

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GEOGRAFIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM
SAÚDE AMBIENTAL E SAÚDE DO TRABALHADOR**

MIRNA DE MELO MACEDO

**PERFIL DE SAÚDE DOS TRABALHADORES NOS TERRITÓRIOS DA
ATENÇÃO BÁSICA DO DISTRITO SANITÁRIO SUL, EM UBERLÂNDIA/MG**

UBERLÂNDIA

2017

MIRNA DE MELO MACEDO

**PERFIL DE SAÚDE DOS TRABALHADORES NOS TERRITÓRIOS DA
ATENÇÃO BÁSICA DO DISTRITO SANITÁRIO SUL, EM UBERLÂNDIA/MG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador do Instituto de Geografia da Universidade Federal de Uberlândia, (PPGAT/UFU), como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Linha de Pesquisa: Saúde do Trabalhador.

Orientador: Prof. Dra. Rosuita Fratar Bonito.

UBERLÂNDIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M141p
2017

Macedo, Mirna de Melo, 1963-
Perfil de saúde dos trabalhadores nos territórios da atenção básica
do distrito sanitário sul, em Uberlândia/MG / Mirna de Melo Macedo. -
2017.

122 f. : il.

Orientadora: Rosuira Fratari Bonito.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Saúde Ambiental e Saúde do
Trabalhador.

Inclui bibliografia.

1. Geografia médica - Teses. 2. Saúde e trabalho - Teses. 3. Pessoal
da área médica - Teses. 4. Saúde pública - Uberlândia (MG) - Teses. I.
Bonito, Rosuira Fratari, 1957-. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Saúde Ambiental e Saúde do
Trabalhador. III. Título.

CDU: 910.1:61

MIRNA DE MELO MACEDO

**PERFIL DE SAÚDE DOS TRABALHADORES NOS TERRITÓRIOS DA
ATENÇÃO BÁSICA DO DISTRITO SANITÁRIO SUL, EM UBERLÂNDIA/MG**

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador do Instituto de Geografia, da Universidade Federal de Uberlândia, (PPGAT/UFU), pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 30 de março de 2017.

Profa. Dra. Rosuila Fratari Bonito, UFU/MG

Profa. Dra. Leila Bitar Moukachar Ramos, UFU/MG

Prof. Dr. Walber Carrilho da Costa, POLITÉCNICA/MG

Com muito carinho, dedico este trabalho aos meus queridos familiares, pelo apoio constante e principais responsáveis por minhas conquistas. Aos profissionais do Centro de Referência em Saúde do Trabalhador e a Atenção Primária à Saúde do Distrito Sul, que permitiram a realização da pesquisa com dados secundários, sem a qual não teria sido possível o reconhecimento das reais potencialidades do CEREST no apoio matricial das equipes da Atenção Básica, particularmente sobre temas do universo da Saúde do Trabalhador.

AGRADECIMENTOS

À Deus, em agradecimento por tão grande bênção concedida, pois a Tua mão poderosa esteve sobre mim, em todos os momentos, me guiando e fortalecendo nessa caminhada. Receba meu louvor e gratidão... que eu nunca me esqueça de que, Aquele que me deu a vitória, é infinitamente maior e mais importante do que a vitória em si. Dedico a Ti, em primeiro lugar, esta graça alcançada. “Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas”. Rom.11:36 a.

À família agradeço pelo amor, apoio, confiança e motivação em meio às lutas e desafios, o que tem me impulsionado a prosseguir em direção às metas planejadas. Em especial, agradeço a minha mãe Ruth de Melo Rodrigues, pelo incentivo e ao meu cunhado André Teles Rodrigues, pela consultoria na tabulação dos dados e o aprendizado.

Aos colegas do CEREST, agradeço as várias colaborações importantíssimas ao acesso de dados secundários, no planejamento e realização das atividades de coleta de dados.

A minha amiga Roseli Aparecida Muniz, pela presença constante ajudando, contribuindo e incentivando a não desistir.

À minha orientadora, Rosuita Fratar Bonito, agradeço pelos ensinamentos, orientações e contribuições. Também pelas palavras de incentivo e superação, em momentos difíceis desta caminhada, que tiveram importância fundamental para o renovo das forças e prosseguimento da jornada.

Ao professor Andre Luis Teles Rodrigues pela contribuição na consolidação dos dados estatísticos.

Aos professores membros da banca de qualificação, agradeço pelas sugestões e correções na fase tão importante da pesquisa; e da banca examinadora, por terem atendido ao convite de desempenhar este papel, dispondo de seu tempo e conhecimento para analisar este trabalho.

Aos queridos professores, amantes da saúde do trabalhador, que diariamente contribuem para o fortalecimento da PNSTT no Brasil. Quão grande privilégio foi vivenciar riquíssimos momentos de aprendizado. Agradeço a oportunidade.

Colegas do mestrado, agradeço pelo companheirismo e amizade e declaro minha alegria em tê-los conhecido. Em especial, Rafael Lemes de Aquino, por me ouvir sempre nas demandas e necessidades, me orientando e compartilhando suas experiências acadêmicas. Por nos representar no colegiado com muito compromisso e responsabilidade.

Àqueles que colaboraram com os resultados desta pesquisa, agradeço pela responsabilidade, comprometimento e envolvimento com que abraçaram esta causa. Que os frutos desses esforços possam ser refletidos na melhoria da qualidade de vida da população trabalhadora, inicialmente do território pesquisado, e quem sabe, ultrapassando suas fronteiras.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram com a realização desta pesquisa e do mestrado profissional, meus sinceros agradecimentos.

“Peça a Deus que abençoe os seus planos e eles darão certo”.

Provérbios 16:3

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo identificar o perfil de saúde dos trabalhadores e os processos produtivos nos territórios das Unidades Básicas de Saúde da Família, em Uberlândia. Trata-se de uma análise epidemiológica transversal do tipo descritivo e quantitativo. O universo de Unidades de Atenção Primária em Saúde da Família é de 74 Equipes de Saúde da Família da Rede SUS do Município de Uberlândia, urbana e rural e são responsáveis por uma cobertura de 43% da população. Os dados desse estudo referem-se a 05 Unidades de Atenção Primária do Distrito Sanitário Sul. A fonte de dados foi o Centro de Referência em Saúde do Trabalhador- CEREST Regional, localizado em Uberlândia nos relatórios de Consolidado do Perfil Ocupacional da ESF/PACS, das Unidades de Saúde objeto deste estudo. O diagnóstico situacional trouxe informações do território em estudo relativas aos dados de atividades produtivas e indicadores de saúde, sendo identificado a prevalência de atividades domiciliares informais nos vários ramos de atividade (Comércio/vendas, Cabeleireira/Manicure/Salão de beleza, Costureiras e atividades domiciliares no ramo de Alimentos). Com relação à ocupação individual e sua conseqüente relação com a saúde, pode-se destacar que as principais ocupações são os Serviços Gerais e as Domésticas e considerou-se prioritária a intervenção nestas ocupações devido aos riscos e agravos relacionados à atividade. Desta forma, identificados os principais fatores de riscos e agravos e discutidas as propostas de possíveis soluções aos problemas relacionados aos agravos ocupacionais, considerados prioritários. Conclui-se que a análise do perfil produtivo e epidemiológico no território é uma poderosa ferramenta de planejamento e execução das ações de promoção, prevenção e atenção integral à saúde dos trabalhadores.

Palavras-chave: Atenção Primária. Saúde do Trabalhador. Perfil Produtivo.

ABSTRACT

The present study aimed to identify the health profile of workers and the productive processes in the territories of the Basic Units of Family Health, in Uberlândia. This is a cross-sectional epidemiological analysis of the descriptive and quantitative type. The universe of Primary Care Units in Family Health is 74 SUS Family Health Teams, urban and rural and are responsible for a coverage of 43% of the population. Data from this study refer to five Primary Care Units of the Southern Sanitary District, in the city of Uberlândia. The data source was the Reference Center on Occupational Health - CEREST Regional, located in the Municipality, in reports of Consolidated Occupational Profile of the ESF / PACS, of the Health Units object of this study. The situational diagnosis provided information on the territory under study related to the data of productive activities and health indicators. The prevalence of informal household activities in the various branches of activity (Trade / sales, Beauty salon, Dressmakers and domiciliary activities in the Branch of Food). With regard to individual occupation and its consequent relation with health, it is possible to highlight the main occupations are the General and Domestic Services, it was considered a priority the intervention in these occupations due to the risks and injuries related to the activity. In this way, the main risk factors and aggravated and discussed the proposals of hypotheses for solutions to the problems related to occupational diseases, considered as priority have been identified. It is concluded that the analysis of the productive and epidemiological profile in the territory is a powerful tool of planning and execution of the actions of promotion, prevention and integral attention to the health of the workers.

Keywords: Primary attention. Worker's health. Productive Profile.

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo identificar el perfil de salud de los empleados y los procesos de producción en los territorios de las Unidades Básicas de Salud Familiar en Uberlândia. Este es un análisis epidemiológico transversal de tipo descriptivo y cuantitativo. El universo de unidades de atención primaria de salud de la familia es de 74 equipos de salud SUS Red Familia, urbano y rural, y son responsables de una cobertura de población del 43%. Los datos de este estudio se refieren a 05 Unidades de Atención Primaria de la Salud del Sur Distrito, la ciudad de Uberlândia. La fuente de datos fue el Centro de Referencia de Salud del trabajador CEREST-regional, con sede en Uberlândia en los informes consolidados de la FSE Perfil Ocupacional / PACS, el objeto de las Unidades de Salud de este estudio. diagnóstico de la situación provocó la zona de estudio en relación con los datos de las actividades productivas y los indicadores de salud, identificó la prevalencia de las actividades del hogar informales en los diversos campos de la actividad (comercio / ventas, Peluquería / Manicura / Salón de belleza, Costureras y actividades en el hogar en industria alimentaria). En cuanto a la ocupación individual y su consecuente relación con la salud, se pueden destacar las principales ocupaciones son los Servicios Generales y de inicio, se consideró una intervención prioritaria en estas ocupaciones debido a los riesgos y peligros relacionados con la actividad. Por lo tanto, cómo los principales factores de riesgo y enfermedades identificadas y discutidas las soluciones hipótesis propuestas a los problemas relacionados con las enfermedades profesionales, la prioridad. Llegamos a la conclusión de que el análisis de la producción y el perfil epidemiológico en el territorio es una potente herramienta de planificación y ejecución de la promoción, la prevención y los trabajadores de atención integral de la salud.

Palabras- clave: Atención primario. Salud Ocupacional. Perfil productivo.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACS – Agente Comunitário de Saúde

AED – Atividade Econômica Domiciliar

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APS – Atenção Primária à Saúde

ATG – Acidente de Trabalho Grave

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CBO – Classificação Brasileira de Ocupações

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CEREST – Centro de Referência em Saúde do Trabalhador

CGSAT – Coordenação Geral de Saúde do Trabalhador

CID – Classificação Internacional de Doenças

CIST – Comissão Inter-setorial de Saúde do Trabalhador

CLT – Consolidação das Leis Trabalhistas

CNAE – Classificação Nacional de Atividades Econômicas

CNES – Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde

CNS – Conferência Nacional de Saúde

CNST – Conferência Nacional de Saúde do Trabalhador

CONASEMS – Conselho Nacional de Secretários Municipais de Saúde

CONASS – Conselho Nacional de Secretários Estaduais de Saúde

COPESA – Comissão Permanente de Saúde, Ambiente, Produção e

Desenvolvimento Sustentável

CRST – Centro de Referência em Saúde do Trabalhador

CTNBIO – Comissão Nacional de Biossegurança

DATASUS – Banco de Dados do Sistema Único de Saúde

DIESAST – Departamento Intersindical de Estudos e Pesquisa de Saúde e dos Ambientes de Trabalho

DSAT – Diretoria de Saúde do Trabalhador

DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos

EPI – Equipamento de Proteção Individual

ESF – Estratégia Saúde da Família

ESF – Equipe de Saúde da Família

FASTMEDIC – Sistema de Gestão em Saúde

GEISAT – Grupo Executivo Interministerial em Saúde do Trabalhador

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IAP – Instituto de Aposentadoria e Pensões

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INAMPS – Instituto de Assistência Médica da Previdência Social

INPS – Instituto Nacional de Previdência Social

INSS – Instituto Nacional de Seguridade Social

LER/DORT – Lesão por Esforços Repetitivos/Distúrbio Osteomuscular Relacionado ao Trabalho

MPAS – Ministério da Previdência e Assistência Social

MS – Ministério da Saúde

NEA/SEMAD – Núcleo de Emergência Ambiental/ Secretaria do Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável

OIT – Organização Internacional do Trabalho

OPAS – Organização Pan Americana de Saúde

PACS – Programa de Agentes Comunitários de Saúde

PIA – População em Idade Ativa

PNDA – Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios

PNST – Política Nacional de Saúde do Trabalhador e da Trabalhadora

RAS – Rede de Atenção à Saúde

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

RENAST – Rede Nacional de Atenção Integral à Saúde do Trabalhador

RTM-ST – Referência Técnica Municipal em Saúde do Trabalhador

SAT – Seguro Acidente do Trabalho

SES/MG – Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais

SIAB – Sistema de Informação da Atenção Básica

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

SMS/DAIS – Secretaria Municipal de Saúde - Diretoria de Atenção Integral à Saúde

SUS – Sistema Único de Saúde

UBSF – Unidade Básica de Saúde da Família

VISAT – Vigilância em Saúde do Trabalhador

VS – Vigilância em Saúde

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Ações da área de Saúde do Trabalhador contempladas nos elencos do Projeto de Fortalecimento da Vigilância em Saúde.

