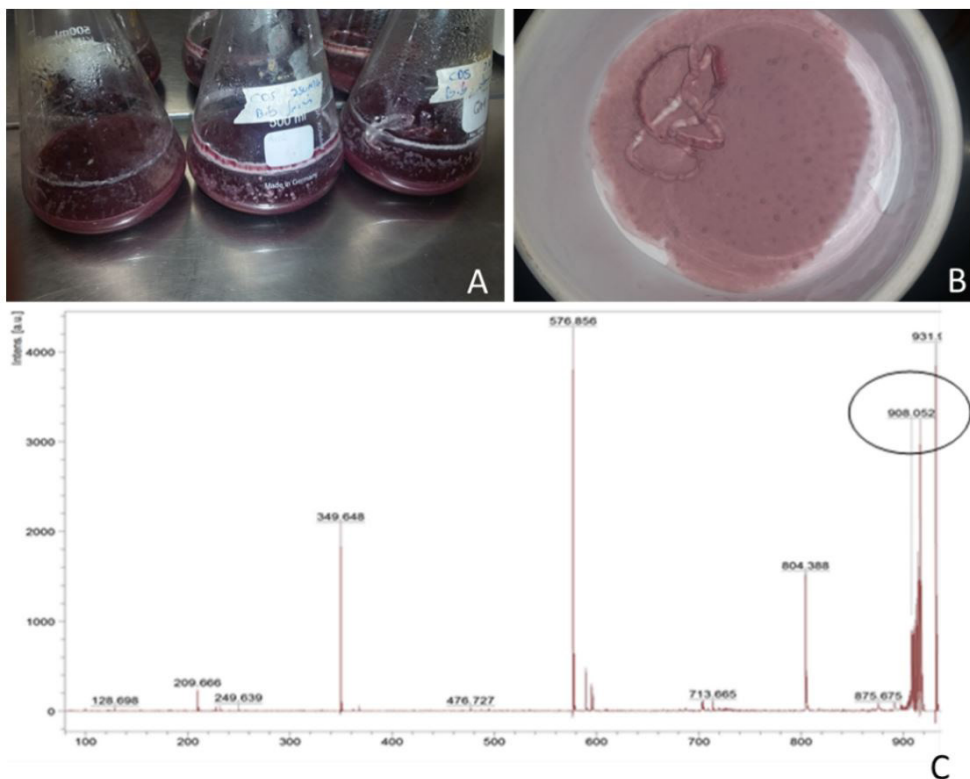
## 2.7 USO DE HONGOS

Existe una variedad de hongos entomopatógenos que se han utilizado con éxito para el control de plagas de insectos, entre los más sobresalientes se encuentra *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin (Sordariomycetes: Hypocreales). El modo de acción de los hongos entomopatógenos, que ocurre básicamente por contacto, es ampliamente conocido, sin embargo, se ha asociado a este proceso patogénico la producción de algunos metabolitos secundarios que contribuyen como factores de virulencia. En este sentido existen algunas cepas que ofrecen baja patogenicidad, pero que pueden ofrecer una mayor actividad tóxica mediante la producción de diversos metabolitos secundarios o en su caso combinar ambos factores para tener una cepa altamente patogénica. Con la intención de conocer si algún metabolito de *B. bassiana* podría tener actividad tóxica contra larvas de *S. frugiperda* y *S. exigua*, se obtuvo un extracto metanólico a partir del micelio. Previamente siete cepas (1149, 1315, 1512, 1627, 2253, 5649, y 3288) del USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures (ARSEF) fueron evaluadas para determinar la patogenicidad utilizando conidias. La cepa más patogénica fue la 1149 con



un 33.33% de mortalidad en ambas especies de *Spodoptera*, ninguna otra cepa superó este valor, por lo que la 1149 fue elegida para realizar la extracción metanólica. El extracto metanólico obtenido se evaluó por ingestión en las larvas y a una concentración de 1 mg/ml causó una mortalidad superior al 90% en ambas especies, superando por mucho a la actividad patogénica de las conidias. Los análisis de espectrometría de infrarrojo indicaron la presencia de grupos funcionales que se asocian a la bassianolida y a la beauvericina (Fig 8).

Fig. 7. Cepa de *Beauveria bassiana* 1149 (ARSEF). A) Crecimiento del micelio en caldo papa dextrosa. B) Recuperación del micelio por filtración, C) Análisis de espectrometría de masas del extracto micelial de la cepa 1149.



El uso o la inclusión de este tipo de compuestos en insecticidas podría potenciar fuertemente la actividad insecticida, ofreciendo un mayor control (Villegas-Mendoza et al., 2019).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdu-Allah, G. (2011). Potency and Residual Activity of Emamectin Benzoate and Spinetoram on *Spodoptera littoralis* (Boisduval). *African Entomology*, 19(2), 733-737. <https://doi.org/10.4001/003.019.0313>

Ayil-Gutiérrez, B. A., Villegas-Mendoza, J. M., Santes-Hernández, Z., Paz-González, A. D., Mireles-Martínez, M., Rosas-García, N. M., & Rivera, G. (2015). *Ruta graveolens* extracts and metabolites against *Spodoptera frugiperda*. *Natural Product Communications*, 10(11), 1955-1958.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol*, 46(2), 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

Barrientos-Gutiérrez, J. E., Huerta-de la Peña, A., Escobedo-Garrido, J. S., & López-Olguín, J. F. (2013). Manejo convencional de *Spodoptera exigua* en cultivos del municipio de Los Reyes de Juárez, Puebla. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícola*, 4(8), 1197-1208.

Bentivenha, J. P. F., Rodrigues, J. G., Lima, M. F., Marçon, P., Popham, H. J. R., & Omoto, C. (2019). Baseline susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to SfMNPV and evaluation of cross-resistance to major insecticides and Bt proteins. *Journal of Economic Entomology*, 112(1), 91-98. <https://doi.org/10.1093/jee/toy342>

Capinera, J. L. (2014). *Fall armyworm, Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). University of Florida.

Capinera, J. L. (2020). Featured Creatures. In E. Rodhes (Ed.), (Vol. EENY 105). USA: UF/IFAS.

Del Ángel-Casto, A. P., Santiago-Adame, R., Mireles-Martínez, M., Rosas-García, N. M., & Villegas-Mendoza, J. M. (2019). Efecto insecticida de un extracto hexánico de guamúchil (*Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. 1844) Contra *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808). *Entomología Mexicana*, 6(6), 104-107.

Garza-Urbina, E., Terán-Vargas, A.P. . (2007). *El gusano soldado Spodoptera exigua y su manejo en la planicie Huasteca*. San Luis Potosí, México: Instituto Nacional de Investigaciones forestales, acuícolas y pecuarias

Grimaldi, D., & Engel, M. S. (2005). *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press.

Guido-Cira, N. D., Tamez-Guerra, P., Mireles-Martínez, M., Villegas-Mendoza, J. M., & Rosas-García, N. M. (2017). Activity of *Bacillus thuringiensis*- and baculovirus-based formulations to *Spodoptera* species. *Southwestern Entomologist*, 42(1), 191-201.

Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603-608.

Juárez, M. L., Murúa, M. G., García, M. G., Ontivero, M., Vera, T., Vilardi, J. C., Groot, A. T., Castagnaro, A. P., Gastaminza, G., & Willink, E. (2012). Host association of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains in Argentina, Brazil, and Paraguay. *Journal of Economic Entomology*, 105(2), 573-582.

Konecka, E., Kaznowski, A., Marcinkiewicz, W., Tomkowiak, D., Maciąg, M., & Stachowiak, M. (2018). Insecticidal activity of *Brassica alba* mustard oil against lepidopteran pests *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), *Dendrolimus pini* (Lepidoptera: Lasiocampidae), and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Plant Protection Research*, 58, 206-209. <https://doi.org/10.24425/119129>

Patidar, A. K., Jeyakandan, M., Mobjiya, A. K., & Selvam, G. (2011). Exploring potential of quinoxaline moiety. *International Journal of PharmaTech Research*, 3(1), 386-392.

Rosas-García, N. M., Herrera-Mayorga, V., Mireles-Martínez, M., Villegas-Mendoza, J. M., & Rivera, G. (2014). Toxic activity of *N*-oxide derivatives against three Mexican populations of *Spodoptera frugiperda*. *Southwestern Entomologist*, 39(4), 717-726.

Rosas-García, N. M., Torres-Ortega, J. A., & Villegas-Mendoza, J. M. (2021). Lethal and sublethal effects of commercial essential oils on the life cycle of *Spodoptera exigua* (Hübner). *Southwestern Entomologist*, 46(3), 613-623.

Rosas-García, N. M., Villegas-Mendoza, J. M., & Torres-Ortega, J. A. (2009). Design of a *Bacillus thuringiensis*-based formulation that increases feeding preference on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Journal of Economic Entomology*, 102(1), 58-63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1603/029.102.0109>

Santos, M. A. I., Corrêa, A. D., Alves, A. P. D. C., Simão, A. A., Alves, D. S., Oliveira, R. L. D., Saczk, A. A., & Carvalho, G. A. (2013). Extrato metanólico de farinha de folhas de mandioca como alternativa ao controle da lagarta-do-cartucho e de formigas cortadeiras. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(6Supl1), 3501. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6supl1p3501>

Villegas-Mendoza, J. M., Mireles-Martínez, M., Rodríguez-Castillejos, G. C., Santiago-Adame, R., & Rosas-García, N. M. (2019). Evaluación de la toxicidad de un extracto metanólico de *Beauveria bassiana* en larvas de *Spodoptera exigua* y *Spodoptera frugiperda*. *Southwestern Entomologist*, 44(3), 715-722.

Villegas-Mendoza, J. M., & Rosas-García, N. M. (2013). Visual and gustatory responses of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to artificial food dyes. *Florida Entomologist*, 96(3), 1102-1106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1653/024.096.0350>

Villegas-Mendoza, J. M., Sánchez-Varela, A., & Rosas-García, N. M. (2015). Caracterización de una especie de *Meteorus* (Hymenoptera: Braconidae) presente en larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en el norte de Tamaulipas, México. *Southwestern Entomologist* 40(1), 161-170. <https://doi.org/10.3958/059.040.0114>

Yu, S. J. (1991). Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 39(1), 84-91.