Quadro 2. Distribuição dos Distritos Sanitários segundo números de equipes, números de micro áreas, números de ACS e população - Uberlândia-MG, 2015.

Quadro 3. Distribuição das UBSFs do Distrito Sanitário Sul, segundo nome das equipes, número das áreas, quantidade de micro áreas, população e o número de Agentes Comunitários de Saúde, Uberlândia-MG, 2015.

Quadro 4. Distribuição das Unidades Básicas de Saúde, do Distrito Sanitário Sul, segundo data de implantação, população, número de micro áreas e número de Agentes Comunitários de Saúde, Uberlândia-MG, 2015.

Quadro 5. Distribuição de famílias e pessoas cadastradas nas UBSFs no ano de 2013.

Quadro 6. Distribuição de famílias entrevistadas e número de pessoas em idade ativa nas UBSFs no ano de 2013.

Quadro 7. Distribuição de atividade domiciliar formal e informal nas UBSFs, no ano de 2013.

Quadro 8. Número de manipulação de produtos químicos, de beleza e de alimentos no domicílio nas UBSFs, no ano de 2013.

Quadro 9. Distribuição de plantações no terreno do domicílio nas UBSFs, no ano de 2013.

Quadro 10. Distribuição das principais atividades domiciliares nas UBSFs, no ano de 2013

Quadro 11. Distribuição das principais ocupações individuais dos trabalhadores do território nas UBSFs, no ano de 2013.

Quadro 12. Doenças segundo a CID – 10 das cinco Unidades de Saúde da Família do Distrito Sanitário Sul- listadas em 2013 e 2014.

Quadro 13. Classificação das Doenças Segundo sua Relação com o Trabalho.

Quadro 14. Riscos à saúde dos trabalhadores dos salões de beleza do território da Região Sul do município de Uberlândia – MG

Quadro 15. Riscos à saúde dos trabalhadores de Serviços Gerais do território da região sul do município de Uberlândia-MG

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO.....	16
1	INTRODUÇÃO.....	19
2	MARCO TEÓRICO.....	21
2.1	Histórico da Saúde do Trabalhador.....	28
2.2	O modelo de Atenção à Saúde do Trabalhador.....	32
2.3	A Política Nacional de Saúde do Trabalhador.....	37
2.4	A Saúde do Trabalhador na Atenção Básica.....	39
2.5	Vigilância em Saúde do Trabalhador.....	45
2.6	O perfil produtivo ocupacional familiar	47
2.7	Fortalecimento da Vigilância em Saúde	51
3	PERCURSO METODOLÓGICO.....	57
3.1	Tipo de estudo.....	57
3.2	Cenário do estudo.....	58
3.3	População/amostragem.....	59
3.4	Coleta de dados.....	61
3.5	Aspectos éticos.....	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	64
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
	REFERÊNCIAS.....	112
	ANEXO A- Instrumento de Consolidado do Perfil Ocupacional.....	122

APRESENTAÇÃO

A pesquisa intitulada “Perfil de saúde dos trabalhadores nos territórios da atenção básica do distrito sanitário sul, em Uberlândia – MG”, surge a partir do conhecimento das diretrizes e ações desenvolvidas pelo Centro de Referência em Saúde do Trabalhador- CEREST Regional, situado no município de Uberlândia, sendo inspirada pelo Mestrado Profissional em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador do Instituto de Geografia da Universidade Federal de Uberlândia.

Pretende contribuir com a implementação da Política Nacional de Saúde do Trabalhador e da Trabalhadora no SUS, a partir do debate sobre a importância do diagnóstico estratégico situacional entendido como perfil produtivo e epidemiológico, o qual subsidia o planejamento das ações em Saúde do Trabalhador.

Com o intuito de contribuir com o avanço da organização dessas ações, no Programa Saúde da Família, e sobre as diretrizes do Fortalecimento da Vigilância em Saúde do Trabalhador e a integração dos demais componentes da Vigilância em Saúde, destacados nos objetivos da Política Nacional de Saúde do trabalhador (PNST-SUS), em sintonia com a Portaria 3.252/2009, que se torna importante este debate no campo da Saúde do Trabalhador.

A Vigilância em Saúde é na atualidade um dos grandes desafios do SUS, e deve ser articulada com a Vigilância Epidemiológica, Sanitária, Ambiental e da Saúde do Trabalhador. Uma das ações que deve ser incorporada pelas equipes da Atenção Primária em Saúde, é o mapeamento dos processos produtivos do território e assim identificar os riscos e perigos à saúde associados às atividades laborais, bem como situações de vulnerabilidade da população.

Baseando-se nesse contexto, esta pesquisa pretende debater a importância da categoria “território” no planejamento das ações de saúde do trabalhador, a fim de compreender o processo saúde-trabalho-doença no território, contribuindo com a sensibilização das equipes envolvidas e com o adequado planejamento das ações de saúde. Tal pretensão surge considerando que a proposta de territorialização é um mecanismo poderoso no

planejamento das ações de promoção e de atenção integral à saúde, uma vez que os projetos nascem das necessidades identificadas no território estudado, com a participação da comunidade.

Percebe-se na análise de identificação do usuário trabalhador e o estabelecimento da relação entre o agravo e o adoecimento e o trabalho, uma poderosa ferramenta de contribuição para o planejamento e execução das ações de promoção, prevenção e atenção integral à saúde dos trabalhadores.

Inicialmente apresenta-se uma breve contextualização teórica e histórica sobre a Saúde do Trabalhador enquanto um campo em movimento, a seguir é descrito sobre a criação da Rede Nacional de Atenção Integral à Saúde do Trabalhador - Renast, criada em 2002, por meio da Portaria no 1.679/GM, com objetivo de disseminar ações de saúde do trabalhador, articuladas às demais redes do Sistema Único de Saúde, SUS.

Com a definição da Política Nacional de Saúde do Trabalhador em 2005, a Renast passou a ser a principal estratégia da organização da Saúde do Trabalhador- ST no SUS, sob a responsabilidade da então Área Técnica de Saúde do Trabalhador do Ministério da Saúde.

Abordamos sobre a Política Nacional de Saúde do Trabalhador e da Trabalhadora a qual tem como finalidade definir os princípios, as diretrizes e as estratégias a serem observados pelas três esferas de gestão do Sistema Único de Saúde (SUS), para o desenvolvimento da atenção integral à saúde do trabalhador, com ênfase na vigilância, visando a promoção e a proteção da saúde dos trabalhadores e a redução da morbimortalidade decorrente dos modelos de desenvolvimento e dos processos produtivos.

Abordamos também, a Saúde do Trabalhador na Atenção Básica, descrevendo a importância da Atenção Básica como ordenadora das Redes de Atenção à Saúde e coordenadora do cuidado na Saúde do Trabalhador, bem como os desafios da Atenção Primária frente às novas questões e novas demandas relacionadas a saúde e ao trabalho.

Fizemos um breve relato sobre o conceito da Vigilância em Saúde do Trabalhador (VISAT), como um componente do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde, que visa à promoção da saúde e à redução da morbimortalidade da população trabalhadora, por meio da integração de ações que intervenham nos

agravos e seus determinantes decorrentes dos modelos de desenvolvimento e dos processos produtivos. Finalizando uma reflexão teórica sobre o Perfil Produtivo Ocupacional e sobre o projeto de Fortalecimento da Vigilância em Saúde – Estratégias de Ações de Vigilância à Saúde do Trabalhador na Atenção Primária à Saúde.

Apresentamos uma discussão e análise dos dados, dividida nas seguintes partes: (1) Número de famílias e pessoas cadastradas em Equipe de Saúde da Família, (2) Número de famílias entrevistadas e número de pessoas em idade ativa, (3) Número de atividade domiciliar formal e informal, (4) Número de locais de manipulação de produtos químicos, de beleza e de alimentos no domicílio, (5) Número de plantações em terreno do domicílio, (6) Principais atividades domiciliares nas UBSFS no ano de 2013, (7) Principais ocupações individuais dos trabalhadores do território das cinco Unidades de Saúde da Família do Distrito Sul no ano de 2013, em Uberlândia, (8) Doenças segundo a CID – 10 das cinco Unidades de Saúde da Família do Distrito Sanitário Sul- listadas em 2013 e 2014.

Ao final, algumas considerações que sintetizam as principais conclusões extraídas do estudo, incluindo indicações de outros possíveis desdobramentos a fim de aprofundar sobre a Saúde do Trabalhador na Atenção Primária e a contribuição das equipes, a partir do conhecimento do perfil de saúde dos trabalhadores e dos processos produtivos, bem como os principais agravos e situações de riscos relacionados ao trabalho formal e informal nos territórios das Unidades e a sua incorporação no planejamento das ações.

1. INTRODUÇÃO

A determinação da Saúde da Família como estratégia de reorganização da Atenção Primária em Saúde, remete a desafios, entre os quais o de implantar e/ou implementar a Política Nacional de Saúde do Trabalhador e Trabalhadora. Essa necessidade tem sido valorizada por gestores, e no caso no município de Uberlândia o Centro de Referência em Saúde do Trabalhador (CEREST) tem um grande papel enquanto suporte nas ações de supervisão aos profissionais da rede de serviços e de práticas conjuntas de intervenção especializada, incluindo a Vigilância em Saúde.

Este estudo busca aprofundar sobre a Saúde do Trabalhador na Atenção Primária à Saúde (APS), haja visto que é a porta de entrada preferencial do usuário do SUS, bem como apresentar o modelo de organização da Saúde do Trabalhador a partir do Projeto de Fortalecimento da Vigilância em Saúde, com o elenco da Saúde do Trabalhador, o qual tem como uma das metas a identificação das necessidades da população adscrita no território e relacioná-las às atividades produtivas para planejar e executar as ações de saúde.

A Resolução nº 3.152 de fevereiro de 2012, descreve que o planejamento é essencial para a gestão do SUS, propiciando resposta oportuna e efetiva às demandas e necessidades da população. Esta programação realizada é um processo contínuo e deve ser feito de acordo com a capacidade instalada do município e necessidades do campo de Saúde do Trabalhador.

Ainda segundo esta resolução, o diagnóstico estratégico situacional, entendido como perfil produtivo e epidemiológico, permite conhecer quantos são, quem são, o que fazem e de que adoecem e morrem os trabalhadores. Este subsidia o planejamento das ações em Saúde do Trabalhador no município.

Considerando a importância de se estabelecer o elenco de ações de Saúde do Trabalhador que deverão ser desenvolvidas e definidas a partir do diagnóstico da situação de saúde baseada no perfil produtivo e epidemiológico dos agravos relacionados ao trabalho, justifica-se a realização de uma

pesquisa que pode contribuir para o mapeamento do território de atuação das equipes, identificando as atividades produtivas desenvolvidas e os agravos, ocorrências de risco e perigos à Saúde do Trabalhador no território das Unidades de Atenção Primária em Saúde.

Os resultados deste estudo poderão possibilitar maior compreensão do problema em questão e, posteriormente, subsidiará o planejamento de ações em Saúde do Trabalhador, visando o aprimoramento da assistência e atendimento às medidas sugeridas pela Política de Saúde do Trabalhador.

A hipótese que norteou este estudo é a de que predomina nos territórios de atuação das equipes por distritos sanitários, riscos potenciais em relação às atividades produtivas domiciliares e às ocupações. Estas ações produtivas, bem como os riscos para a saúde delas decorrentes e o perfil epidemiológico da população trabalhadora, devem ser consideradas no planejamento das ações de vigilância e assistência à saúde, pelas Unidades de Saúde.

Com base nisto, buscou-se responder ao longo deste estudo às seguintes questões: Quais são as atividades produtivas/econômicas desenvolvidas na região? Quais são os possíveis riscos e perigos à saúde dos trabalhadores relacionados às atividades profissionais?

Com esta perspectiva posta, o presente estudo teve como objetivo identificar o perfil de saúde dos trabalhadores e os processos produtivos, bem como os principais agravos e situações de riscos relacionados ao trabalho formal e informal nos territórios das Unidades Básicas de Saúde da Família.

2. MARCO TEÓRICO

O conceito de Atenção Primária nos leva a entender que a mesma ocupa um papel de grande resolutividade, pois organiza ações e serviços de saúde com base nas necessidades da população, com atenção integral, respeitando o sujeito em sua singularidade, dando um enfoque na promoção e prevenção de doenças.

A Atenção Primária é aquele nível de um sistema de serviços de saúde que oferece a entrada no sistema para todas as novas necessidades e problemas, fornece atenção sobre a pessoa (não direcionada para a enfermidade) no decorrer do tempo, fornece atenção para todas as condições, exceto as muito incomuns ou raras, e coordena ou integra a atenção fornecida em outro lugar ou por terceiros.” (STARFIELD, 2002, p. 28).

A Atenção Primária à Saúde deve cumprir três funções essenciais, segundo Mendes (2002), a *resolução*, que visa solucionar a grande maioria dos problemas de saúde da população, a *organização*, que objetiva sistematizar os fluxos e contra fluxos dos usuários pelos diversos pontos de atenção à saúde, no sistema de serviços de saúde e a *responsabilização*, que se compromete pela saúde dos usuários em quaisquer pontos de atenção à saúde em que estejam.