# CAPÍTULO 15

## USO DE SENSORES REMOTOS Y SUS APLICACIONES EN ESTUDIOS DE LAGOS CHILENOS

Data de submissão: 10/12/2022

Data de aceite: 06/01/2023

### Patricio R. de los Rios-Escalante

Departamento de Ciencias  
Biológicas y Químicas  
Facultad de Recursos Naturales  
Universidad Católica de Temuco  
Casilla 15-D, Temuco, Chile  
Núcleo de Estudios Ambientales  
UC Temuco, Chile  
<https://orcid.org/0000-0001-5056-7003>

### Angel Contreras

Departamento de Ciencias  
Biológicas y Químicas  
Facultad de Recursos Naturales  
Universidad Católica de Temuco  
Casilla 15-D, Temuco, Chile  
<https://orcid.org/0000-0003-0349-6761>

### Gladys Lara

Departamento de Ciencias  
Biológicas y Químicas  
Facultad de Recursos Naturales  
Universidad Católica de Temuco  
Casilla 15-D, Temuco, Chile

### Mirtha Latsague

Departamento de Ciencias  
Biológicas y Químicas  
Facultad de Recursos Naturales  
Universidad Católica de Temuco  
Casilla 15-D, Temuco, Chile

### Carlos Esse

Instituto Iberoamericano de  
Desarrollo Sostenible (IIDS)  
Unidad de Cambio Climático y  
Medio Ambiente (UCCMA)  
Facultad de Arquitectura  
Construcción y Medio Ambiente  
Universidad Autónoma de Chile  
Temuco, Chile  
<https://orcid.org/0000-0002-5030-3275>

**RESUMEN:** El uso de técnicas de percepción remota en lagos, ha sido de gran importancia en las últimas décadas porque son una nueva herramienta para el estudio de la calidad de agua, así como para programas de monitoreo y control de contaminación, situación que se ha aplicado en lagos chilenos. Los primeros estudios se basaron en propiedades espectrales y comunidades zooplanctónicas en lagos con influencia glaciar, encontrándose que las zonas más coloreadas que corresponderían a alta presencia de sales glaciares tienen baja diversidad de zooplancton. Los estudios más recientes en lagos con diferente estado trófico, revelaron marcadas diferencias en las propiedades espectrales que están asociadas a condiciones tróficas y por ende las comunidades planctónicas. El presente estudio propone continuar con estos estudios para entender procesos limnológicos, así como para futuros planes de manejo de contaminación lacustre.

**PALABRAS CLAVE:** Percepción remota. Lagos. Patagonia. Plancton.

## USO DE SENSORES REMOTOS E SUAS APLICAÇÕES EM ESTUDOS DE LAGOS CHILENOS

**RESUMO:** O uso de técnicas de sensoriamento remoto em lagos tem sido de grande importância nas últimas décadas porque são uma nova ferramenta para o estudo da qualidade da água, bem como para programas de monitoramento e controle da poluição, situação que tem sido aplicada em lagos chilenos. Os primeiros estudos foram baseados em propriedades espectrais e comunidades zooplanctônicas em lagos com influência glacial, constatando que as áreas mais coloridas que corresponderiam a uma alta presença de sais glaciais possuem baixa diversidade de zooplâncton. Os estudos mais recentes em lagos com diferentes estados tróficos revelaram diferenças marcantes nas propriedades espectrais que estão associadas às condições tróficas e, portanto, às comunidades planctônicas. O presente estudo propõe continuar com esses estudos para entender os processos limnológicos, bem como para futuros planos de gerenciamento da poluição do lago.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sensoriamento remoto. Lagos. Patagônia. Plâncton.

### 1 INTRODUCCIÓN

El uso de técnicas de percepción remota en lagos ha tenido mucha importancia en las últimas décadas, pues sobre la base de la resolución de los sensores de las fotografías satelitales y el uso de técnicas computacionales y de ciencias de datos es posible lograr conseguir parámetros ambientales como temperatura, y pigmentos fitoplanctónicos (Chandler et al., 2020; Dar et al., 2020; Kwon et al., 2020; Lee et al., 2020; Shen et al., 2020; Soria et al., 2020). Estos estudios pueden servir de base para manejo de contaminación por exceso de nutrientes con la consecuente eutroficación en lagos (Chandler et al., 2020; Lee et al., 2020).

Esta realidad se ha aplicado en lagos chilenos en las últimas décadas, los primeros estudios se realizaron en lagos con marcado efecto glacial, en que la coloración del lago, que por ende afectaría probablemente la concentración de clorofila, finalmente tendría efectos en la comunidad zooplanctónica (De los Ríos-Escalante et al., 2013; De los Ríos-Escalante & Acevedo, 2016a,b), así como descripciones espectrales en lagos de montaña de difícil acceso (De los Ríos-Escalante et al., 2017a,b,c). En los últimos tres años, se ha podido encontrar relaciones entre estado trófico, comunidades pelágicas (fitoplancton, zooplancton) y propiedades espectrales en lagos con diferente estado trófico (De los Ríos-Escalante et al., 2020, 2022a,b). El presente estudio es una revisión de la literatura sobre aplicaciones de percepción remota en lagos chilenos.

## 2 PRIMEROS ESTUDIOS: LAGOS DE ORIGEN GLACIAR DE LA PATAGONIA CHILENA (41-46°S)

Los primeros estudios se realizaron en los lagos General Carrera (46°S), y Tagua-Tagua (41°S), los que se caracterizan por el marcado efecto de sales glaciares en algunas bahías puntuales (De los Ríos-Escalante et al., 2013; De los Ríos-Escalante & Acevedo, 2016a,b) basados en propiedades del satélite LANDSAT ETM+. En el caso del lago General Carrera, este lago, tiene una morfometría irregular con numerosas bahías, en que en las localizadas en la zona norte desembocan ríos originados desde glaciares en las montañas lo que le da tonos turbios gris a verde característico, mientras que en la costa sur donde no existe este efecto glaciar el lago tiene una alta transparencia (De los Ríos-Escalante et al., 2013). Los reportes encontraron que en las zonas con alta concentración glaciar (por ende con alta reflectancia) hay muy baja riqueza y abundancia de especies en comparación a zonas sin efecto glaciar (Figs. 1 y 2; De los Ríos-Escalante et al., 2013; De los Ríos-Escalante & Acevedo 2016a). Una situación similar se reportó para el lago Tagua-Tagua (Figs. 3 y 4), que si bien es de mucho menor tamaño que el lago General Carrera, este es originado por la desembocadura de un río de origen glaciar, existiendo un gradiente de turbidez y por ende de propiedades espectrales, encontrándose una relación inversa entre turbidez con riqueza y abundancia de especies (De los Ríos-Escalante & Acevedo 2016b).

Figura 1. Imagen LANDSAT ETM+ del lago General Carrera (Cf: De los Ríos-Escalante et al., 2013, pag. 508).

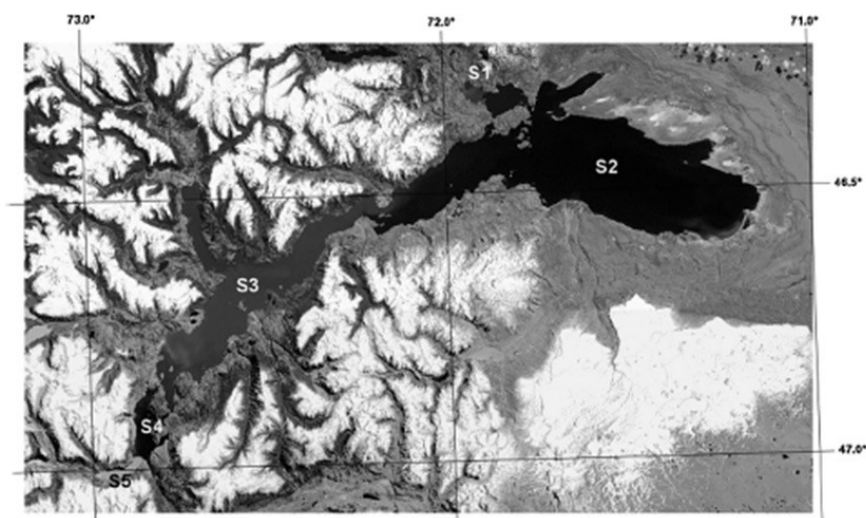


Figura 2. Gráfico entre reflectância de banda B2 de sensor ETM+ y abundancia del copépodo zoopláctónico *Boeckella michaelsoni* del lago General Carrera (Cf: De los Ríos-Escalante et al., 2013, pag. 510).

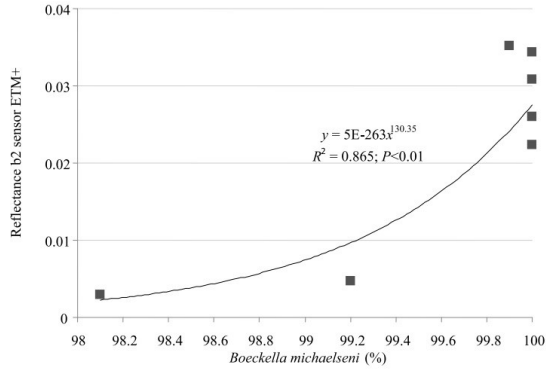


Figure 3. Mapa de Tagua Tagua lake (Cf: De los Ríos-Escalante & Acevedo, 2016b, pag. 454).

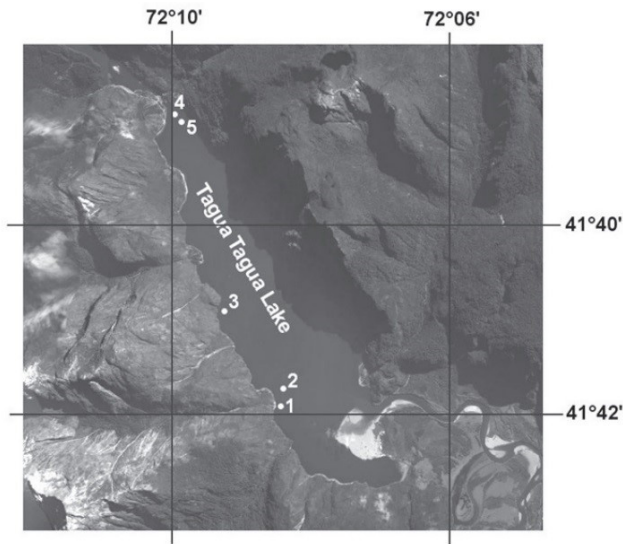
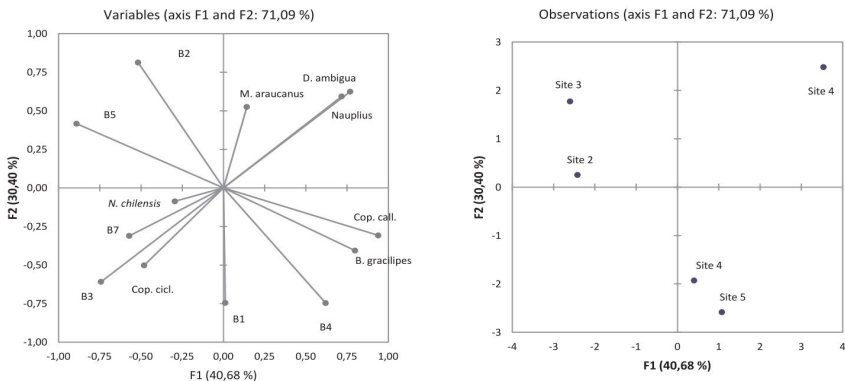


Figura 4. Análisis de componentes principais entre abundancia de especies zoopláctónicas y propiedades espectrales de sensor LANDSAT ETM+ para el lago Tagua Tagua (Cf: De los Ríos-Escalante & Acevedo, 2016b, pag. 455).



### 3 COMPARACIÓN DE LAGOS CON DIFERENTE ESTADO TRÓFICO: CABURGUA Y VILLARRICA (38°S)

Los lagos Caburgua y Villarrica están en el norte de la Patagonia chilena, ambos según la literatura se les considera oligotrófico y oligo-mesotrófico respectivamente, (Woelfl, 2007; Woelfl et al., 2010). En el caso del lago Caburgua este por su marcada oligotrofia presentó baja diversidad y abundancia de especies zooplanctónicas siendo predominantes los protozoos ciliados mixotróficos (Woelfl et al., 2010). Mientras que en el caso del lago Villarrica por su condición de oligo-mesotrofia presentó mayor riqueza y abundancia de especies (Woelfl, 2007). No obstante, estos estudios se basaron en un solo punto de muestreo. Este tipo de lagos ha sido reportado también para lagos de la Patagonia de Chile (Woelfl, 2007; Kamjunke et al., 2009, 2010) y Argentina (Bastidas-Navarro et al., 2009, 2018; Modenutti et al., 2010a,b; Modenutti & Balseiro, 2018, 2020).

Los estudios recientes para ambos lagos (De los Ríos-Escalante et al., 2020, 2022a,b), se basaron en estudios de cuatro sitios en ambos lagos con el fin de encontrar diferencias potenciales entre los sitios por lago y entre lagos basados en propiedades del sensor Landsat 8 OLI. Los estudios mostraron que el lago Villarrica presentó alta reflectancia asociada a alta concentración de clorofila, alta riqueza y abundancia de especies planctónicas y ausencia de ciliados mixotróficos (Figs 5 y 6; De los Ríos-Escalante et al., 2020, 2022a). Una situación diferente sucedió en el lago Caburgua, en que la reflectancia fue baja, y asociada a baja riqueza y abundancia de especies pero alta abundancia de ciliados mixotróficos (Figs 5 y 6; De los Ríos-Escalante et al., 2020, 2022a,b).

Figura 5. Mapa de lagos Caburgua y Villarrica (Cf. De los Ríos-Escalante et al., 2022b, pag. 5).

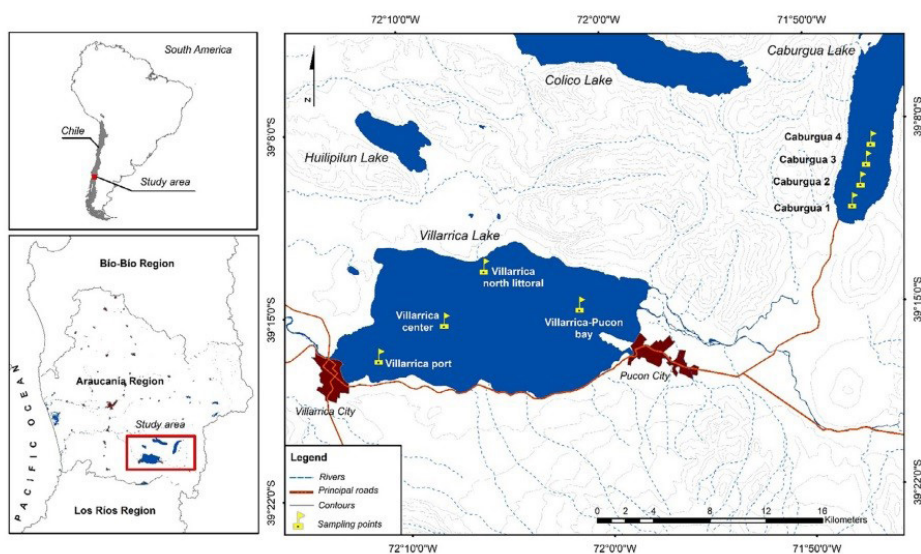
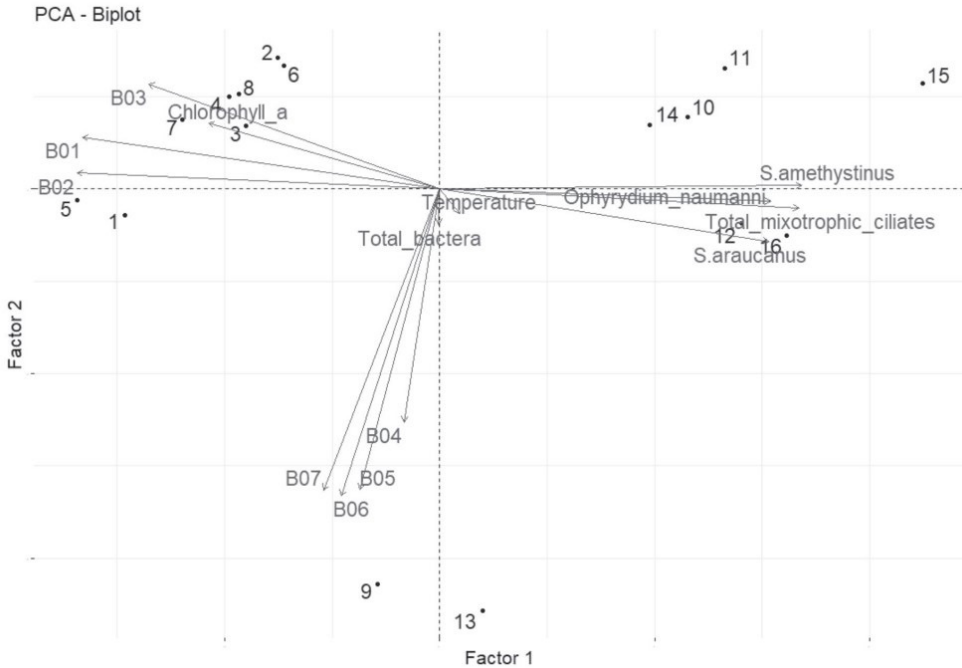




Figura 6. Análisis de componentes principales entre propiedades espectrales, clorofila, bacterias y protozoos ciliados mixotróficos para sitios en lagos Villarrica (sitios 1 al 8) y Caburgua (sitios 9 al 16) (Cf: De los Ríos-Escalante et al., 2022b, pag. 7).



#### 4 FUTURAS PROYECCIONES EN LAGOS CHILENOS

El uso de técnicas de percepción remota en otros lagos chilenos, ha sido aplicada para el lago Vichuquén en la zona central de Chile (34°S) en que se logró encontrar una amplia variabilidad espacial en la concentración de clorofila la que estuvo fuertemente correlacionada con propiedades espectrales de Landsat 8 OLI (Briceño et al., 2018).

De igual modo, Rodríguez-López et al., (2020, 2021a,b), describieron variaciones en la turbidez y la concentración de clorofila en lagos del norte de la Patagonia chilena (39°S), mediante el procesamiento de imágenes Landsat 8 OLI, encontrando marcadas asociaciones en propiedades espectrales específicamente sitios con baja reflectancia presentaron alta transparencia de la columna de agua y por ende baja concentración de clorofila. Sobre esta base, considerando el gran volumen de datos que se puede manejar, se pueden manejar técnicas de ciencias de datos y aprendizaje de máquinas que podría optimizar la interpretación de la información (Vander Plas, 2017).

Sobre esta base si se aplican metodologías de Rodríguez-Lopez et al., (2020, 2021a,b), más datos de parámetros ambientales en terreno que si se integran siguiendo las metodologías descritas por De los Ríos-Escalante et al., (2020, 2022a,b), podrían

servir para tener un enfoque integrado entre propiedades espectrales con parámetros bióticos y abióticos del lago los que podrían servir a futuro para planes de monitoreo y manejo de potenciales fuentes de contaminación lacustre.

## 5 AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue financiado por el proyectos VIPUCT 2017RE-PR-06 y MECESUP UCT 0804. El autor principal expresa su gratitud a M.I. y S.M.A. por sus valiosos aportes y sugerencias para la preparación del manuscrito.

## REFERENCIAS

Bastidas-Navarro, M., Modenutti, B., Callieri, C., Bertoni, R., y Balseiro E., (2009). Balance between primary and bacterial production in North Patagonian shallow lakes. *Aquatic Ecology* 43: 867-878. <https://doi.org/10.1007/s10452-008-9220-9>

Bastidas-Navarro M., Martyniuk N., Balseiro E., y Modenutti B., (2018). Effect of glacial lake outburst floods on the light climate in an Andean Patagonian lake: implications for planktonic phototrophs. *Hydrobiologia*, 816: 39-48. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-3080-4>

Briceño, I., Pérez, W., San Miguel, D., y Ramos, S., (2018). Determinación de calidad de agua en el lago Vichuquén con imágenes de satélite Landsat 8, sensor OLI año 2016, Chile. *Revista de Teledetección*, 52: 67-68.

Chander, S., Gujrati, A., Vijaya K.A., Sahay, A., y Singh, R. (2020). Remote sensing of inland water quality: a hyperspectral perspective. DOI: 10.1016/B978-0-08-102894-0.00017-6.