Segundo o Conselho Nacional de Secretários Estaduais de Saúde (CONASS) a Atenção Primária é:

[...] um conjunto de intervenções de saúde no âmbito individual e coletivo que envolve promoção, prevenção, diagnóstico, tratamento e reabilitação. É desenvolvida por meio de exercício de práticas gerenciais e sanitárias, democráticas e participativas, sob forma de trabalho em equipe, dirigidas a populações de territórios (território-processo) bem delimitados, das quais assumem responsabilidades. Utiliza tecnologias de elevada complexidade e baixa densidade tecnológica, que devem resolver os problemas de saúde de maior frequência e relevância das populações. É o contato preferencial dos usuários com o sistema de saúde. Orienta-se pelos princípios da universalidade, acessibilidade (ao sistema), continuidade, integralidade, responsabilização, humanização, vínculo, equidade e participação social. A Atenção Primária deve

considerar o sujeito em sua singularidade, complexidade, integralidade e inserção sócio-cultural, e buscar a promoção de sua saúde, a prevenção e tratamento das doenças e a redução dos danos ou sofrimentos que possam estar comprometendo suas possibilidades de viver de modo saudável.” (CONASS, 2004, p. 7)

Starfield (2002) ressalta que a Atenção Primária à Saúde – APS deve ser orientada pelos seguintes princípios: primeiro contato, longitudinalidade, integralidade, coordenação, abordagem familiar e enfoque comunitário. Para a autora, o princípio do primeiro contato refere-se à APS como a porta de entrada, ou seja, o ponto de entrada de fácil acesso ao usuário para o sistema de serviços de saúde.

Para Donabedian (1973), o acesso pode ser classificado em sócio organizacional e geográfico. O primeiro diz respeito aos recursos que facilitam ou atrapalham (barreiras) os esforços dos cidadãos de chegarem ao atendimento. O segundo envolve as características relacionadas à distância e ao tempo necessário para alcançar e obter os serviços.

A acessibilidade pode ser analisada através da disponibilidade, comodidade e aceitabilidade do serviço pelos usuários. A disponibilidade diz respeito à obtenção da atenção necessária ao usuário e sua família, tanto nas situações de urgência/emergência quanto de eletividade (DONABEDIAN, 1973).

Além disso, a comodidade pauta-se no tempo de espera para o atendimento, a conveniência de horários, a forma de agendamento, a facilidade de contato com os profissionais, o conforto dos ambientes para atendimento, entre outros. A aceitabilidade é concernente à satisfação dos usuários quanto à localização e à aparência do serviço, à aceitação dos usuários quanto ao tipo de atendimento prestado e, também, à aceitação dos usuários quanto aos profissionais responsáveis pelo atendimento (DONABEDIAN, 1973).

Contudo, a definição da APS como centro ordenador das redes de atenção à saúde no SUS muda, na essência, o modelo de organização do SUS. Nessa perspectiva, a APS deixa de ser o primeiro nível da rede para assumir a responsabilidade pela coordenação do cuidado integral à saúde da população adscrita em um dado território. Para se entender o alcance dessa

afirmação é importante resgatar a definição de modelos de atenção, que contempla a organização de redes de atenção à saúde, no que concerne à soma dos equipamentos e os agentes que auxiliam dentro deste processo (MENDES, 2002).

Assim como as combinações tecnológicas, na concepção de Mendes (2002), incluem o uso de recursos das tecnologias duras (equipamentos), as leve dura (saberes disciplinares) e as leves (relações humanas). Pode-se dizer que o modelo de atenção está relacionado à forma de organização dos recursos tecnológicos para identificação e resposta aos problemas de enfermidade da população nos serviços de saúde.

Nesse sentido, não cabe mais a classificação de baixa complexidade atribuída à APS. Conceitualmente, considerar a APS enquanto centro ordenador da atenção à saúde no SUS significa atribuir-lhe grande complexidade e pressupõe estreita articulação com os níveis do sistema que incorporam mais recursos tecnológicos, anteriormente denominados “de média e alta complexidade”, de modo a garantir a integralidade e respostas adequadas às necessidades dos usuários.

Mendes (2009) destaca que esta visão equivocada de complexidade contribui para que os gestores, políticos e profissionais de saúde valorizem mais as práticas desenvolvidas nos níveis secundários e terciários da atenção à saúde.

Em outras palavras, a proposta de articulação entre os níveis de cuidado caracteriza a organização da atenção à saúde em redes, que podem ser entendidas como a interligação entre vários agentes envolvidos na questão relacionada à saúde de modo colaborativo.

Dessa maneira, a substituição do modelo hierárquico piramidal tradicional, pela formatação das redes de atenção à saúde na forma poliárquica pressupõe que todos os pontos de atenção à saúde são igualmente importantes, guardadas as diferenças quanto às densidades tecnológicas que os caracterizam (MENDES, 2009).

A concepção do sistema vigente no SUS se pauta no nível hierárquico, piramidal e formatado segundo níveis de complexidades, no qual a atenção básica ocupa posição de menor complexidade, muda-se para a concepção das

redes de atenção à saúde. Esta rede se estrutura em torno de um conjunto de pontos de atenção contínua e integral a uma população definida, tendo como centro coordenador a APS.

Para prover atenção integral, a rede se organiza em vários componentes, dentre eles: o centro de comunicação (a própria APS); os pontos de atenção à saúde, secundários e terciários; os sistemas de apoio (assistência farmacêutica, apoio diagnóstico e terapêutico e sistemas de informação em saúde); os sistemas logísticos (prontuário de família, cartão de identificação dos usuários, central de regulação e sistemas de transporte sanitário) e o sistema de governança, exercido pelos gestores e pelo controle social (MENDES, 2009, p.125).

Nesse entendimento, a APS dentro das redes de atenção à saúde assume o papel de centro de comunicação, coordenador dos fluxos e contra fluxos de toda a rede e deve ser entendida como: “uma forma singular de apropriar, recombina, reorganizar e reordenar os recursos do sistema para satisfazer as necessidades, demandas e representações da população” (MENDES, 2009, p. 163).

Sobretudo, a organização da atenção à saúde dos trabalhadores a partir da Atenção Primária à Saúde reveste-se de especial importância, quando se considera a capilaridade do sistema e a possibilidade de fazer a atenção integral à saúde chegar o mais próximo de onde as pessoas vivem e trabalham e o potencial desses serviços para identificar as necessidades de saúde da população adscrita no território e relacioná-las às atividades produtivas para planejar e executar as ações.

Entretanto, observa-se que no cotidiano da APS, o papel do trabalho enquanto determinante do processo saúde-adoecimento-cuidado dos indivíduos e do coletivo e dos impactos no meio ambiente não está incorporado de forma sistemática nas práticas de saúde.

Estudos sobre a Saúde do Trabalhador demonstram que, apesar de os profissionais compreenderem a importância desta temática, a abordagem deficiente de temas relacionados à área saúde e ao trabalho na formação profissional, a falta de suporte técnico para o desenvolvimento das ações e a dificuldade de encaminhamento para os serviços especializados em Saúde do Trabalhador são fatores que limitam a atenção à saúde dos trabalhadores na APS (CHIAVEGATTO, 2010).

Em conformidade com a Política Nacional de Atenção Básica - PNAB (BRASIL, 2006), a Atenção Básica tem como fundamentos efetivar a integralidade em seus vários aspectos, a saber: integração de ações programáticas e demanda espontânea; articulação das ações de promoção à saúde, prevenção de agravos, vigilância à saúde, tratamento e reabilitação, trabalho de forma interdisciplinar e em equipe, e coordenação do cuidado na rede de serviços; sendo assim espera-se que os serviços da APS desenvolvam ações de Saúde do Trabalhador, o que é um desafio.

A rigor, o papel do trabalho, enquanto determinante do processo saúde-doença-cuidado deve ser considerado em qualquer ponto da rede de atenção à saúde. Em cada nó de rede ou ponto de atenção, o trabalhador que demanda o serviço deve ser reconhecido como tal e deve ser considerada sua inserção no processo produtivo, ou seja, a possibilidade ou o modo como seu trabalho afeta sua saúde.

Nas ações de vigilância busca-se o aumento das notificações, melhoria da qualidade das informações, a análise do perfil de agravos à saúde relacionados ao trabalho, em articulação com a Vigilância Epidemiológica e Ambiental e o reconhecimento dos riscos para a saúde, gerados nos processos de trabalho, em articulação com a Vigilância Sanitária e Ambiental.

A Rede Nacional de Atenção Integral à Saúde do Trabalhador, Renast, foi criada em 2002, por meio da Portaria no 1.679/GM, com objetivo de disseminar ações de saúde do trabalhador, articuladas às demais redes do SUS. Com a definição da Política Nacional de Saúde do Trabalhador em 2005 (Brasil, 2005), a Renast passou a ser a principal estratégia da organização da ST no SUS, sob a responsabilidade da então Área Técnica de Saúde do Trabalhador do Ministério da Saúde, hoje Coordenação Geral da Saúde do Trabalhador, [CGSAT](#).

A Renast compreende uma rede nacional de informações e práticas de saúde, organizada com o propósito de implementar ações assistenciais, de [vigilância](#), prevenção, e de promoção da saúde, na perspectiva da ST. Em sua atual formatação institucional prevista na Portaria nº 2.728 de 11 de novembro de 2009, a Renast deve integrar a rede de serviços do SUS por meio de Centros de Referência em Saúde do Trabalhador ([CEREST](#)). Além disso, elaboram protocolos, linhas de cuidado, e instrumentos que favorecem a integralidade das

ações, envolvendo a atenção básica, de média e alta complexidade, serviços e municípios sentinela. Essa Portaria também estabelece que a Renast seja implementada de forma articulada entre o Ministério da Saúde (MS), as Secretarias de Saúde dos estados, o Distrito Federal, e os municípios, com o envolvimento de outros setores também participantes da execução dessas ações. Definida dessa forma, a Renast se constitui em uma complexa rede que se concretiza com ações transversais, que incluem a produção e gestão do conhecimento, e todos os níveis e ações definidas. Grandes esforços e avanços têm sido feitos para a institucionalização da rede, e para a formalização de mecanismos de funcionamento, bem como a relação entre seus componentes (BRASIL, 2005, p.225).

Considerando a importância da melhoria da informação sobre os agravos à saúde relacionados ao trabalho, foi publicada a Portaria nº. 777, em 28 de abril de 2004, definindo a notificação compulsória de um conjunto de 11 agravos, a partir da rede de serviços sentinela, que teria a capacidade presumida de diagnosticar e estabelecer a relação com o trabalho e registrá-los no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN-NET) do SUS. Para apoiar estas ações foram preparados protocolos para o cuidado diferenciado aos Agravos mencionados na Portaria, porém estes não contemplam de forma satisfatória, as ações a serem desenvolvidas na APS (BRASIL, 2004).

Outro marco para instituir uma política de Saúde do Trabalhador foi a 3ª Conferência Nacional de Saúde do Trabalhador, realizada em 2005, envolvendo ampla participação social, que discutiu avanços e dificuldades encontrados para consolidação do campo de Saúde do Trabalhador no SUS.

E entre as recomendações da Conferência está a incorporação nas agendas de saúde, em nível nacional, estadual e municipal, das ações de Saúde do Trabalhador na Atenção Primária à Saúde e nos serviços de Urgência e Emergência enquanto portas de entrada do sistema e no cuidado de média e alta complexidade (BRASIL, 2005).

Apesar das muitas dificuldades e contradições, observa-se o movimento bem definido na direção de se desenvolver ações de Saúde do Trabalhador na Atenção Primária a Saúde. Assim, os CEREST Regionais têm desenvolvido atividades de matriciamento das equipes de Saúde da Família para a notificação de acidentes e doenças relacionadas ao trabalho e o apoio aos

processos de descentralização da assistência em Saúde do Trabalhador do CEREST para a APS (POÇO, 2008).

O CEREST é um ponto de atenção da rede que possui como principal atribuição o matriciamento das ações de Saúde do Trabalhador. A rede sentinela está organizada a partir dos pontos de atenção considerados sensíveis para identificação dos agravos relacionados ao trabalho.

Em 2012, a Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES-MG) publicizou a todo Estado, a 1ª edição do “Instrutivo para a Execução e Avaliação das Ações de Vigilância em Saúde”, o objetivo era de que este fosse um guia para as equipes municipais na qualificação das ações assumidas perante o edital SES-MG 01/2012. Em 2013, foi publicada a segunda edição do Instrutivo para execução e avaliação das ações de Vigilância em Saúde, o Projeto de Fortalecimento da Vigilância em Saúde em Minas Gerais, resolução SES no 3.717/2013 (LAGUARDIA, 2014).

Certamente, tal documento configura-se como importante ferramenta norteadora das rotinas e processos de trabalho das áreas de Vigilância Epidemiológica, Sanitária, Ambiental, Promoção da Saúde, Vigilância da Situação de Saúde e Vigilância à Saúde do Trabalhador. Como parte deste documento, foi desenvolvido um importante instrumento de cadastro das atividades produtivas efetuadas nos domicílios, com a identificação de possíveis riscos para a saúde relacionados ao trabalho (LAGUARDIA, 2014).

Ademais, o objetivo de tal registro é identificar as atividades produtivas existentes na área de abrangência de cada ESF e PACS, tanto de estabelecimentos comerciais formais e informais quanto de atividades domiciliares (atividades realizadas dentro do domicílio), além de identificar a ocupação dos membros das famílias cadastradas de cada Equipe de Saúde da Família (ESF) e do Programa Agentes Comunitários de Saúde (PACS).