Dar, S.A., Bhat, S.U., Aneaus, S., y Rashid, I., (2020). A geospatial approach for limnological characterization of Nigeen Lake, Kashmir Himalaya. *Environmental Monitoring Assessment*, 192: 121. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8091-y>

De los Ríos-Escalante, P., Quinan E., y Acevedo, P. (2013). Crustacean zooplankton communities in Lake General Carrera (46°S) and their possible association with optical properties. *Crustaceana* 86: 506-513. <https://doi.org/10.1163/15685403-00003182>

De los Ríos-Escalante, P., y Acevedo, P. (2016a). First observations on zooplankton and optical properties in a glacial North Patagonian lake (Tagua Tagua lake, 41° S Chile). *Polish Journal of Environmental Studies*, 25: 453-457. DOI: <https://doi.org/10.15244/pjoes/59369>

De los Ríos-Escalante, P., y Acevedo, P. (2016b). First observations of *Boeckella michaelsoni* Mrázek 1901 and optical properties of a Central Patagonian lake. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25: 1781-1785. DOI: <https://doi.org/10.15244/pjoes/61700>

De los Ríos-Escalante, P., Castro, M., Acevedo P., y Esse, C. (2017a). Spectral properties in lakes of a Chilean National Park. *Polish Journal of Environmental Studies*, 26: 425-429. DOI: <https://doi.org/10.15244/pjoes/64206>

De los Ríos-Escalante, P., Castro, M., Acevedo P., y Esse, C. (2017b). Spectral properties in lakes surrounding a Chilean volcano. *Polish Journal of Environmental Studies*, 26: 935-939. DOI: <https://doi.org/10.15244/pjoes/63783>

De los Ríos-Escalante, P., Castro, M., Acevedo P., y Esse, C. (2017c). Satellite spectral property observations in Chilean lakes. *Polish Journal of Environmental Studies*, 26: 1413-1418. DOI: <https://doi.org/10.15244/pjoes/64283>

De los Ríos-Escalante, P., Contreras, A., Lara, G., Latsague, M., y Esse, C., (2020). First reports of associations between spectral properties, chlorophyll, bacterial and zooplankton in two Chilean North Patagonian lakes (Villarrica and Caburgua, 38° S, Araucania region, Chile). *Journal of King Saud University Sciences*, 32: 3167-3173.

De los Ríos-Escalante, P., Contreras, A., Lara, G., Latsague, M., y Esse, C., (2022b) Associations between optical properties and mixotrophic ciliates abundances using remote sensing techniques in two North Patagonian Lakes (Villarrica and Caburgua, 38°S, Araucania, Chile). *Polish Journal of Environmental Studies*, 31: 1-11. DOI: <https://doi.org/10.15244/pjoes/139099>

De los Ríos-Escalante, P., Contreras, A., Lara, G., Latsague, M., y Esse, C. (2022). Associations between spectral properties, bacteriological characteristics, chlorophyll and zooplankton communities in two north Patagonian lakes, *Animal Biology*. doi: <https://doi.org/10.1163/15707563-bja10097>

Kamjunke, N., Vogt, B., y Woelfl, S., (2009). Trophic interactions of the pelagic ciliate *Stentor* spp., in North Patagonian lakes. *Limnologia* 39: 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2008.08.001>

Kamjunke, N., Kramps, M., Chavez, S., y Woelfl, S., (2010). Consumption of large *Chlorella*-bearing ciliates (*Stentor*) by *Mesocyclops araucanus* in North Patagonian lakes. *Journal of Plankton Research*, 34: 922-927. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbs051>

Kwon, Y.S., Kwon, Y-H., Duan, H., Cho, K.H., y Park, Y., (2020). Drone-based hyperspectral remote sensing of cyanobacteria using vertical cumulative pigment concentration in a deep reservoir. *Remote Sensing of Environment*, 236: 111517. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2019.111517>

Lee, Z., Shang, S., Wang, Y., Wei, J., y Isizaka, J., (2020). Nature of optical products inverted semianalytically from remote sensing reflectance of stratified waters. *Limnol. Ocean.* 65: 387-400. <https://doi.org/10.1002/lno.11307>

Modenutti, B.E., Albariño, R., Bastidas Navarro, M., Diaz Villanueva, V., Souza, M.S., Trochine, C., Laspoumaderes, C., Cuassolo, F., Mariluán, G., Buria, L., y Balseiro, E., (2010a). Structure and dynamics of food webs in Andean North Patagonian freshwater systems: organic matter, light and nutrient relationships. *Ecología Austral*, 20: 95-114.

Modenutti, B., Balseiro, E., Corno, G., Callieri, C., Bertoni, R., y Caravati, E. (2010b). Ultraviolet radiation induces filamentation in bacterial assemblages from North Andean Patagonian lakes. *Photochemistry and Photobiology*, 86: 871-881. doi: 10.1111/j.1751-1097.2010.00758.x

Modenutti, B.E., y Balseiro, E.G., (2018). Preface: Andean Patagonian lakes as sensors of global change. *Hydrobiologia* 816: 1-2. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3622-z>

Modenutti, B., y Balseiro, E., (2020). Mixotrophic ciliates in North Patagonian Andean lakes: stoichiometric balances in nutrient limited environments. *Limnetica* 39: 263-274. DOI:10.23818/limn.39.17

Rodríguez-López, L., González, L., Durán-Llacer, L., Cardenas, R., y Urrutia, R., (2021). Spatio-temporal analysis of chlorophyll in six Araucanian lakes of Central-South Chile from Landsat imagery. *Ecological Informatics*, 65: 101431. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2021.101431>

Rodríguez-López, L., Durán-Llacer, L., Gonzalez, L., Cardenas, R., & Urrutia, R., (2021). Retrieving Water Turbidity in Araucanian Lakes (South-Central Chile) Based on Multispectral Landsat Imagery. *Remote Sensing*, 13: <https://doi.org/10.3390/rs13163133>

Rodríguez-López, L., Durán-Llacer, L., Gonzalez, Li., Abarca-del-Rio, R., Cardenas, R., Parra, O., Martinez, R., y Urrutia, R., (2020). Spectral analysis using LANDSAT images to monitor the chlorophyll-a concentration in Lake Laja in Chile. *Ecological Informatics*, 60. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2020.101183>

Shen, M., Duan, H., Cao, Z., Xue, K., Qi, T., Ma, J., Liu, D., Song, K., Huang, C., y Song, X., (2020). Sentinel-3 OLCI observations of water clarity in large lakes in eastern China: implications for SDG 6.3.2 evaluation. *Remote Sensing of Environment*, 247: 111950. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2020.111950>

Soria-Perpinya, X., Vicente, E., Urrego, P., Pereira-Sandoval, M., Ruiz-Verdú, A., Delegido, J., Soria, J.M., y Moreno, J., (2020). Remote sensing of cyanobacterial blooms in an hypertrophic lagoon (Albufera of Valencia, Eastern Iberia Peninsula) using multitemporal sentinel 2 images. *Science of The Total Environment*, 698, 134305. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134305>

VanderPlas, J., (2017). *Python Data Science Handbook*. O'Reilly Media, Inc., 1005 Gravenstein Highway North, Sebastopol, CA 95472. 529 p.

Woelfl, S., (2007). The distribution of large mixotrophic ciliates (*Stentor*) in deep North Patagonian lakes (Chile): First results. *Limnologica* 37: 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2006.08.004>

Woelfl, S., Garcia, P., y Duarte, C., (2010). Chlorella-bearing ciliates (*Stentor*, *Ophrydium*) dominate in an oligotrophic, Deep, North Patagonian lake (Lake Caburgua, Chile). *Limnologica*, 40: 134-139. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2009.11.008>

# CAPÍTULO 16

## IDENTIFICACIÓN DE FRACCIONES TÓXICAS EN EFLUENTES URBANOS LÍQUIDOS<sup>1</sup>

Data de submissão: 02/12/2022

Data de aceite: 21/12/2022

### Ingrid Violeta Poggio Herrero

Grupo Interdisciplinario de Estudios Ambientales (GIEsA)- FCEyN UNLPam CONICET (becaria posdoctoral) (6300) Santa Rosa, La Pampa, Argentina <https://orcid.org/0000-0003-2329-8762>

### Guido Mastrantonio Garrido

Área de toxicología Departamento de Ciencias Biológicas FCE- UNLP PlaPiMu-LaSelSiC FCE -UNLP y CIC-PBA (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina <https://orcid.org/0000-0002-9557-2137>

### Andrés Atilio Porta

Centro de Investigaciones del Medioambiente (CIM) FCE -UNLP. CIC-PBA (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina

**RESUMEN:** Los efluentes líquidos urbanos están compuestos por aguas de descarte

<sup>1</sup> El presente estudio recibió financiamiento de CONICET y FCEyN-UNLPam y es parte de una tesis doctoral. Se agradece a la EEA INTA Anguil por prestar sus instalaciones. Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

y, como consecuencia de la naturaleza y variedad de sus fuentes, constituyen una compleja combinación de sustancias químicas que interactúan entre sí. Dadas las particularidades de los efluentes líquidos es necesario no solo conocer sus características fisicoquímicas, sino también los efectos tóxicos que pueden generar en la biota, ya que el aproximamiento clásico, mediante análisis fisicoquímicos no considera la interacción entre componentes. Su toxicidad se puede determinar mediante bioensayos y, aplicando un fraccionamiento controlado de las muestras y bioensayos sucesivos, es posible identificar que fracciones del efluente aportan a la toxicidad global. Así, el objetivo general fue caracterizar toxicológicamente efluentes urbanos líquidos e identificar las fracciones que aportan a la toxicidad global. Se aplicó una batería de bioensayos integrada por *D. magna*, *H. plagiodesmica* y semillas de *T. aestivum*, junto con un protocolo de fraccionamiento para identificación de las fracciones tóxicas. *T. aestivum* no resultó un indicador sensible para los efluentes líquidos estudiados, sin embargo, los niveles de toxicidad indicados para *D. magna* y *H. plagiodesmica* indican que los efluentes mantienen un contenido tóxico considerable. El fraccionamiento de las muestras permitió identificar a los sólidos suspendidos (>1µm) y a los compuestos orgánicos no polares y/o compuestos organometálicos como las fracciones que más aportan a la toxicidad global. La aplicación del

protocolo de fraccionamiento resultó efectiva y generó información valiosa de relevancia para futuros estudios que permitan mejorar la eficiencia del sistema de tratamiento. A su vez, se manifiesta su utilidad como herramienta de evaluación para el manejo sustentable y protección de los ecosistemas acuáticos.