Por fim, espera-se que entre as ações a serem implementadas em médio prazo, uma delas é de estabelecer o elenco de ações de Saúde do Trabalhador que deverão ser desenvolvidas e definidas a partir do diagnóstico da situação de saúde baseado no perfil produtivo e epidemiológico dos agravos relacionados ao trabalho, inserindo-as nos Planos Municipais e Estaduais de Saúde.

2.1. HISTÓRICO DA SAÚDE DO TRABALHADOR

Antes do advento do SUS, a atuação do Ministério da Saúde se resumia às atividades de promoção de saúde e prevenção de doenças (por exemplo, vacinação), realizadas em caráter universal, e à assistência médico-hospitalar para poucas doenças; servia aos *indigentes*, ou seja, a quem não tinha acesso ao atendimento pelo Instituto Nacional de Assistência Médica da Previdência Social - INAMPS.

O INAMPS foi criado pelo regime militar em 1974 pelo desmembramento do Instituto Nacional de Previdência Social (INPS), que hoje é o Instituto Nacional de Seguridade Social (INSS). Era uma autarquia filiada ao Ministério da Previdência e Assistência Social (hoje Ministério da Previdência Social), e tinha a finalidade de prestar atendimento médico aos que contribuíam com a previdência social, ou seja, aos empregados de carteira assinada.

Em termos objetivos, a política do Estado brasileiro para a saúde era oferecida, individualmente, de forma compensatória, para os beneficiários da Previdência Social ou, coletivamente, por meio de campanhas e programas específicos para controle de doenças endêmicas (BRASIL, 2005).

A estrutura de atenção à saúde existente desde o final do século XIX, através das Caixas de Assistência, foi unificada no governo Vargas, que criou a estrutura previdenciária dos Institutos de Aposentadoria e Pensões (IAP) por categorias de trabalhadores, com a participação das empresas e dos trabalhadores, representados por seus sindicatos na sua administração. Esses institutos possuíam volumosos recursos e proviam a assistência médica por meio de hospitais próprios. Porém, aos poucos, o Estado passou a influenciar cada vez mais na administração previdenciária, inclusive nomeando seus presidentes. O seu controle, inclusive o financeiro, foi transferido ao Estado. A concessão de benefícios passou a obedecer a critérios cada vez mais rígidos e seus valores foram reduzidos. Esses vultuosos recursos acumulados, sob o controle do Estado, foram destinados ao processo de industrialização brasileira. (CARVALHO; MARTIN; CORDONI JR., 2001, p. 30).

Até o final da década de 50, a assistência médica previdenciária não era importante, mas passou a consumir recursos cada vez mais significativos, devido à industrialização e novas formas de adoecimento. Esse sistema tornou-

se deficitário no início dos anos 60 e, em 1967, o governo militar unificou os Institutos de Aposentadoria e Pensões (IAP) no Instituto Nacional de Previdência Social – INPS, excluindo os trabalhadores e empregadores da sua gestão (CARVALHO; MARTIN; CORDONI JR., 2001, p. 31).

Ainda para os autores, este modelo de atenção à saúde, também chamado de modelo médico-assistencial privatista, persistiu hegemônico dos anos 60 até meados dos anos 80. Grande parte da população foi excluída e isso se refletiu nos altos índices de mortalidade infantil, perinatal, materna e por acidentes de trabalho e na baixa capacidade diagnóstica e de registro de doenças relacionadas ao trabalho.

Na década de 70, no contexto da Ditadura Militar (1964-1985), o modelo de saúde hegemônico era centrado nas ações de âmbito federal, no qual o Ministério da Saúde (MS) e o Ministério da Previdência e Assistência Social (MPAS), junto com o Instituto Nacional de Assistência Médica da Previdência Social (INAMPS) dividiam a responsabilidade nas ações na área da saúde, ao ficar, o primeiro responsável pelas ações preventivas de saúde, enquanto o segundo ficava responsável pelas ações curativas de diagnósticos, tratamento e reabilitação (VIANA, 2000).

Também nesta década, conforme Paim (2009) o que se percebia quanto ao sistema de saúde brasileiro é que este era semelhante ao norte-americano, sendo excludente, pois apenas os trabalhadores pertencentes ao mercado formal de trabalho podiam fazer parte da clientela dos serviços de saúde. Estes serviços eram prestados por uma multiplicidade de instituições e organizações – estatais e privadas, por meio de um modelo médico-assistencial privatista que privilegiava a cura da doença ao invés da promoção e prevenção da saúde.

Na conjuntura em que vivia o país, marcada pela crise econômica e pelo processo de redemocratização política, gesta-se o Movimento da Reforma Sanitária Brasileira, também conhecida como Movimento Sanitário ou Movimento pela Democratização da Saúde. Por conseguinte, o Movimento Sanitário Brasileiro questiona a intervenção estatal na saúde (CARVALHO; MARTIN; CORDONI JR., 2001).

Todavia, este movimento se iniciou na década de 70, mas foi apenas em 1980, mais precisamente em 1986, com a 8ª Conferência Nacional de Saúde, que se obteve avanços significativos, pois foi aí que se levantou a bandeira da Reforma Sanitária. Mendes (1995) conceitua a Reforma Sanitária como:

(...) um processo modernizador e democratizante de transformação nos âmbitos político-jurídico, político-institucional e político-operativo, para dar conta da saúde dos cidadãos, entendida como um direito universal e suportada por um Sistema Único de Saúde, constituído sob regulação do Estado que objetive a eficiência, eficácia e equidade e que se construa permanentemente através do incremento de sua base social, da ampliação da consciência sanitária dos cidadãos, da implantação de um outro paradigma assistencial, do desenvolvimento de uma nova ética profissional e da criação de mecanismos de gestão e controle populares sobre o sistema. (MENDES, 1995, p. 42).

A Constituição Federal de 1988 então irá inaugurar o conceito de Seguridade Social no Brasil, tendo como base o tripé composto pela: Saúde, Previdência e Assistência Social. A Saúde, nesta Carta Magna, passa a ser direito de todos e dever do Estado, já a Previdência Social é para quem contribui e a Assistência Social para quem dela necessitar. Inaugura-se um novo conceito ampliado de saúde, o qual a define não apenas como ausência de doenças, enfocando seu aspecto biológico, mas como resultante de todo um contexto sanitário, social, político, cultural e econômico.

Conforme Bravo (2007), a Constituição Federal de 1988 é a mais progressista e nela, à Saúde coube cinco artigos (Art. 196-200), que determinam que esta é um direito de todos e dever do Estado e estatuem a integração dos serviços de saúde de forma regionalizada e hierárquica, constituindo um sistema único. Portanto, na Constituição de 1988, foi estabelecida a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), que se pautava nos princípios básicos da Reforma Sanitária, a saber: a equidade, a universalidade, a integralidade e a participação social.

Por certo, no Brasil, a política de Saúde do Trabalhador começou a ser pensada a partir da década de 80 em conjunto com o Movimento da Reforma Sanitária. A aproximação da medicina preventiva e social com as ciências sociais trouxe novos conceitos para saúde pública, incorporando categorias do marxismo, que contribuíram para modificar a interpretação do processo saúde-

adoecimento-cuidado, agregando o papel do trabalho e do trabalhador enquanto sujeito deste campo de atuação, em meio a uma sociedade que viviam mudanças nas relações políticas e econômicas, no contexto de grande investimento na industrialização que gerou um grande aumento nos acidentes de trabalho (MINAYO-GOMEZ; THEDIM-COSTA, 1997).

A classe operária industrial teve um importante papel nas discussões junto ao Movimento da Reforma Sanitária. A partir dos sindicatos, foram criados mecanismos de reivindicação dos direitos trabalhistas, dentre eles o direito à saúde com a exigência da implementação de ações voltadas para saúde dos trabalhadores. Neste sentido, cabe destacar o importante papel do Departamento Intersindical de Estudos e Pesquisas de Saúde e dos Ambientes de Trabalho (DIESAT), órgão suprapartidário e intersindical voltado para produzir conhecimento técnico para subsidiar as ações dos sindicatos (LACAZ, 1997).

As primeiras propostas específicas de intervenção na saúde dos trabalhadores surgiram a partir da Conferência de Alma Ata, em 1978, e no início dos anos 80, organismos internacionais como a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) e a Organização Internacional do Trabalho (OIT) lançaram diretrizes e recomendações que reforçaram a importância da temática (LACAZ, 1997).

Respalado por esta movimentação internacional, o movimento da Reforma Sanitária propôs uma política nacional voltada para saúde dos trabalhadores que tivesse como foco os determinantes sociais do processo saúde-adoecimento-cuidado e durante a 8ª Conferência Nacional de Saúde (CNS) a Saúde do Trabalhador foi amplamente debatida, tendo como desdobramento a realização da I Conferência Nacional de Saúde do Trabalhador (CNST), realizada no mesmo ano (LACAZ, 2007).

Desta forma, a luta conjunta do movimento sindical com o Movimento da Reforma Sanitária fez com que em 1988 a Saúde do Trabalhador fosse incluída na Constituição Federal no escopo das ações do SUS, posteriormente desenvolvida na Lei 8080/90 (HOELFEL, DIAS, SILVA, 2005).

2.2. O MODELO DE ATENÇÃO À SAÚDE DO TRABALHADOR – A CRIAÇÃO DA RENAST

A construção de ambientes e processos de trabalho saudáveis, o fortalecimento da vigilância de ambientes, os processos e agravos relacionados ao trabalho e a assistência integral à saúde caracterizam a denominada Atenção Integral à Saúde. Pressupõe-se a adequação e a ampliação da capacidade institucional de modo a permitir que este conjunto de ações seja desenvolvido com competência e resolutividade pela rede de serviços de saúde, em ação coordenada de diversos setores do governo e da sociedade civil.

Mas também, a articulação intra-setorial envolve todas as instâncias do SUS. No Ministério da Saúde, a Área Técnica de Saúde do Trabalhador é o ponto focal dessa articulação e abrange, no campo da assistência, a Atenção Básica, a Média e Alta Complexidade e os programas e ações direcionadas a grupos populacionais específicos, entre eles: as mulheres, os idosos, as crianças e os adolescentes e os portadores de necessidades especiais.

A priori, tendo o histórico e cronologia de toda temática, em setembro de 2002 foi instituída a Rede Nacional de Atenção Integral à Saúde do Trabalhador - RENAST, através da Portaria MS 1679/02, que se trata de uma rede hierarquizada em três níveis de gestão - Ministério da Saúde, Secretarias de Estado, Distrito Federal e Secretarias Municipais de Saúde - visando romper a fragmentação e marginalidade da Saúde do Trabalhador e criando uma cultura institucional sanitária frente aos problemas decorrentes da relação saúde, trabalho e meio ambiente (HOEFEL, DIAS, SILVA, 2005).

Para as autoras, a RENAST é uma rede nacional de informação e práticas de saúde, organizada com o propósito de implementar ações assistenciais, de vigilância e de promoção da saúde, no SUS, na perspectiva da Saúde do Trabalhador. A compreensão do processo saúde-adoecimento-cuidado dos trabalhadores, que norteia a RENAST, está baseada no enfoque das relações Trabalho-Saúde-Doença e da centralidade do trabalho na vida das pessoas, desenvolvida pela epidemiologia social.

Por certo, ela integra e articula as linhas de cuidado da atenção básica, da média e alta complexidade ambulatorial, pré-hospitalar e hospitalar, sob o controle social, nos três níveis de gestão: nacional, estadual e municipal, tendo como eixo os Centros de Referência em Saúde do Trabalhador - CRSTs. Estes centros deixam de ser porta de entrada do Sistema e assumem papel de suporte técnico e científico e de núcleos irradiadores da cultura da centralidade do trabalho e da produção social do adoecimento no SUS.

Além disso, tais centros são o *lócus* privilegiado de articulação e pactuação das ações de saúde, intra e intersetorialmente, no seu território de abrangência, que pode ser a capital, as áreas metropolitanas, municípios pólos de assistência das regiões e microrregiões de saúde.

Assim, entre as tarefas a serem cumpridas pelos CRST estão: prover suporte técnico adequado às ações de assistência e vigilância da Saúde do Trabalhador; recolher, sistematizar e difundir informações de modo a viabilizar as ações de vigilância, facilitar os processos de capacitação e educação permanente para os profissionais e técnicos da rede do SUS e o controle social (HOEFEL, DIAS, SILVA, 2005).

Os princípios e diretrizes que norteiam a RENAST são coincidentes com os da Política Nacional de Saúde do Trabalhador e podem ser resumidos em:

I) atenção integral à Saúde dos Trabalhadores; II) articulação intra e intersetoriais; III) informações em Saúde do Trabalhador; IV) apoio ao desenvolvimento de estudos e pesquisas; V) capacitação permanente em Saúde do Trabalhador e VI) participação da comunidade na gestão das ações em Saúde do Trabalhador (BRASIL, 2012, p.59).

Também é estratégica a articulação das ações das Secretarias de Vigilância em Saúde, em especial com a Coordenação Geral de Vigilância Ambiental (CGVAM), de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde, de Gestão Participativa, de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, além da Anvisa e Funasa. Entre os fóruns estratégicos para a *pactuação* intra-setorial, estão: o Conselho Nacional de Saúde (CNS), a Comissão Inter-setorial de Saúde do Trabalhador (CIST), o Colegiado de Secretários do Ministério da Saúde, a Comissão Permanente de Saúde, Ambiente, Produção e Desenvolvimento Sustentável (Copesa), o Conselho Nacional de Secretários

de Saúde (Conass) e o Conselho Nacional de Secretários Municipais de Saúde (Conasems). A articulação inter-setorial tem como interlocutores privilegiados os Ministérios do Trabalho e Emprego, Previdência Social e Meio Ambiente e está sob a responsabilidade direta do Grupo Executivo Interministerial em Saúde do Trabalhador (GEISAT).