**PALABRAS CLAVES:** Efluentes Urbanos. Aguas residuales. Toxicidad. Bioensayos.

## IDENTIFICATION OF TOXIC FRACTIONS IN URBAN WASTEWATER

**ABSTRACT:** The urban wastewater is constituted by discarded water and, as a consequence of the nature and variety of their sources, they constitute a complex combination of chemical substances that interact with each other. Given the particularities of wastewater, it is necessary not only to know their physicochemical characteristics, but also the toxic effects that they can generate in the biota, since the classical approach, through physicochemical analysis, does not consider the interaction between components. Toxicity can be determined by bioassays and, applying a controlled fractionation of the samples and successive bioassays, it is possible to identify which fractions of the effluent contribute to the overall toxicity. Thus, the general objective was to characterize urban wastewater toxicologically and identify the fractions that contribute to global toxicity. A battery of bioassays consisting of *D. magna*, *H. plagiodesmica* and *T. aestivum* seeds was applied, together with a fractionation protocol for the identification of toxic fractions. *T. aestivum* was not a sensitive indicator for the effluents studied, however, the levels of toxicity indicated for *D. magna* and *H. plagiodesmica* indicate that the effluents maintain a considerable toxic content. Fractionation of the samples made it possible to identify suspended solids (>1µm) and nonpolar organic compounds and/or organo-metallic compounds as the fractions that most contribute to global toxicity. The application of the fractionation protocol was effective and generated valuable information of relevance for future studies that allow improving the efficiency of the treatment system. In turn, its usefulness as an evaluation tool for the sustainable management and protection of aquatic ecosystems is manifested.

**KEYWORDS:** Urban wastewater. Effluent. Toxicity. Bioassay.

## 1 INTRODUCCIÓN

Los Efluentes líquidos urbanos (ELUs) están compuestos aguas de descarte de domicilios, comercios, hospitales, desagües pluviales y, ocasionalmente, actividades de servicio e industrias. Así, constituyen una compleja combinación de sustancias químicas. Estudios previos han detectado entre sus componentes detergentes, fármacos, metales, compuestos orgánicos persistentes, productos del cuidado personal, entre otros (Aguayo et al., 2004; Clara et al., 2005, Garcia-Reyero et al., 2011; Manusadžianas et al., 2003; Üstün, 2009; Wong et al., 2001). La composición es dinámica, cambia en forma constante asociada a factores antrópicos y ambientales, y la biodisponibilidad de las sustancias presentes es variables por degradación o por interacción química.

El manejo de las plantas de tratamiento de ELUs tradicional considera la determinación y seguimiento de parámetros físico-químicos clásicos. Este enfoque no considera que la diversidad de sustancias que los componen están sujetas a interacciones que alteran las propiedades de la mezcla. El estudio de la toxicidad, mediante bioensayos, permite evaluar los ELUs de manera integral (Aguayo et al., 2004; Dalzell et al., 2002; Farre et al., 2002; Katsoyiannis and Samara, 2007; Oberholster et al., 2008; Smital et al., 2011).

En algunos países, entre ellos EE.UU., Brasil, Canadá, varios países de la Unión Europea, Australia y Nueva Zelanda, se han incluido en la normativa a la evaluación de la toxicidad de ELUs como herramienta de evaluación para el manejo y protección de los ecosistemas acuáticos (Planes and Fuchs, 2015). En Argentina aún no se han incluido criterios biológicos en la normativa ambiental. La normativa se basa en niveles máximos permisibles para algunos contaminantes relevantes por sus efectos biológicos, sin considerar la interacción de los parámetros.

Es posible realizar evaluaciones de la toxicidad orientadas a identificar las fracciones problema (U.S. EPA, 1993, 1991). Esto se lleva a cabo mediante la evaluación de la toxicidad en forma sucesiva sobre la muestra original y muestras manipuladas y el cambio en la toxicidad, que se origina por la manipulación, da indicios de cuáles son las fracciones que contribuyen a la toxicidad. Esta herramienta metodológica es útil para identificar fuentes de toxicidad como para control/monitoreo del funcionamiento (Botts et al., 1988, 1989). Este método se aplica teniendo en cuenta que la toxicidad es una respuesta genérica y no hay mecanismo para determinar si la toxicidad observada es causada a un componente simple o a una combinación de componentes que aparecen en forma alternativa, pero sí es posible identificar fracciones que aportan a la toxicidad global.

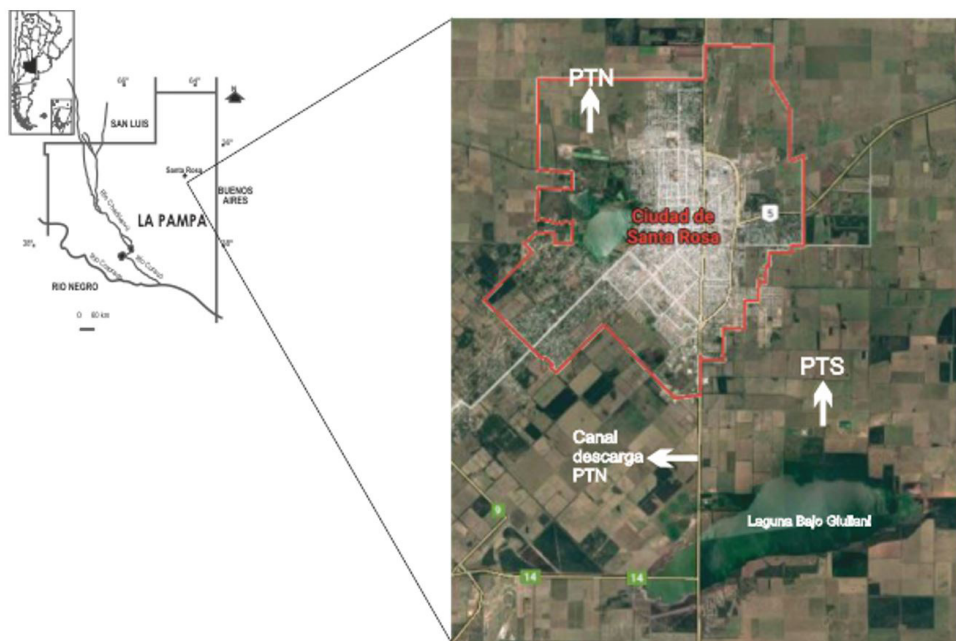
Los objetivos de este estudio fueron caracterizar toxicológicamente los ELUs de un sector de Santa Rosa, La Pampa, Argentina e identificar que fracciones aportan a la toxicidad global del ELU.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 ÁREA DE ESTUDIO

La ciudad de Santa Rosa, La Pampa (Argentina) tiene 102860 habitantes y un sistema de tratamiento de ELUs que alcanza al 80% de las viviendas. El sistema de tratamiento consta de dos plantas de tratamiento, PN y PS. La PN posee 6 piletas de depuración: 2 anaeróbicas, y 4 aeróbicas (Figura 1). Los ELUs saneados son bombeados por un canal a cielo abierto que los conduce hacia la Laguna Bajo Giuliani, sitio de disposición final.

Figura 1- Ubicación del área de estudio: Se indican las plantas de tratamiento Norte (PTN) y Sur (PTS), el Canal de descarga de ELUs y el sitio de disposición final, Laguna Bajo Giuliani.



## 2.2 TOMA DE MUESTRAS, CONSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN

Se colectaron 24 muestras simples de ELUs, durante el periodo de diciembre 2013 a noviembre 2014. El sitio de muestreo correspondió al canal de descarga que transporta los ELUs tratados desde la PN hacia la laguna Bajo de Giuliani (Figura 1).

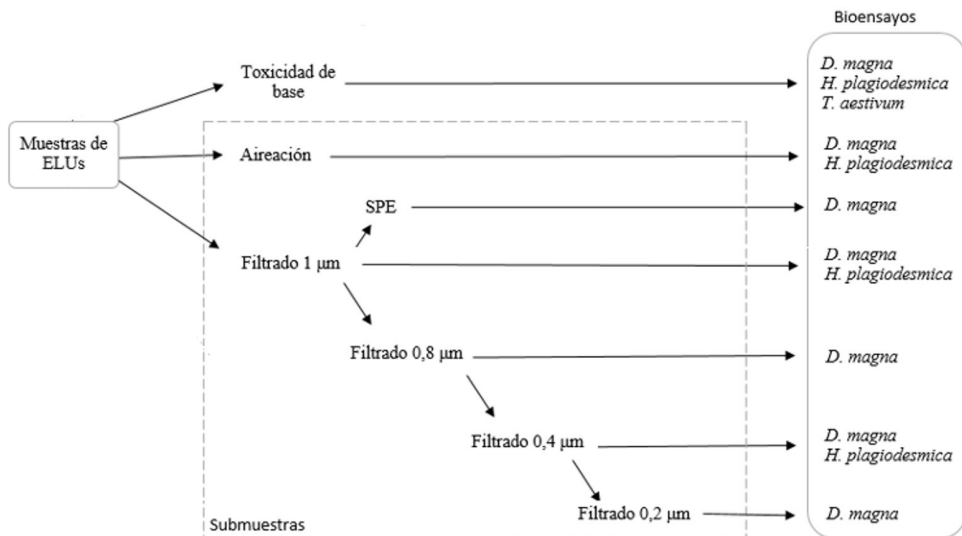
Las muestras fueron fraccionadas, una parte de la muestra fue conservada sin alteraciones, mientras que a las demás fracciones se la aplicó un tratamiento: i) aireación durante 2h a temperatura ambiente, ii) filtrado 1  $\mu\text{m}$ , iii) filtrado 0,8  $\mu\text{m}$ , iv) filtrado 0,42  $\mu\text{m}$ , v) filtrado 0,22  $\mu\text{m}$ , vi) SPE - C<sub>18</sub> (Figura 2). Todos los tratamientos se aplicaron acorde a los métodos para las evaluaciones de identificación de toxicidad acuática (U.S. EPA, 1991). Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C.

## 2.3 BIOENSAYOS

Se realizaron bioensayos con *D. magna*, *H. plagiodesmica* y *T. aestivum*. Se efectuaron 12 bioensayos por muestra en 2 etapas. En la primera etapa se determinó de toxicidad de base (CE50cr) y en la segunda etapa se determinó la toxicidad remanente en las submuestras manipuladas (Figura 2).



Figura 2- Secuencia de trabajo: Los ensayos de toxicidad iniciaron con la determinación de la toxicidad de base. Luego se realizaron los tratamientos de submuestras para luego establecer la toxicidad remanente post tratamiento. Los tratamientos aplicados fueron: i) aireación durante 2h, ii) filtrado 1 µm, iii) filtrado, 0,8 µm, iv) filtrado 0,42 µm, v) filtrado 0,22 µm, vi) SPE-C18.



***D. magna*:** Los ensayos de base se realizaron por triplicado, con 10 neonatos (<24h) por concentración, en cambio los de determinación de toxicidad remanente se realizaron por duplicado, con una réplica del ensayo de base como control positivo de la toxicidad. Se evaluó inmovilización a las 48 h y se estimó CE50 a las 48 h. mediante el método PROBIT (Castillo Morales, 2004).

***H. plagiodesmica*:** Los ensayos se realizaron acorde al protocolo para ensayos de toxicidad aguda para *H. attenuata* de Castillo Morales (2004), por triplicado y con una réplica del ensayo de base como control positivo de la toxicidad. Se evaluó presencia de cambio letales y subletales y se estimó la CL50 y CE50 a las 96 h. (Castillo Morales, 2004)

***T. aestivum*:** Los ensayos se realizaron mediante la adaptación del ensayo de toxicidad aguda de Castillo Morales (2004) para semillas de *L. sativa*. Los ensayos se realizaron por triplicado, en placas de Petri, con 10 semillas por placa. Como medio de dilución se utilizó agua dura reconstituida. Las placas se mantuvieron protegidas de la luz por un periodo de 120 h. Se evaluó la elongación de hipocotíleo y radícula, y se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento respecto del blanco.

## 2.4 ABATIMIENTO DE TOXICIDAD

Se calculó el cambio de toxicidad generado por cada manipulación respecto de la toxicidad original (Botts et al., 1988) por medio de la fórmula:

$$\text{Abatimiento Tratamiento } i = \frac{UT_{cr} - UT_{trat\ i}}{UT_{cr}} \times 100$$

Donde:

$UT_{cr}$  son las unidades tóxicas estimadas para la muestra original (100/CE<sub>50</sub>)

$UT_{trat\ i}$  son las unidades tóxicas estimadas para la muestra que recibió el tratamiento  $i$  (100/CE<sub>50 trat i</sub>)

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 TOXICIDAD

En las figuras 3; 4 y 5 se representan las CL50 y CE50 obtenidas por exposición de *D. magna*, *H. plagiodesmica* (letal y subletal) a ELUs. Se indica también la toxicidad remanente para las submuestras aireadas y filtradas.

Para el ensayo letal con *D. magna* la CL50 media de los ELUs fue 51,6%, y el rango de toxicidad fue 27-91,5%. Los ensayos letales con *H. plagiodesmica* arrojaron una CL50 media de 38%, los resultados variaron dentro de 17,7-62,2%. Durante el ensayo subletal con *H. plagiodesmica* la toxicidad media fue 14%, con una toxicidad máxima de 7,4% y la mínima en 29,6% de dilución del efluente.

Para *T. aestivum* las muestras presentaron niveles de inhibición bajos y solo en el 21% de las muestras se pudo estimar la CI<sub>50</sub>, para estos casos la CI50 fue siempre superior al 70%.

Para *D. magna* los resultados son similares a otros obtenidos en ELUs de similares características (Aguayo et al., 2004; Hernando et al., 2006; Mendonça et al., 2013). En particular, Di Marzio et al (2005) en estudios sobre vertidos de ELUs al río Lujan reporta CE50 entre 17 y 100%. La baja respuesta medida en *T. aestivum* es similar a lo observado Liwarska-Bizukojc and Urbaniak (2007) quienes reportan bajos niveles de inhibición ante la exposición a aguas residuales.

Las respuestas para los ensayos con *D. magna* e *H. plagiodesmica*, letal y subletal fueron significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ). En tanto el test subletal con *H. plagiodesmica* fue el indicador más sensible. Otros autores ya han reportado mayor sensibilidad del genero *Hydra* frente a *D. magna* en el estudio de efluentes líquidos (Bohórquez-Echeverry et al., 2012; Castillo Morales et al., 2000; Oberholster et al., 2008). No obstante, *D. magna* es un muy buen indicador de toxicidad, que responde a una gran variedad de productos químicos (Aguayo et al., 2004; Hernando et al., 2005; Martins et al., 2007; Mendonça et al., 2013; Tyagi et al., 2007).

Figura 3 - Se representa la CL50 (%) para *D. magna* de los residuos urbanos líquidos y los remanentes de toxicidad de las submuestras manipuladas (aireación, filtrado con 1µm y filtrado con 0,8 µm).

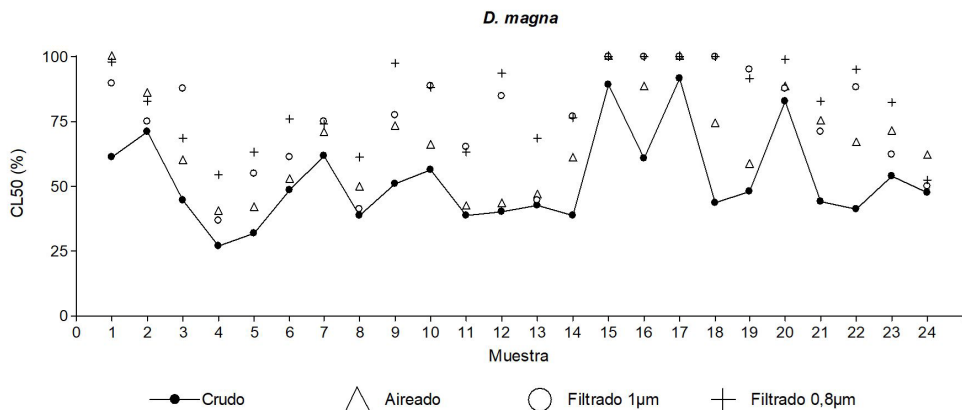


Figura 4 - Se representa la CL50 (%) para *H. plagiodesmica* de los residuos urbanos líquidos y los remanentes de toxicidad de las submuestras manipuladas (aireación, filtrado con 1µm y filtrado con 0,4 µm).

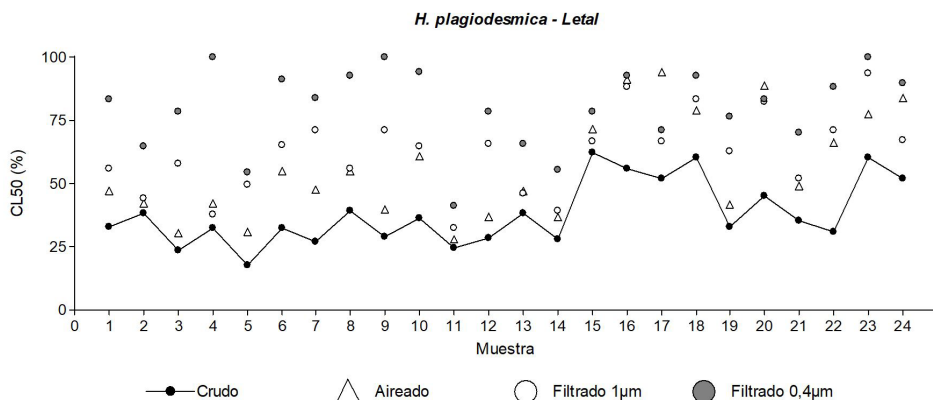
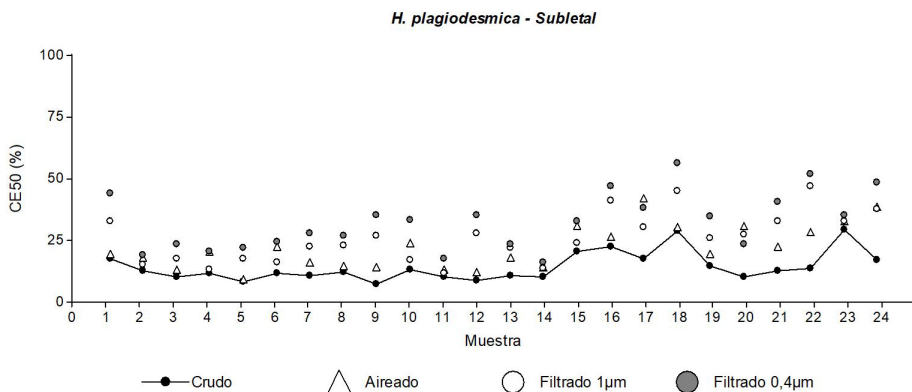


Figura 5 - Se representa la CE50 (%) para *H. plagiodesmica* de los residuos urbanos líquidos y los remanentes de toxicidad de las submuestras manipuladas (aireación, filtrado con 1µm y filtrado con 0,4 µm).



Los niveles de toxicidad medidos indican que los efluentes estudiados mantienen un contenido de componentes tóxicos considerable al momento de su disposición final.

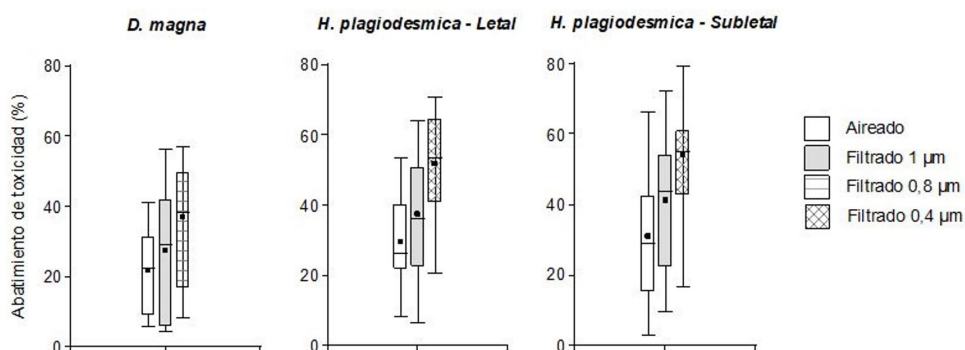
### 3.2 ABATIMIENTO DE LA TOXICIDAD

Todas las manipulaciones aplicadas generaron cambios en la toxicidad de las submuestras ( $p < 0,0001$ ). La figura 6 representa los abatimientos de toxicidad generados por las manipulaciones para los ensayos con *D. magna* e *H. plagiodesmica*.