Por exemplo, temos outros fóruns de articulação intersetorial como: o Fórum Permanente de Erradicação do Trabalho Infantil, o Conselho Nacional de Segurança Química (Conasq), o Conselho Nacional de Direitos Humanos, a Comissão Nacional de Biossegurança (CTNBIO), os Movimentos Sociais e as Organizações Sindicais de trabalhadores.

Considerando a importância da produção de conhecimento para o desenvolvimento da atenção à Saúde do Trabalhador, particularmente nesse cenário de mudanças assinalado anteriormente, ela deve estar orientada por critérios epidemiológicos, relevância social e capacidade das instituições de pesquisa e envolver todos os equipamentos da rede de serviços do SUS, em particular os CRST. A capacitação dos profissionais, outra prioridade para a implementação da RENAST, deve contemplar a diversidade e especificidades regionais, incorporar os princípios do trabalho cooperativo, interdisciplinar e em equipe multiprofissional e a experiência acumulada pelos Estados e municípios (HOEFEL e DIAS, 2005).

A participação dos trabalhadores é considerada essencial para a identificação dos fatores de risco presentes no trabalho e das repercussões destes sobre o processo saúde-adoecimento-cuidado. Também é fundamental para a transformação das condições geradoras de acidentes e doenças. Na atualidade, o crescimento das relações informais e precárias de trabalho exige a criação ou a identificação de novas modalidades de representação dos trabalhadores, para além das organizações sindicais tradicionais (SILVEIRA; RIBEIRO; LINO, 2005).

Sobre o Sistema de Informação em Saúde do Trabalhador, Hoefel, Dias (2005) ressaltam que a utilização da informação produz conhecimento para que os profissionais atuem de forma eficiente e com eficácia para que possam alcançar melhoria nos processos de trabalho.

A rigor não se pode falar de um "modelo de atenção da RENAST", uma vez que este é o próprio modelo de atenção do Sistema Único de Saúde, organizado segundo os princípios da universalidade de acesso, integralidade da atenção com equidade e controle social, em um dado território, de modo regionalizado e hierarquizado, privilegiando a estratégia da Atenção Básica de Saúde e o enfoque da Promoção da Saúde (HOEFEL; DIAS, 2005).

Inegavelmente, os trabalhadores sempre foram usuários do sistema de saúde. A proposta da RENAST é qualificar esta atenção, fazendo com que o sistema como um todo, entenda e funcione na perspectiva da Saúde do Trabalhador. Para o trabalhador, na qualidade de indivíduo, ainda que os procedimentos diagnósticos e o tratamento da doença que apresenta sejam os mesmos, independentemente, de o agravo estar ou não relacionado ao seu trabalho atual ou pregresso.

Por outro lado, é importante que esta relação seja estabelecida e sejam feitos os encaminhamentos adequados. Somente a partir do estabelecimento da relação entre o agravo ou a doença com o trabalho e do registro no sistema de informação é possível coletivizar o fenômeno e desencadear procedimentos de vigilância que levem à mudança nas condições e ambientes de trabalho geradoras de doença.

Além disso, a identificação de situações ou de fatores de risco para a saúde nas situações de trabalho, originada nas ações de vigilância, permite o encaminhamento dos expostos e doentes à assistência adequada. Também, as ações de Saúde do Trabalhador são desencadeadas a partir da identificação de um agravo à saúde ou de uma situação de risco, relacionados ao trabalho. A indissociabilidade das ações assistenciais e de vigilância da saúde constitui uma pedra angular da Saúde do Trabalhador (HOEFEL E DIAS, 2005).

Nesta identificação dos pilares que orientam o desenho e a atuação da RENAST, é importante destacar a ideia-proposta ou conceito de Desenvolvimento Humano Sustentável. Apesar das controvérsias que envolvem o termo e as formas como essa expressão tem sido apropriada por distintos setores sociais, a realidade tem apontado, de modo consistente, a necessidade de inclusão das questões relacionadas às relações Trabalho-Ambiente e Saúde, de modo especial a Saúde do Trabalhador, nas agendas de

discussão do modelo de desenvolvimento a ser adotado no país (HOEFEL e DIAS, 2005).

Na atualidade, as políticas públicas setoriais que enfocam a produção e distribuição de bens oriundos da transformação da natureza e prestação de serviços, na agricultura, comércio, indústria, desenvolvimento e ciência e tecnologia, não têm, via de regra, levado em consideração as consequências sobre as condições de vida e os perfis de adoecimento relacionados ao trabalho. A mesma fragmentação se reproduz nas políticas setoriais na esfera da Previdência Social, Meio Ambiente e Trabalho.

Para a mudança desse quadro, Hoefel e Dias (2005) ratificam que é necessário que as políticas públicas privilegiem a construção de processos produtivos limpos e saudáveis, de modo a diminuir os riscos de adoecimento e a degradação do ambiente e garantir uma distribuição equitativa e justa dos benefícios e problemas gerados nos processos produtivos.

Apesar dos percalços, pode-se considerar que a estratégia da RENAST, para prover uma atenção diferenciada aos trabalhadores no SUS tem sido bem-sucedida. Hoefel e Dias (2005, p.169) destacam que entre as dificuldades a serem superadas estão:

(...) a) que a lógica do modelo da RENAST, centrada na atuação regionalizada dos CRSTs, não corresponde à organização do SUS centralizada na municipalização; b) há uma frágil articulação intra-setorial uma vez que a Saúde do Trabalhador ainda não foi efetivamente incorporada na Agenda de Saúde do SUS, nos níveis federal, estadual e municipal; c) existe uma confusão dos papéis das coordenações estaduais e municipais de Saúde do Trabalhador e dos Centros de Referência; d) há falta de orientação clara quanto aos processos de *pactuação* dos procedimentos de assistência, vigilância e informação em saúde, uma vez que, com frequência, as áreas de atuação dos CRSTs não coincidem com as Regionais de Saúde; e) existe o despreparo dos profissionais de saúde que atuam na rede de serviços para lidar com os riscos e agravos à saúde, relacionados com o trabalho e definir os encaminhamentos médicos e administrativos adequados; f) que o controle social está fragilizado, em decorrência das mudanças na organização sindical e do grande número de trabalhadores no mercado de trabalho formal, que ainda não se organizaram para participar dos fóruns sociais; g) há desvio dos recursos

destinados à implantação da RENAST para cobrir outras necessidades no âmbito do sistema de saúde; h) que apesar dos avanços regionais, ainda se observa o predomínio da assistência em detrimento das ações de vigilância, prejudicando a integralidade das ações; i) que as ações intersetoriais ainda são tímidas e localizadas.

Ainda assim, após mais de 20 anos da regulamentação da atribuição constitucional da atenção integral à saúde dos trabalhadores pela Lei Orgânica da Saúde 8080/90 e das experiências implementadas na rede pública de serviços de saúde, pode-se dizer que o SUS ainda não incorporou de forma efetiva, em suas concepções os paradigmas e as ações, o lugar que o “trabalho” ocupa na vida dos indivíduos e as suas relações com o espaço sócio ambiental.

Em outras palavras, ainda é frágil o papel do trabalho na determinação do processo saúde-adoecimento-cuidado dos trabalhadores diretamente envolvidos nas atividades produtivas, da população em geral e nos impactos ambientais que essas atividades produzem (HOEFEL e DIAS, 2005).

2.3. A POLÍTICA NACIONAL DE SAÚDE DO TRABALHADOR

A publicação da Política Nacional de Segurança e Saúde no Trabalho (PNSST), pelo Decreto Presidencial n.7.602, de 07 de novembro de 2011, pode ser considerada um marco histórico na abordagem das relações entre trabalho, saúde e doença e no cuidado à saúde dos trabalhadores no Brasil (BRASIL, 2011).

Ela busca superar a fragmentação e superposição das ações desenvolvidas pelo governo, por meio de articulações das ações governamentais, com participação voluntária das organizações representativas de trabalhadores e empregadores (BRASIL, 2011).

A PNSST tem como princípios norteadores a universalidade, o diálogo social e a precedência das ações de promoção, proteção e prevenção sobre as de assistência e reabilitação, com objetivo de promover a saúde e a melhoria de qualidade de vida do trabalhador e a prevenção de acidentes e danos à

saúde relacionados ao trabalho ou que ocorram no curso dele. Entre os aspectos positivos, explicitados no documento, destaca-se o conceito de atenção integral, que se aproxima da proposta historicamente construída pelo movimento da Saúde do Trabalhador (BRASIL, 2012).

A integralidade da atenção pressupõe a indissociabilidade das ações de promoção de ambientes e processos de trabalho saudáveis, a proteção da saúde e prevenção de agravos e do adoecimento, a vigilância de ambientes, processos e agravos relacionados ao trabalho e ações assistenciais, que incluam a reabilitação física e psicossocial, em nível individual e coletivo, considerando os aspectos biológicos, sociopolíticos e culturais envolvidos (DIAS, 2013, p.29)

O documento ainda prevê que a política deve atender a todos os trabalhadores, independentemente de sua localização (urbana ou rural), de sua forma de inserção no mercado de trabalho (formal ou informal) e de seu vínculo empregatício (público ou privado, assalariado, autônomo, avulso, temporário, cooperativados, aprendiz, estagiário, doméstico, aposentado ou desempregado).

A Portaria Nº 1.823, de 23 de agosto de 2012, institui a Política Nacional de Saúde do Trabalhador e da Trabalhadora (PNSTT), a qual surge para consolidar e legitimar o que vem sendo construído, ela explicita as ações a serem desenvolvidas pela rede SUS e reitera a indissociabilidade das práticas preventivas e curativas, a transversalidade das ações e seu caráter transdisciplinar e interinstitucional, em sintonia com as mudanças nos processos produtivos e com participação dos trabalhadores como sujeitos das ações de saúde (BRASIL, 2012).

Entre os objetivos da Política ressalta-se: a) o de fortalecer a Vigilância em [Saúde do Trabalhador](#), com a identificação das atividades produtivas da população e das situações de risco à saúde; b) análise das necessidades, demandas e problemas de saúde dos trabalhadores; c) intervenção nos processos e ambientes de trabalho; d) produção de tecnologias de intervenção e monitoramento, e controle; e) avaliação da qualidade dos serviços e programas de Saúde do Trabalhador (BRASIL, 2012).

Para promover ambientes e processos de trabalhos saudáveis, o documento prevê a adoção de parâmetros de proteção da saúde dos trabalhadores, identificação e erradicação de situações análogas ao trabalho escravo ou de trabalho infantil. Já nas estratégias definidas no documento da PNSTT, para implantação da atenção integral à Saúde do Trabalhador compreendem (BRASIL, 2012):

a) a integração da Vigilância em Saúde do Trabalhador com os demais componentes da vigilância em saúde e com a APS; b) a análise do perfil produtivo e da situação de saúde dos trabalhadores; c) a estruturação da Rede de Atenção Integral à Saúde do Trabalhador (RENAST), no contexto da Rede de Atenção à Saúde (RAS); d) o fortalecimento e a ampliação da articulação intersetorial; e) o estímulo à participação da comunidade, dos trabalhadores e do controle social; f) o desenvolvimento e a capacitação de recursos humanos e g) o apoio ao desenvolvimento de estudos e pesquisas. (DIAS, 2013, p.30)

Deve ser garantido também o acesso do trabalhador à [Rede de Atenção à Saúde do SUS](#), desde a atenção primária em saúde, passando pela atenção especializada, incluindo serviços de reabilitação, atenção pré-hospitalar de urgência e emergência, rede de laboratórios e de serviços de apoio diagnóstico, e assistência farmacêutica.

2.4. A SAÚDE DO TRABALHADOR NA ATENÇÃO BÁSICA

Nos termos da política nacional recentemente definida, as ações de Saúde do Trabalhador na rede de serviços, devem ser assumidas por todo o sistema, tendo como porta de entrada a rede básica de saúde e como retaguarda técnica os Centros de Referência em Saúde do Trabalhador e os níveis mais complexos desse Sistema.

De certo, a Lei Orgânica da Saúde (Lei Federal 8080/90), que regulamentou as competências no campo da Saúde do Trabalhador, considera o trabalho como importante fator determinante/condicionante da saúde.

O campo Saúde do Trabalhador é definido, no artigo 6º da Lei nº 8.080/90 como o

[...] conjunto de atividades que se destina, através de ações de vigilância epidemiológica e sanitária, à promoção e proteção dos trabalhadores, assim como visa à recuperação e reabilitação da saúde dos trabalhadores submetidos aos riscos e agravos advindos das condições de trabalho (BRASIL, 2012, p.111).

Tudo isto é considerado como atribuição do SUS. De acordo com o princípio da universalidade, trabalhadores são todos os homens e mulheres que exercem atividades para seu próprio sustento e/ou de seus dependentes, qualquer que seja a forma de inserção no mercado de trabalho, nos setores formal e informal da economia (BRASIL, 2004).

Portanto, o parágrafo 3º do o art. 6º determina que a realização das ações de Saúde do Trabalhador siga os princípios do SUS. O princípio da universalidade pressupõe a responsabilidade do SUS sobre todos os trabalhadores, independentemente de seu grau de inserção na economia ou tipo de vínculo trabalhista.

Segundo Dias e Hoefel (2005), a atenção primária é a principal referência para o reordenamento da atenção à saúde, constitui-se a porta de entrada dos serviços de saúde e apresenta-se como a melhor estratégia para otimizar a saúde da população e minimizar as desigualdades entre os grupos populacionais, de modo a alcançar a equidade.

Da mesma forma, ela propicia atenção qualificada e com resolutividade, coordena ou integra a referência a níveis mais complexos. É organizada a partir de uma base territorial e critérios epidemiológicos, priorizando os problemas mais comuns em uma comunidade, oferecendo serviços de promoção, prevenção, cura e reabilitação, visando maximizar a saúde e o bem-estar das pessoas.

Por ser porta de entrada do SUS, reforça-se neste setor o papel da atenção primária no acolhimento dos trabalhadores, a investigação do processo de trabalho como fator determinante do processo saúde-doença-cuidado, bem como a avaliação e manejo das situações de risco

no trabalho, incorporando o saber do trabalhador, sob o controle social, ações efetivas da atenção primária.

Segundo a Política Nacional de Atenção Básica, esta se caracteriza por um conjunto de ações de saúde, no âmbito individual e coletivo, que abrange a promoção e a proteção da saúde, a prevenção de agravos, o diagnóstico, o tratamento, a reabilitação, a redução de danos e a manutenção da saúde com o objetivo de desenvolver uma atenção integral que impacte na situação de saúde e autonomia das pessoas e nos determinantes e condicionantes de saúde das coletividades.

Contudo, tal política é desenvolvida por meio do exercício de práticas de cuidado e gestão, democráticas e participativas, sob forma de trabalho em equipe, dirigidas a populações de territórios definidos, pelas quais assume a responsabilidade sanitária, considerando a dinamicidade existente no território em que vivem essas populações.

Ainda assim, utilizam-se, neste setor, tecnologias de cuidado complexas e variadas que devem auxiliar no manejo das demandas e necessidades de saúde de maior frequência e relevância em seu território, “ observando critérios de risco, vulnerabilidade, resiliência e o imperativo ético de que toda demanda, necessidade de saúde ou sofrimento devem ser acolhidos” (BRASIL, 2012, p.19).

Logo, a Atenção Básica apresenta limitações para desenvolver estas ações de atenção integral à Saúde do Trabalhador, necessitando de apoio permanente do Centro de Referência em Saúde do Trabalhador (CEREST). Estes Centros são instâncias que são especializadas, com caráter de referência secundária para a rede básica e que buscam incorporar maior densidade tecnológica em seu quadro de profissionais, de apoio diagnóstico e de vigilância (LACAZ, 1996).

Faz-se mister discutir o papel dessas instâncias, pois elas não se tornaram referência, uma vez que a rede do SUS ficou alheia à problemática da saúde-adoecimento-cuidado relacionada ao trabalho e, por priorizarem a assistência, apresentam um impacto pequeno na intervenção sobre os ambientes e processos de trabalho nocivos à saúde (LACAZ, MACHADO, PORTO, 2002).

Para contribuir para este debate, o presente estudo analisa a Atenção Básica como principal referência para estruturação da atenção integral à Saúde do Trabalhador prescrita na PNSTT, considerando o seu papel ordenador e coordenador que lhe é atribuído, bem como avalia também a importância de se considerar as relações produção-consumo, ambiente e saúde como determinantes do processo de saúde-adoecimento-cuidado dos trabalhadores.

Segundo Barbara Starfield (2002), a APS é o primeiro contato da assistência continuada centrada na pessoa, de forma a satisfazer suas necessidades de saúde, que só se referindo aos casos muito incomuns que exigem atuação mais especializada. A APS coordena, ainda, os cuidados quando as pessoas recebem assistência em outros níveis de atenção.

Como já foi dito anteriormente, Starfield sugere os seguintes atributos para as práticas da atenção primária: primeiro contato, longitudinalidade, integralidade e coordenação. Em revisão bibliográfica conduzida por Mendes (2009), esses atributos podem ser interpretados da seguinte maneira:

O primeiro contacto implica a acessibilidade e o uso do serviço para cada novo problema ou novo episódio de um problema para os quais se procura o cuidado. A longitudinalidade requer a existência do aporte regular de cuidados pela equipe de saúde e seu uso consistente ao longo do tempo, num ambiente de relação colaborativa e humanizada entre equipe, pessoa usuária e família. A integralidade supõe a prestação, pela equipe de saúde, de um conjunto de serviços que atendam às necessidades mais comuns da população adscrita, a responsabilização pela oferta de serviços em outros pontos de atenção à saúde e o reconhecimento adequado dos problemas biológicos, psicológicos e sociais que causam as doenças. A coordenação implica a capacidade de garantir a continuidade da atenção, através da equipe de saúde, com o reconhecimento dos problemas que requerem seguimento constante. (MENDES, 2009, p. 57-58).

Em relação aos trabalhadores, há de se priorizar pessoas e grupos em situação de maior vulnerabilidade, como aqueles inseridos em atividades ou em relações informais e precárias de trabalho, em atividades de maior risco para a saúde, submetidos a formas nocivas de discriminação, ou ao trabalho infantil, na perspectiva de superar desigualdades sociais e de saúde e de buscar a equidade na atenção (BRASIL, 2012, p.3).

Assim, as ações de Saúde do Trabalhador devem ser incluídas formalmente na rede de atenção básica. Ampliando desta forma a assistência já ofertada aos trabalhadores, na medida em que passa a olhá-los como sujeitos de adoecimento específico que exige estratégias também específicas de promoção, proteção e recuperação da saúde.

Nesta perspectiva, há de se valorizar outro conceito de referência na APS: o território. Tal localidade permite a delimitação e caracterização da população e de seus problemas de saúde, a criação de vínculo e a avaliação do impacto das ações. Também facilita o reconhecimento e/ou a identificação de situações de risco à saúde, originários nos processos produtivos e em situações de trabalho (DIAS E SILVA, 2013).

Por outro lado, a identificação dos processos produtivos instalados no território é uma das atividades prioritárias para se atuar na atenção integral à Saúde do Trabalhador, pois permite inferir alguns fatores organizacionais e ambientais associados às atividades produtivas, que influenciam no processo de adoecimentos. Estas informações fazem parte de um diagnóstico em Saúde do Trabalhador (DIAS E SILVA, 2013).

Certamente, o mapeamento dos processos produtivos é essencial para o planejamento e a execução de ações pelas equipes, considerando como já dito anteriormente, que as atividades produtivas interferem na condição de vida e saúde.

A APS também tem investido na realização de ações com predominância de capacitações, destinadas a sensibilizar os profissionais sobre as questões de saúde relacionadas ao trabalho, fornecer instrumentos para a investigação e notificação de acidentes graves, fatais e com crianças e adolescentes, as intoxicações por agrotóxicos, qualificar a assistência aos trabalhadores portadores de agravos relacionados ao trabalho, incluindo a discussão dos protocolos e a orientação sobre questões trabalhistas e previdenciárias e o preparo dos Agentes Comunitários de Saúde para a realização do mapeamento das atividades produtivas (DIAS E SILVA, 2013).

Sem dúvida, a ação de atenção primária requer, ainda, maior enfoque da promoção da saúde, no que diz respeito à concretização da intersetorialidade

em suas práticas, buscando um maior diálogo com organizações sociais e governamentais.

Percebe-se que essa atribuição veio como ganho para os trabalhadores que, na grande maioria, procuram a Unidade de Saúde para seu atendimento, por tê-la como referência em seu território. Assim, a equipe deve garantir o acesso a uma atenção qualificada para estabelecer o nexo causal entre o quadro de morbimortalidade, verificado no âmbito dos processos de trabalho de um determinado território.

Assim, ao se pensar em desenvolver ou fomentar ações de Saúde do Trabalhador na APS são necessárias mudanças nos processos de trabalho das equipes e sólido investimento na educação permanente e no suporte técnico das ações. Outra questão a ser enfrentada é o fortalecimento dos mecanismos de participação dos trabalhadores, particularmente do setor informal de trabalho (DIAS E SILVA, 2013).

Finalizando essas reflexões sobre a importância e as possibilidades das ações de Saúde do Trabalhador na APS, pode-se dizer que essas são possíveis e já existem, apesar de assistemáticas e descontínuas. Para inserir as ações de vigilância nas práticas cotidianas das equipes de saúde de Atenção Básica/ Saúde da Família, os profissionais necessitam desenvolver habilidades, utilizar as ferramentas de investigação, registro, análise, programação e planejamento de modo a organizar ações previstas e de atenção à demanda espontânea a fim de mudar a qualidade de vida das pessoas do território onde atuam (DIAS E SILVA, 2013, p. 124).

Entre as dificuldades a serem superadas para sua ampliação e real institucionalização nas práticas cotidianas das equipes, a mais urgente a ser equacionada se refere à sobrecarga de trabalho das equipes submetidas a exigências de produzir um conjunto de ações prescritas, às quais devem responder para garantir o cumprimento das metas estabelecidas (CHIAVEGATTO, 2010; DIAS, 2010).

Neste sentido, a consolidação do cuidado integral à saúde dos trabalhadores na APS requer algumas ações, entre elas a incorporação, no cotidiano das equipes, do conceito de que os processos produtivos

desenvolvidos no território e as suas relações com o ambiente e a saúde das pessoas determinam necessidades de saúde que devem ser abordadas por meio da articulação de ações intra e intersetoriais, de processos sólidos de educação permanente, além da adoção da metodologia de apoio matricial das ações, conforme previsto na Portaria nº 3.252/09 (BRASIL, 2009).

Por fim, faz-se mister ressaltar a importância do apoio matricial do trabalho das equipes da APS, cabendo ao CEREST o suporte técnico e pedagógico por meio de oficinas de capacitação e educação permanente, a fim de potencializar e promover habilidades de gestão do cuidado com os usuários trabalhadores.

2.5. VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO TRABALHADOR

A Instrução Normativa de Vigilância em Saúde do Trabalhador, publicada pela Portaria nº 3.120/98 do Ministério da Saúde, passou a regular a VISAT no âmbito do SUS e estabeleceu que, embora preservando suas peculiaridades regionais, tais ações deveriam manter linhas mestras de atuação compatibilizando instrumentos, bancos de informações e intercâmbio de experiências. Segundo essa Portaria, para as ações de VISAT, devem ser desenvolvidos mecanismos de análise e intervenção sobre os processos e os ambientes de trabalho. A Portaria conceitua a VISAT como:

[...] uma atuação contínua e sistemática ao longo do tempo, no sentido de detectar, conhecer, pesquisar e analisar os fatores determinantes e condicionantes dos agravos à saúde relacionados aos processos e ambientes de trabalho, em seus aspectos tecnológico, social, organizacional e epidemiológico com a finalidade de planejar, executar e avaliar intervenções sobre esses aspectos, de forma a eliminá-los ou controlá-los. (BRASIL, 1998, p.32)

Segundo as Portarias nº 3.120/98 GM/MS (BRASIL, 1998) e nº 3.252/09 GM/MS (BRASIL, 2009), a VISAT não é uma área desvinculada ou independente da Vigilância em Saúde como um todo, mas, ao contrário, ela acrescenta ao conjunto de ações da Vigilância em Saúde, estratégias de

produção de conhecimentos e mecanismos de intervenção sobre os processos de produção, aproximando as práticas sanitárias da relação entre o trabalho e a saúde (BRASIL, 1998; 2009).

O fortalecimento da Vigilância em Saúde do Trabalhador e a integração com os demais componentes da Vigilância em Saúde são destacados nos objetivos da PNST-SUS, em sintonia com a portaria 3.252/2009. O decreto prescreve que as ações de Vigilância em Saúde são condições essenciais para que se institua uma região de saúde e orienta que sejam, também, desenvolvidas no âmbito da APS. (BRASIL, 2009, p.3).

A VISAT surge com o intuito de promover e proteger a Saúde do Trabalhador, evitando situações e condições geradoras de sofrimento, de doenças profissionais e de acidentes de trabalho. Para alcançar tais objetivos, deve-se incorporar sistemática e criteriosa avaliação e planejamento da demanda e do alcance das ações desenvolvidas (MACHADO, 1996; VILELA, 2003).

A Vigilância em Saúde do Trabalhador compreende um conjunto de ações e práticas que incluem o monitoramento dos expostos e dos agravos à saúde relacionados ao trabalho, bem como a supervisão de fatores de risco presentes nos ambientes e processos de trabalho com a finalidade de avaliar e inspecionar a situação de saúde e articular as ações de promoção e de proteção da saúde (BRASIL, 2012).

Segundo Dias, Silva e Almeida (2012), são exemplos de ações da VISAT que devem ser incorporadas de forma organizada e sistemática no processo de trabalho das equipes da APS: o mapeamento dos processos produtivos do território e identificação dos riscos e perigos à saúde associados às atividades laborais, a identificação do perfil ocupacional e dos trabalhadores mais vulneráveis (desempregados, trabalho infantil, trabalho domiciliar, dentre outros), a notificação de agravos relacionados ao Sistema Nacional de Notificações (SINAN), a análise da situação saúde da população trabalhadora que vive no território de abrangência das equipes e definição de ações prioritárias e a articulação intra e intersetorial para a vigilância dos processos e ambientes e trabalho.