La CE50 para *D. magna* luego de airear, filtrar con  $1\mu\text{m}$ . y con  $0,8\mu\text{m}$ . fue  $67,3 \pm 19,1\%$ ;  $74,6 \pm 19,6\%$  y  $82,3 \pm 19,8\%$  respectivamente. Estos cambios implicaron abatimientos de la toxicidad medios del 22% para la aireación, 27% para el filtrado con  $1\mu\text{m}$  y 35% para el filtrado con  $0,8\mu\text{m}$ . Las manipulaciones eliminaron la toxicidad en el 12% de las submuestras luego de airear, y en el 17% y 46% respectivamente luego de los filtrados con  $1\mu\text{m}$  y  $0,8\mu\text{m}$ .

Para el ensayo letal con *H. plagiodesmica*, las CE50 luego de airear fue del  $55,4 \pm 12,7\%$ , mientras que en las submuestras filtradas con  $1\mu\text{m}$  y  $0,4\mu\text{m}$  fue de  $62,1 \pm 15,9\%$  y  $80,2 \pm 15,6\%$ . De ésta manera se generaron abatimientos medios del 29% de la toxicidad mediante aireación, 37% con el filtrado con  $1\mu\text{m}$  y 52% para el filtrado con  $0,4\mu\text{m}$ . Sin embargo, solo se eliminó la toxicidad en el 12,5% de las submuestras filtradas con la malla de  $0,4\mu\text{m}$ . Al analizar los resultados obtenidos en los ensayos subletales se observan abatimientos medios similares al del ensayo letal.

Figura 6 - Abatimientos de toxicidad (%) estimados para cada punto final y manipulación aplicada.

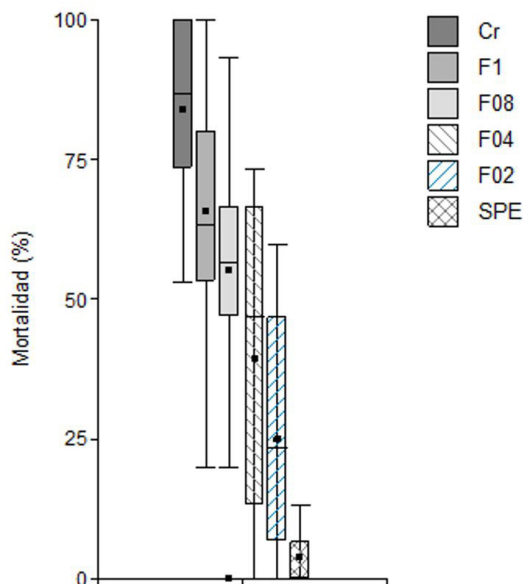


Respecto al abatimiento generado por filtrado con  $1\mu\text{m}$  se observaron diferencias significativas entre los puntos estudiados ( $p = 0,004$ ).

Para *D. magna*, se evaluó también la toxicidad luego de aplicar filtros con tamaño de poro de  $0,8$ ;  $0,4$ ,  $0,2\mu\text{m}$  y SPE. La mayoría de esos tratamientos generó submuestras

no tóxicas ( $CE_{50} > 100\%$ ). Por esta razón no puede ser estimado el abatimiento de la toxicidad y los resultados obtenidos se analizaron en función de la mortalidad media causada en las submuestras puras ( $100\%$ ). Los resultados se presentan en la figura 7.

Figura 7 - Mortalidad media (%) para las muestras originales y las submuestras manipuladas mediante aireación, filtrados con mallas de  $1\ \mu\text{m}$  (F1),  $0,8\ \mu\text{m}$  (F08),  $0,4\ \mu\text{m}$  (F04) y  $0,2\ \mu\text{m}$  (F02) de tamaño de poro y extracción en fase sólida (SPE).



En los filtrados con  $1$ ;  $0,8$  y  $0,4\ \mu\text{m}$  el  $87\%$ ,  $59\%$  y  $46\%$  de estas sub-muestras, respectivamente, mantuvieron niveles de toxicidad. En las submuestras filtradas con  $0,2\ \mu\text{m}$  y tratadas con SPE el  $87$  y  $100\%$ , respectivamente, resultaron no tóxicas. Todos los tratamientos reducen la toxicidad ( $p < 0,0001$ ), sin embargo, el filtrado con  $0,2\ \mu\text{m}$  y la SPE la eliminan.

La heterogeneidad de los abatimientos ante una misma manipulación indica que la composición de la carga tóxica es variable entre muestras. Nuestros resultados muestran que los sólidos suspendidos aportan significativamente a la toxicidad. Sin embargo, no es posible asociar la carga tóxica a una única fracción en particular. La no toxicidad observada al combinar el filtrado con poro  $1\ \mu\text{m}$  y SPE evidencia la importancia de los sólidos suspendidos de mayor porte y de los compuestos orgánicos no polares y/o complejos órgano-metálicos retenidos por SPE, como aquellos componentes que aportan a la toxicidad global.

La marcada diferencia de toxicidad entre las fracciones aireadas y la fracción post-SPE puede indicar presencia de compuestos orgánicos persistentes o bien

que la aireación también se generó productos de degradación tóxicos o aumentó la biodisponibilidad de los metales. Si bien el resultado final indica que durante la aireación se redujo significativamente la toxicidad global del efluente, esto no obsta que otros cambios se hayan dado y que, en conjunto, indiquen una disminución de la toxicidad.

Otra posible causa es que los compuestos orgánicos no degradados durante la aireación, pero si retenidos en la SPE muestren efectos sinérgicos en combinación con los demás componentes. En estudios previos la sola incorporación de un tóxico a concentración baja a generado cambios en la toxicidad de efluentes clasificados como no tóxico, aun cuando el componente fue agregado en concentraciones bajas ( $\mu\text{g/L}$ ) para las cuales no se esperaban efectos tóxicos individuales (Hernando et al., 2005).

Estudios similares reportan resultados que demuestra la utilidad práctica del método empleado para señalar las fracciones que aportan a la toxicidad y generar información acerca de posibles tratamientos que permitan reducir la toxicidad de los ELUs durante su tratamiento. En EE.UU. Botts et al. (1988) reportaron aguas residuales en las cuales la eliminación de los sólidos suspendidos ( $>1\mu\text{m}$ ) removió la mayor parte de la toxicidad aguda (30-70%). El abatimiento que los autores reportan es mayor al que observamos en nuestros resultados a pesar de que el contenido de SST era ampliamente menor. A su vez la aireación generó cambios, aunque en menor medida. Los resultados de este trabajo coinciden con los nuestros en indicar a la fracción orgánica no polar, principalmente suspendida, como la responsable de la mayor carga tóxica. En estudios desarrollados en Finlandia, la toxicidad de muestras de aguas residuales disminuyó con filtrado (10-40%) y con aireación (20-50%), mientras que la SPE generó los mayores cambios ( $>80\%$ ), estos resultados son ampliamente coincidentes con los obtenidos en nuestro trabajo (Pessala et al., 2004). Otros estudios realizados en ELUs de EE.UU. presentaron también reducción de la toxicidad en submuestras aireadas, sin embargo no se observaron grandes cambios al filtrar con  $1\mu\text{m}$  (DiGiano et al., 1992). Otros estudios presentan aguas residuales que no indican cambios de toxicidad por filtrado ni aireación para *D. magna*, pero si observaron cambios, principalmente post-SPE, con otras especies (Hutchings et al., 2004).

## 4 CONCLUSIONES

Dado que la variación de la toxicidad responde de diferentes maneras para las especies empleadas se evidencia que los responden a diferentes tóxicos. La principal diferencia en la respuesta tóxica se da para el ensayo con *T. aestivum*, para este ensayo todas las muestras resultaron no tóxicas, mientras que si manifestaron efectos tóxicos

para los demás ensayos. En términos generales los resultados identifican al test subletal con *H. plagiodesmica* como el indicador más sensible a la toxicidad de base del efluente, en comparación con los ensayos letales. Sin embargo, los ensayos letales resultaron ser más sensibles a los cambios de toxicidad generados por los tratamientos y, de esta forma indicaron mayores cambios de toxicidad que el ensayo subletal. Esto puede deberse a la alta sensibilidad de los puntos subletales evaluados. La variabilidad de sensibilidad de los test es necesaria para lograr una mejor representación de la variabilidad real, presente en los ambientes acuáticos. Para futuros trabajos se debe evaluar reemplazar el ensayo *T. aestivum* con otra especie, más sensible, que sea útil como indicadora.

Los tratamientos aplicados a las submuestras generaron cambios en la toxicidad que no difieren significativamente para los dos puntos finales considerados en *H. plagiodesmica*, sin embargo, los abatimientos si difieren entre *H. plagiodesmica* y *D. magna* excepto para el caso de las submuestras aireadas. Esto se debe a que cada ensayo se muestra sensibles sustancias diferentes, y los cambios de toxicidad indican alteraciones de la toxicidad atribuibles a tóxicos distintos para cada ensayo.

La aplicación de un protocolo de fraccionamiento para la identificación de las fracciones tóxicas resultó efectiva y generó información valiosa, que sirve de referencia para futuros estudios que permitan mejorar la eficiencia del sistema de tratamiento.

Los niveles de remoción de la toxicidad generados durante los tratamientos fueron variables, lo cual es acorde a la naturaleza compleja de las muestras, sin embargo, la aplicación del método de fraccionamiento permitió definir en forma general las características de los componentes tóxicos que aportan en mayor parte a la toxicidad global. Cantidades importante de la toxicidad pudo ser removida durante la aireación y el filtrado con 1 $\mu$ m, en particular luego del filtrado con 0,2  $\mu$ m y la aplicación de SPE. Esto es evidencia de la participación de los SS y de compuestos orgánicos no polares como las fracciones más importantes que aportan a la toxicidad. Sin embargo, las diferencias en las remociones indican diferencias en la composición de la carga tóxica. La composición es altamente variable y sus efectos tóxicos varían en función de las interacciones entre componentes.

Se desconoce la toxicidad del afluente que ingresa a la Planta de tratamiento N (PT N), por lo cual no se tienen información cuantitativa acerca de la eficiencia del tratamiento. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos, se presume de una baja eficiencia y una importante falencia en el tratamiento y se asume que la aplicación de un tratamiento que reduzca la DQO y el contenido de sólidos suspendidos podría mejorar considerablemente las características toxicológicas de los ELUs estudiados.

Los ensayos con *D. magna* e *H. plagiodesmica* pueden ser aplicados en la rutina de controles de calidad de las aguas residuales. Su sensibilidad ante la extracción o degradación de componentes que aportan a la toxicidad los hace una herramienta útil para informar acerca de la eficiencia del tratamiento aplicado y como sistema de alerta ante tratamientos deficientes.