A atenção especial deve ser dada à vigilância de ambientes de trabalho realizado no domicílio e no peridomicílio, buscando conhecer como as atividades produtivas desenvolvidas impactam a saúde dos trabalhadores e suas famílias e propor ações de intervenção, com a participação dos trabalhadores (DIAS, SILVA, 2013).

Porto, Lacaz e Machado (2003) apontam, entre as dificuldades para garantir a participação ativa dos trabalhadores nas intervenções, as encontradas nas ações que envolvem pequenas e médias empresas e o setor informal da economia. Nesse último, a precariedade de vínculos dificulta a presença de interlocutores e a própria configuração de redes de apoio.

Para Santorum (2006), a VISAT deveria poder proporcionar um espaço para a interlocução com os trabalhadores valorizando o olhar deles sobre a atividade que realizam e facilitando-lhes um processo de apropriação de seus saberes e de seu poder de transformação/ação.

2.6. O PERFIL PRODUTIVO OCUPACIONAL FAMILIAR

Na contemporaneidade os modos produtivos estão cada vez mais sendo reestruturados e estes definem o novo perfil dos trabalhadores com relação aos processos de adoecimento, sendo estes os novos desafios do Sistema Único de Saúde.

Dentre as características dos processos produtivos contemporâneos, o crescimento do trabalho informal e domiciliado e o aumento da vulnerabilidade, da desproteção social e da degradação ambiental podem ser encontrados mesmo nas cadeias produtivas mais complexas de setores da economia considerados mais fortes e/ou tradicionais, como, por exemplo, a indústria metalúrgica, do vestuário, calçadista, de alimentos, entre outras. Etapas ou parcelas do processo de trabalho são desenvolvidas em pequenas unidades, por vezes no próprio domicílio do trabalhador. Geralmente são atividades que agregam menos valor e/ou consideradas mais "sujas", arriscadas e perigosas para a saúde (ANTUNES; NEHMY; DIAS, apud DIAS E SILVA 2010).

Os trabalhos informais ficam, nesse sentido, à margem da inspeção e da regulamentação do Estado, contribuindo também para a degradação ambiental, além de danos à saúde.

Assim, o termo “Setor Informal” foi criado pela Organização Internacional do Trabalho (OIT) e utilizado pela primeira vez em 1972, nos relatórios sobre Gana e Quênia, elaborados no âmbito do Programa Mundial de Empregos. Esse relatório descrevia que nessas localidades, mais grave do que o problema do desemprego, era a existência de um grande número de “trabalhadores pobres”, ocupados em produzir bens e serviços sem que suas atividades estivessem reconhecidas, registradas, protegidas ou regulamentadas pelas autoridades públicas.

O IBGE considera para delimitação do setor informal da economia os seguintes critérios:

(...) a delimitação do setor informal se dá baseada no conceito de unidade econômica, entendida como unidade de produção, e, não, o trabalhador individual ou a ocupação por ele exercida; Fazem parte do setor informal as unidades econômicas não agrícolas que produzem bens e serviços para geração de rendimento para as pessoas envolvidas, sendo excluídas aquelas unidades engajadas apenas na produção de bens e serviços para autoconsumo;

As unidades do setor informal caracterizam-se pela produção em pequena escala, baixo nível de organização e pela quase inexistência de separação entre capital e trabalho, enquanto fatores de produção;

A ausência de registro não foi utilizada como critério para definição de setor informal, na medida em que a base do conceito de informalidade utilizado considera o modo de organização e funcionamento da unidade econômica, e não seu status legal ou a relação que mantém com as autoridades públicas;

A definição de unidade econômica informal não depende do local onde é desenvolvida a atividade produtiva, da utilização de ativos fixos da duração das atividades das empresas (permanente, sazonal ou ocasional) e do fato de tratar-se da atividade principal ou secundária do proprietário da empresa." (RENAST, 2016, p.03).

Nesse cenário, para que o SUS seja capaz de prover a atenção integral à saúde dos trabalhadores, é essencial que cada ponto de atenção do SUS e os setores responsáveis pela Vigilância em Saúde incorporem, de forma sistemática, a contribuição do trabalho enquanto determinante do processo saúde-adoecimento-cuidado das pessoas e da qualidade ambiental. A

operacionalização da atenção integral depende da articulação entre diversos saberes, práticas e responsabilidades, da atuação inter e transdisciplinar e de sólida articulação intra e intersetorial. (DIAS E SILVA 2010).

A partir de uma organização em toda a rede de atenção à saúde é possível se garantir a solução de problemas relacionados ao processo de adoecimento dos trabalhadores informais e formais. A APS tem o papel de coordenar este cuidado em todos os níveis do SUS.

A atenção integral à saúde dos trabalhadores pode se beneficiar dessas características da APS, que favorecem: a) a oferta de serviços de saúde nos municípios, facilitando o acesso dos usuários-trabalhadores e a identificação de demandas e problemas de saúde relacionados às atividades produtivas desenvolvidas no território; b) o estabelecimento de vínculos e o fortalecimento de relações de confiança entre a equipe de saúde e a população, mediados pelo Agente Comunitário de Saúde; c) as ações de caráter multidisciplinar; a geração de informações de saúde mais fidedignas; d) o estímulo à participação dos trabalhadores que estão organizados em formas menos tradicionais, que não os sindicatos. (DIAS E SILVA 2010).

A PNSTT prevê a implementação de ações individuais e coletivas além da “promoção, de prevenção, de vigilância dos ambientes, processos e atividades de trabalho, e de intervenção sobre os fatores determinantes da saúde dos trabalhadores” (BRASIL, 2012, p.2).

Esta portaria estabelece que nas ações de intervenção na Saúde do Trabalhador, deve-se priorizar o levantamento de atividades produtivas, observando-se os problemas em seus territórios.

[...] considerar que os territórios são espaços sócio-políticos dinâmicos, com trabalhadores residentes e não residentes, executando atividades produtivas e de trabalho em locais públicos e privados, peri e intra-domiciliares (BRASIL, 2012, p. 19).

As equipes de saúde da família ao realizar o levantamento do perfil ocupacional em determinado território não deve apenas considerar o critério

domiciliar, mas deve levar em consideração os trabalhadores que não residem, mas que trabalham nesta área de abrangência.

A utilização do critério de territorialização para a organização do processo de trabalho e o planejamento das ações de saúde da APS também enseja a operacionalização de práticas de Vigilância em Saúde no âmbito da APS, na medida em que a equipe de saúde consegue compreender o território em sua riqueza e complexidade e seus contextos de uso (DIAS E SILVA, 2013).

A contribuição das equipes de APS para a atenção integral à saúde dos usuários-trabalhadores, no exercício da responsabilidade sanitária sobre o território, pressupõe o conhecimento sobre as atividades produtivas, o perfil epidemiológico e as situações de vulnerabilidade da população e a sua incorporação no planejamento das ações.

Assim, na implementação em ações da saúde do trabalhador na atenção primária é essencial que se realize antes um diagnóstico local, buscando conhecer as atividades produtivas, quem são os trabalhadores, bem como os processos de adoecimento desta população. Tudo isto permite o conhecimento dos riscos e perigos para a saúde.

Já a identificação dos processos produtivos instalados no território é realizada no momento do Mapeamento da Área de Atuação da equipe de saúde, em que os ACS identificam no mapa hospitais, escolas, igrejas, postos policiais, campo de futebol, quadra de esporte, rios, locais propensos a inundações, depósitos onde são despejados lixo de fábricas, comércio em geral, entre outros. O ato de mapear os processos produtivos é essencial para o planejamento e a execução das ações de saúde pelas equipes, considerando que as atividades produtivas interferem nas condições de vida e saúde das pessoas. Esse mapeamento permite inferir o perfil de adoecimento, bem como os possíveis riscos e perigos para a saúde dos trabalhadores, da população e também para o ambiente, advindos dessas atividades (DIAS E SILVA, 2013, p.172).

Segundo a determinação de ações para o Mapeamento da Área de Atuação dos agentes e demais profissionais do Programa de Saúde da Família, deve-se conhecer os caminhos mais fáceis para se chegar aos locais

necessários; identificar as barreiras geográficas que dificultam o caminho das pessoas até os serviços de saúde.

Além disso, conhecer a realidade da comunidade e planejar como resolver os problemas de saúde com mais eficácia; planejar as visitas domiciliares; identificar as micro áreas de risco; dentre outras questões. O mapa consiste em uma ferramenta indispensável para o trabalho da equipe de saúde, devendo representar o desenho de todo o território de atuação (BRASIL, 2009).

Por fim, faz-se importante que a atenção primária busque apoio técnico do CEREST para que as ações sejam executadas com eficácia, a partir deste mapeamento e do conhecimento dos processos produtivos da população adstrita pela equipe de saúde.

2.7. FORTALECIMENTOS DA VIGILÂNCIA EM SAÚDE – ESTRATÉGIAS DE AÇÕES DE VIGILÂNCIA À SAÚDE DO TRABALHADOR NA ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE

Em conformidade com a Política Nacional de Atenção Básica espera-se que os serviços da APS coordenem a integralidade em seus vários aspectos, dentre eles a articulação das ações de promoção à saúde, prevenção de agravos, vigilância em saúde, tratamento e reabilitação (BRASIL, 2011).

Porém, no que diz a respeito às ações de vigilância em saúde, o processo de descentralização vem ocorrendo muito lentamente, com propostas de políticas de saúde nos territórios locais muitas vezes desalinhadas das necessidades dos usuários.

Em contrapartida, para que pudesse superar este problema, fez-se necessário o desenvolvimento de estratégias que viabilizassem a implantação de um Sistema de Vigilância em Saúde, nela contida a Vigilância em Saúde do Trabalhador, que esteja próxima do cidadão e que garanta que as políticas de saúde estejam coerentes com as necessidades locais (MINAS GERAIS, 2012).

Assim, a estratégia utilizada pela Subsecretaria de Vigilância e Proteção à Saúde da SES-MG foi a organização do projeto de Fortalecimento da

Vigilância em Saúde, que possui como objetivo estratégico a implantação de um sistema regionalizado de Vigilância em Saúde para que seja efetivada a descentralização das ações da área para todos os municípios mineiros (DIAS; SILVA, 2013).

De fato, esse projeto foi publicado pela resolução SES n.3.049, de 7 de dezembro de 2011, e posteriormente pela Resolução n. 3.152, de fevereiro de 2012, a qual aprovou o edital de convocação para adesão dos municípios ao projeto. Por meio deste edital a SES-MG pactuará com os municípios ações de vigilância em saúde divididas em três elencos de acordo com o grau de complexidade das ações e repassará incentivo financeiro, que estará disponível para os municípios mediante a assinatura do Termo de Compromisso e o comprometimento do gestor municipal na execução de um elenco mínimo de ações.

Ainda mais que essas ações deverão compor permanentemente o escopo da Vigilância em Saúde local para a continuidade do pagamento do presente incentivo, que deverá ser utilizado exclusivamente para as ações de VS.

As ações de Saúde do Trabalhador foram definidas levando-se em consideração a necessidade de se obterem informações sobre o perfil produtivo do Município, de se complementarem os dados da ficha de investigação dos Acidentes de Trabalho Graves (ATG) e de se investigarem os casos de acidentes com produtos perigosos (Quadro 1). Para cada um dos três elencos foi definida uma meta percentual para que a ação seja considerada realizada (DIAS; SILVA, 2013).

Sem dúvida que para tornar o Projeto de Fortalecimento da Vigilância em Saúde factível, foi elaborado um Instrutivo para subsidiar o município na realização de ações. Desta forma, cada ação possui um roteiro explicativo que orienta os profissionais do município para o cumprimento da meta. A equipe técnica da Diretoria de Saúde do Trabalhador – DSAT elaborou roteiros para as três ações de Saúde do Trabalhador descritas no projeto.

O relatório de Análise de Acidentes de Trabalho Graves (ATG) diz respeito à investigação dos Acidentes de Trabalho Graves notificados no SINAN-NET e tem como objetivo complementar as informações da ficha de

investigação do SINAN-NET dos Acidentes de Trabalho Graves (ATG) e subsidiar a área técnica a desencadear ações de educação, prevenção e vigilância dentro ou fora do ambiente de trabalho a partir dos riscos identificados. (DIAS; SILVA, 2013).

Para a ação de investigar os casos de acidentes com produtos perigosos atendidos no município, foi elaborado um roteiro instrutivo com o objetivo de subsidiar tecnicamente a Referência Técnica Municipal em Saúde do Trabalhador (RTM-ST) na investigação dos acidentes de transporte de carga envolvendo produtos perigosos notificados pelo Núcleo de Emergência Ambiental/Secretaria de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (NEA/SEMAD). A RTM/ST deverá realizar a investigação dos casos de acidentes com produtos perigosos atendidos no município utilizando a ficha de notificação de intoxicação exógena e/ou a de acidente de trabalho grave do SINAN-NET (DIAS; SILVA, 2013).

Quadro 1. Ações da área de Saúde do Trabalhador contempladas nos elencos do Projeto de Fortalecimento da Vigilância em Saúde.