## BIBLIOGRAFÍA

Aguayo, S., Munoz, M., De La Torre, A., Roset, A.J., De La Peña, E., Carballo, M., Muñoz, M.J., De La Torre, A., Roset, J., De La Peña, E., Carballo, M., 2004. Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. *Sci. Total Environ.* 328, 69–81. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.02.013

Bohórquez-Echeverry, P., Duarte-Castañeda, M., León-López, N., Caicedo-Carrascal, F., Vásquez-Vásquez, M., Campos-Pinilla, C., 2012. Selection of a bioassay battery to assess toxicity in the effluents and effluents of three water-treatment plants. *Univ. Sci.* 17, 152–166. doi:10.11144/javeriana.SC17-2.soab

Botts, J.A., Braswell, J.W., Goodfellow, W.L., 1989. Toxicity Reduction Evaluation Protocol for Municipal Wastewater Treatment Plants.

Botts, J.A., Braswell, J.W., Goodfellow, W.L., Bishop, D.F., 1988. Toxicity Reduction Evaluation at the Patapsco Wastewater Treatment Plant. US EPA.

Castillo Morales, G., 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IDRC/IMTA., México.

Castillo Morales, G., Vila, I.C., Neild, E., 2000. Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. *Environ. Toxicol.* 15, 370–375.

Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martínez, E., Kreuzinger, N., Kroiss, H., 2005. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Res.* 39, 4797–4807. doi:10.1016/j.watres.2005.09.015

Dalzell, D.J.B., Alte, S., Aspichueta, E., de la Sota, A., Etxebarria, J., Gutierrez, M., Hoffmann, C.C., Sales, D., Obst, U., Christofi, N., 2002. A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere* 47, 535–545.

Di Marzio, W.D., Sáenz, M., Alberdi, J., Tortorelli, M., Silvana, G., 2005. Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 380–391. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.10.002

DiGiano, F.A., Maeker, M., Champlin, T.L., Frey, M. V, 1992. Application of the toxicity reduction evaluation protocol for municipal wastewater treatment plants: Case histories at High point and Fayetteville, NC.

Farre, M., Kloter, G., Petrovic, M., Alonso, M.C., de Alda, M.J.L., Barcelo, D., 2002. Identification of toxic compounds in wastewater treatment plants during a field experiment. *Anal. Chim. Acta* 456, 19–30. doi:10.1016/S0003-2670(01)00908-4

García-Reyero, N., Lavelle, C.M., Escalon, B.L., Martinović, D., Kroll, K.J., Sorensen, P.W., Denslow, N.D., 2011. Behavioral and genomic impacts of a wastewater effluent on the fathead minnow. *Aquat. Toxicol.* 101, 38–48. doi:10.1016/j.aquatox.2010.08.014



- Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R., Tauler, R., Barceló, D., 2005. Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65, 358–366. doi:10.1016/j.talanta.2004.07.012
- Hernando, M.D., Mezcuca, M., Fernández Alba, A.R., Barceló, D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69, 334–342. doi:10.1016/j.talanta.2005.09.037
- Hutchings, M., Johnson, I., Hayes, E., Girling, A.E., Thain, J., Thomas, K., Benstead, R., Whale, G., Wordon, J., Maddox, R., Chown, P., 2004. Toxicity reduction evaluation, toxicity identification evaluation and toxicity tracking in direct toxicity assessment. *Ecotoxicology* 13, 475–484. doi:10.1023/B:ECTX.0000035297.90620.73
- Katsoyiannis, A., Samara, C., 2007. Ecotoxicological evaluation of the wastewater treatment process of the sewage treatment plant of Thessaloniki, Greece. *J. Hazard. Mater.* 141, 614–621. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.07.038
- Liwerska-Bizukojc, E., Urbaniak, M., 2007. Evaluation of phytotoxic effect of wastewater contaminated with anionic surfactants. *Biotechnologia* 76, 203–214.
- Manusadžianas, L., Balkelyte, L., Sadauskas, K., Blinova, I., Pöllumaa, L., Kahru, A., 2003. Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: Selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquat. Toxicol.* 63, 27–41. doi:10.1016/S0166-445X(02)00132-7
- Martins, J., Oliva Teles, L., Vasconcelos, V., 2007. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environ. Int.* 33, 414–425. doi:10.1016/j.envint.2006.12.006
- Mendonça, E., Picado, A., Paixão, S.M., Silva, L., Barbosa, M., Cunha, M.A., 2013. Ecotoxicological evaluation of wastewater in a municipal WWTP in Lisbon area (Portugal). *Desalin. Water Treat.* 51, 4162–4170. doi:10.1080/19443994.2013.768021
- Oberholster, P.J., Botha, A.M., Cloete, T.E., 2008. Biological and chemical evaluation of sewage water pollution in the Rietvlei nature reserve wetland area, South Africa. *Environ. Pollut.* 156, 184–192. doi:10.1016/j.envpol.2007.12.028
- Pessala, P., Schultz, E., Nakari, T., Joutti, A., Herve, S., 2004. Evaluation of wastewater effluents by small-scale biotests and a fractionation procedure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 263–272. doi:10.1016/j.ecoenv.2003.10.002
- Planes, E., Fuchs, J., 2015. Cuales Son Los Aportes De La Ecotoxicología a Las Regulaciones Ambientales. *Cienc. Invest.* 65, 45–62.
- Smital, T., Terzic, S., Zaja, R., Senta, I., Pivcevic, B., Popovic, M., Mikac, I., Tollefsen, K.E., Thomas, K. V., Ahel, M., 2011. Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 844–851. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.11.010
- Tyagi, V.K., Chopra, A.K., Durgapal, N.C., Arvind, K., 2007. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of municipal sewage treatment plant. *J. Appl. Sci. Environ. Manag.* 11, 61–67.
- U.S. EPA, 1991. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations Phase Toxicity Characterization Procedures. US EPA.

U.S. EPA, 1993. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase II Toxicity Identification Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity. US EPA.

U.S. EPA, 1999. Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plant-Appendix A to J.

Üstün, G.E., 2009. Occurrence and removal of metals in urban wastewater treatment plants. *J. Hazard. Mater.* 172, 833–838. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.07.073

Wong, J.W., Li, K., Fang, M., Su, D.C., 2001. Toxicity evaluation of sewage sludges in Hong Kong. *Environ. Int.* 27, 373–380. doi:10.1016/S0160-4120(01)00088-5

## SOBRE O ORGANIZADOR

**Dr. Juan Carlos Cancino Díaz** - Egresado de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), México, con la licenciatura en Ingeniero Bioquímico. Estudios de posgrado en la misma institución con la especialidad de maestría en Bioquímica y doctorado en Inmunología. Actualmente es profesor e investigador de la ENCB-IPN impartiendo la cátedra de Microbiología veterinaria para los Químicos Bacteriólogos Parasitólogos. El área de investigación es sobre el estudio de la biología de *Staphylococcus epidermidis*, con una alta producción de artículos científicos en revistas científicas de prestigio. Ha desempeñado como director de tesis de licenciatura, maestría y doctorado. Tiene una patente otorgada por el instituto mexicano de la propiedad intelectual y cuatro en curso de aprobación. Es miembro del sistema nacional de investigadores de México nivel II. Es editor de un libro sobre *Staphylococcus epidermidis* que está en curso de publicación y cinco capítulos de libro sobre su área de investigación.

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Aguas residuais 196, 200, 204, 206  
Anacyclus 149, 150, 152, 153, 154, 155, 158, 160, 161, 162, 163  
Aquatic fitness 68  
Atenção visual 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33  
Atención sanitaria 15, 21, 22, 25

### B

Bacterias halotolerantes 138, 146  
Bioensayos 180, 195, 196, 197, 198  
Biomechanics 68, 76, 77

### C

Calidad de la malta 100, 101, 105, 107  
Canabidiol 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 88  
Cebada malteada 99, 100, 101, 102, 103, 105, 108, 112  
Celulasas 138, 139, 140, 141, 146  
Ciatalgia 36, 37, 38, 41, 42, 43  
Cobre 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171  
Control biológico 174  
Criança 4, 27, 31, 32

### D

Deficiência auditiva 27  
Doença de Huntington 48, 49, 50, 51, 54, 56, 57, 58, 59, 60  
Doenças Crônicas 6, 7, 12, 78, 79, 80, 82, 83, 87

### E

Educação para a morte 1, 3, 7, 11, 13  
Efluentes urbanos 195, 196  
Enfermagem em Reabilitação 49  
Enfermedad de Chagas 90, 91, 94, 97, 98  
Entomopatógenos 174, 182  
Exercício Terapêutico 49

## F

Fitoquímica 149, 161, 163

Fitoterapia 79

Fotossíntese 164, 165, 166, 168, 170

## G

Gastritis 149, 150, 151, 152, 162, 163

## H

Hidrolasas 100, 102, 105, 108, 142, 146

## I

Insecticida 174, 178, 181, 182, 183, 184

Insecto-plaga 174

In-water forces 68, 69, 72, 74, 75

Itinerarios terapéuticos 15, 22, 25

## L

Lagos 140, 186, 187, 188, 190, 191

Leguminous 116, 133

Lepidópteros 174, 182

## M

Maconha Terapêutica 79, 82

Masaje neuroreflejo 36, 38, 46

Microalga 164, 166, 167, 170, 172

Migración internacional 15

Morbilidad sentida 15, 20, 22

Mujeres en edad fértil 90, 98

## N

Nodule 116, 119, 120, 123, 124, 125, 126, 129, 131

## P

Patagonia 186, 187, 188, 190, 191

Percepción remota 186, 187, 191

Petroleum hydrocarbons 116, 117, 131

Phenological stage 116, 117, 118, 119, 120, 123, 124, 125, 128, 131, 132

Plancton 186, 187

Profissionais da saúde 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13

## R

Reabilitação 48, 49, 50, 51, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 67

Revisão de literatura 1

## S

Sacrolumbalgia 36, 37, 42, 43

Scenedesmus 164, 165, 166, 167, 168, 170, 171, 172, 173

Surdez 27, 28, 29, 31, 32

## T

Toxicidad 151, 185, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206

Trypanosoma cruzi 90, 91, 98

## U

Úlcera 149, 150, 151, 158, 162

## X

Xilanasas 138, 139, 140, 141, 146

## Y

Young adults 68, 75

## Z

Zimogramas 100, 101, 102, 103, 106, 107, 109, 110, 113