Ação	Descrição da Ação	Meta/Elenco I	Meta/Elenco II	Meta/Elenco III
Realizar o diagnóstico do perfil produtivo do município (mercado formal e informal) nas Unidades de Saúde que tenham Equipe de Saúde da Família (ESF) e Programa de Agente Comunitário da Saúde (PACS)	Identificar as atividades produtivas existentes na área de abrangência de cada ESF e PACS, tanto de estabelecimentos quanto de atividades produtivas (realizadas dentro e fora do domicílio) e identificar a ocupação dos membros das famílias de cada ESF e PACS. Se existir atividade produtiva realizada no domicílio registrar no campo Observações da Ficha de cadastro das famílias (Ficha A).	Considera-se ação realizada: o município que fizer o diagnóstico do perfil produtivo (mercado formal e informal) em 50% das Unidades de Saúde com ESF e PACS *	Considera-se ação realizada: o município que realizar o diagnóstico do perfil produtivo (mercado formal e informal) em 75% das Unidades de Saúde com ESF e PACS *	Considera-se ação realizada: o município que realizar o diagnóstico do perfil produtivo (mercado formal e informal) em 100% das Unidades de Saúde com ESF e PACS *
Investigar os Acidentes de Trabalho Grave notificados no SINAN-NET	Realizar investigação dos acidentes de trabalho grave notificados no SINAN-NET, tanto de trabalhadores formais,	Considera-se ação realizada: o município que realizar a investigação de 10% dos	Considera-se ação realizada: o município que realizar a investigação de 20% dos	Considera-se ação realizada: o município que realizar a investigação de 30% dos

	quanto dos informais, independente do ambiente e/ou circunstância a que o trabalhador esteja envolvido.	Acidentes de Trabalho Grave notificados no SINAN.	Acidentes de Trabalho Grave notificados no SINAN.	Acidentes de Trabalho Grave notificados no SINAN.
Investigar os casos de Acidentes com produtos perigosos atendidos no município	Investigar os acidentes de transporte de carga envolvendo produtos perigosos, informados pelo Núcleo de Emergência Ambiental/Secretaria de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (NEA/SEMAD).	Considera-se ação realizada: o município que realizar a investigação de 70% dos casos de Acidentes com produtos perigosos atendidos no município	Considera-se ação realizada: o município que realizar a investigação de 80% dos casos de Acidentes com produtos perigosos atendidos no município	Considera-se ação realizada: o município que realizar a investigação de 90% dos casos de Acidentes com produtos perigosos atendidos no município.

Fonte: Adaptado da Resolução nº 3152, de fevereiro de 2012.

Essa ação se faz necessária devido à complexidade dos danos que este tipo de acidente pode causar aos trabalhadores envolvidos no processo produtivo de produto químico perigoso e aos trabalhadores envolvidos na assistência. (DIAS; SILVA, 2013).

Segundo Dias e Silva (2013) para realizar o diagnóstico do perfil produtivo do município (mercado formal e informal) nas Unidades de Saúde que tenham Equipe de Saúde da Família (ESF) e Programa de Agente Comunitário da Saúde (PACS), consideram-se duas subações: a) Identificar a ocupação dos membros das famílias de cada ESF e PACS; b) Identificar as atividades produtivas existentes na área de abrangência de cada ESF e PACS, tanto de estabelecimentos quanto de atividades produtivas realizadas dentro e fora do domicílio.

Em suma, o objetivo desta ação é identificar, através da ocupação dos usuários e da atividade econômica dos estabelecimentos comerciais (dentro ou fora do domicílio, formais ou informais) de cada território de ESF e PACS, os possíveis riscos relacionados aos trabalhos a que a população da área de abrangência das unidades está exposta.

E para esta ação, a Diretoria de Saúde do Trabalhador elaborou um instrumento complementar à Ficha A, com informações mínimas necessárias sobre a Saúde do Trabalhador, e uma ficha de levantamento de

estabelecimentos comerciais, visando à padronização de informações e ao monitoramento dos dados referentes ao perfil ocupacional e de atividades produtivas nas áreas de abrangência das ESF e PACS (DIAS; SILVA, 2013).

Já o instrumento de levantamento de atividades produtivas tem como base a Classificação Nacional de Atividades Econômicas (CNAE) e permitirá a caracterização das atividades econômicas no território de análise (DIAS; SILVA, 2013).

Portanto, estas estratégias configuram-se como importante ferramenta norteadora das rotinas e processos de trabalho das áreas de Vigilância Epidemiológica, Sanitária, Ambiental, Promoção da Saúde, Vigilância da Situação de Saúde e Vigilância à Saúde do Trabalhador, na APS. Permite-se, com isto também, se estabelecer o elenco de ações de Saúde do Trabalhador que deverão ser desenvolvidas, definidas a partir do diagnóstico da situação de saúde baseado no perfil produtivo e epidemiológico dos agravos relacionados ao trabalho, inserindo-as nos Planos Municipais e Estaduais de Saúde.

O instrumento de identificação do perfil ocupacional foi elaborado utilizando como parâmetro a Ficha A do Sistema de Informação da Atenção Básica (SIAB), a Classificação Brasileira de Ocupação (CBO), a CBO Domiciliar utilizada pelo IBGE no Censo 2010, além dos instrumentos e relatos de experiências já utilizados por alguns municípios do estado. Isto permitirá a identificação do perfil ocupacional familiar e de cada um de seus integrantes, bem como a identificação de trabalho domiciliar segundo: vínculo, formalização das ocupações, identificação de agricultores familiares, manuseio de produtos químicos, cosméticos e alimentos para comercialização dentro do domicílio (DIAS; SILVA, 2013, p. 128).

Ressalta-se que o mapeamento das atividades produtivas presentes no território de atuação dos profissionais das unidades básicas de saúde seja essencial para o diagnóstico situacional, que vai embasar o Plano de Ação da equipe e assim, o planejamento de ações de Saúde do Trabalhador.

Assim sendo, o planejamento é essencial para a gestão do SUS, propiciando resposta oportuna e efetiva às demandas e necessidades da população, é um processo contínuo e deve ser feito de acordo com a capacidade instalada do município e necessidades da área de Saúde do Trabalhador. O diagnóstico estratégico situacional permite conhecer quantos

são, quem são, o que fazem e de que adoecem e morrem os trabalhadores. O diagnóstico estratégico situacional entendido como perfil produtivo e epidemiológico subsidia o planejamento das ações em Saúde do Trabalhador do município. (DIAS; SILVA, 2013).

3. PERCURSO METODOLÓGICO

3.1. TIPOS DE ESTUDO

Esta dissertação é um estudo epidemiológico transversal do tipo analítico, quantitativo. No entendimento de Rouquayrol (2003) a pesquisa transversal é um estudo que fornece informações concernentes à necessidade de saúde e são utilizados para o planejamento.

A pesquisa epidemiológica classifica-se em descritiva e analítica. Nas pesquisas descritivas, procura-se estudar a distribuição das doenças num determinado local, realizando a formulação de hipóteses. São usadas, dessa forma, algumas variáveis que podem auxiliar o estudo, tais como: indivíduo (quem?), o local (onde?) e o tempo (quando?).

Por outro lado, Vieira (2015) cita que a obtenção dos dados para o estudo pode ser feita de duas formas: através das fontes primárias e secundárias, cujas informações são coletadas num determinado momento, especificamente, e a partir de uma base ou registro de dados, respectivamente, a fim de se obter as informações desejadas.

Nas pesquisas analíticas, a elucidação dos determinantes da doença e teste de novos resultados e hipóteses formuladas a partir de estudos descritivos é feito. Dentro das pesquisas descritivas e analíticas, ainda, há: estudo transversais ou de prevalência, usados em saúde pública para avaliar e planejar programas de controle de doenças. Mede-se neste tipo de pesquisa a prevalência da doença, os dados são levantados num determinado ponto no tempo, especificamente, para a obtenção de informações desejadas de grandes populações. Ademais, esta forma de estudo é fácil e econômico, com duração de tempo relativamente curta (VIEIRA, 2015, p. 98).

Assim, é por meio dos métodos científicos que os pesquisadores lutam para a solução de problemas, para dar sentido à experiência humana, para compreender as regularidades dos fenômenos e para prever circunstâncias futuras (POLIT & HUNGLER, 1995).

Dessa forma foi feito um estudo, com levantamento de pesquisas e estudo dos relatórios consolidados do perfil ocupacional familiar, cujos objetivos caracterizam um modelo de pesquisa analítica e exploratória com abordagem quantitativa.

3.2. CENÁRIO DO ESTUDO

Atualmente, o município de Uberlândia, em Minas Gerais, tem população estimada de 654.681 habitantes (DATASUS -2014). Uberlândia está dividida em cinco grandes distritos sanitários (Leste, Sul, Norte, Oeste e Central) e a Zona Rural. Sendo o total de 74 Equipes de Saúde da Família da Rede SUS Municipal, urbana e rural, responsáveis por uma cobertura de 43% da população, descrito no quadro 2.

Quadro 2: Distribuição dos Distritos Sanitários segundo números de equipes, números de micro áreas, números de ACS e população - Uberlândia-MG, 2015.

DISTRITO SANITÁRIO	NÚMERO DE EQUIPES	NÚMERO DE MICROÁREAS	NÚMERO DE ACS	POPULAÇÃO
LESTE	14	84	73	54.352
OESTE	22	125	106	81.581
CENTRAL	01	06	06	4.608
NORTE	11	56	55	41.842
SUL	21	124	124	84.572
ZONA RURAL	05	21	19	10.280
TOTAL	74	416	383	277.235

Fonte: SMS/DAIS- Diretoria de Atenção Integral à Saúde-2015

O Distrito Sanitário Sul é constituído por 21 Equipes de Saúde da Família, sendo 124 micro-áreas, 124 agentes comunitários de Saúde, perfazendo uma população de 84.572 habitantes, conforme descrito no quadro 3.

Assim, sintetizou-se no Quadro 3, o universo de Equipes de Saúde da Família no Distrito Sanitário Sul, representando o contexto desse estudo, ou seja, 84.572 habitantes distribuídos em 21 Equipes de Saúde da Família, do município de Uberlândia.

Quadro 3: Distribuição das UBSFs do Distrito Sanitário Sul, segundo nome das equipes, número das áreas, quantidade de micro áreas, população e o número de Agentes Comunitários de Saúde, Uberlândia-MG, 2015.

EQUIPE DE SAÚDE DA FAMÍLIA	NÚMERO DAS ÁREAS	NÚMERO DE MICRO ÁREAS	POPULAÇÃO	NÚMERO DE ACS
UBSF Granada I	20	06	3.514	06
UBSF Granada II	19	06	3.998	06
UBSF Lagoinha I	16	06	3.020	06
UBSF Lagoinha II	17	06	3.079	06
UBSF Santa Luzia	18	06	3.700	06
UBSF Gravatás	45	06	3.878	06
UBSF J. Botânico	46	06	5.316	06
UBSF Aurora	23	06	4.389	06
UBSF Laranjeiras	22	06	3.887	06
UBSF São Jorge I	24	06	3.557	06
UBSF São Jorge II	25	06	3.365	06
UBSF São Jorge III	26	06	4.292	06
UBSF São Jorge IV	29	06	4.065	06
UBSF São Jorge V	47	06	4.379	06
UBSF São Gabriel	30	06	4.002	06
UBSF Campo Alegre	41	06	4.140	06
UBSF Seringueiras I	27	06	4.093	06
UBSF Seringueiras II	28	06	3.998	06
UBSF Shopping Park I	21	06	5.862	06
UBSF Shopping Park II	43	06	6.143	06
UBSF Shopping Park III	44	04	1.895	04
TOTAL	611	124	84.572	124

Fonte: SMS/DAIS- Diretoria de Atenção Integral à Saúde-2015

3.3. POPULAÇÃO/AMOSTRAGEM

O universo de pesquisa foi composto pelos relatórios de consolidado do Perfil Ocupacional Familiar, das famílias cadastradas pela Equipes de Saúde da Família (ESF) e os critérios de inclusão para escolha das 5 equipes, definidas como população amostral, foram:

- a) Equipes de Saúde da Família de um único Distrito Sanitário - o Distrito Sanitário Sul foi escolhido por sorteio;

b) Equipes de Saúde da Família com maior tempo de funcionamento, considerando sua inserção no Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde; sendo que, as Unidades cadastradas na mesma data, usaria o sorteio como critério de desempate. Foram então escolhidas as UBSFs: Lagoinha I, São Jorge II, Santa Luzia, São Gabriel e Seringueira II.

Quadro 4: Distribuição das Unidades Básicas de Saúde, do Distrito Sanitário Sul, segundo data de implantação, população, número de micro áreas e número de Agentes Comunitários de Saúde, Uberlândia-MG, 2015.

EQUIPE DE SAÚDE DA FAMÍLIA	DATA DE IMPLANTAÇÃO	POPULAÇÃO	NÚMERO MICROAREA	NÚMERO DE ACS
Lagoinha	01/01/2003	3.020	6	6
São Jorge II	01/01/2003	3.365	6	6
Santa Luzia	01/01/2003	3.700	6	6
São Gabriel	01/01/2003	4.002	6	6
Seringueira II	01/01/2003	3. 998	6	6

Fonte: SMS/DAIS- Diretoria de Atenção Integral à Saúde-2015.

O contexto territorial escolhido por meio de sorteio, para a realização deste estudo foi a região sul do município de Uberlândia. Buscou-se compreender o predomínio nos territórios de atuação das equipes, os riscos potenciais em relação às atividades produtivas domiciliares frente às ocupações trabalhistas.

Assim, tais atividades produtivas, os riscos para a saúde delas decorrentes, o perfil epidemiológico da população trabalhadora, devem ser consideradas no planejamento das ações de vigilância e assistência à saúde, pelas Unidades de Saúde, com o intuito de se responder às seguintes questões:

a) Quais são as atividades produtivas/econômicas desenvolvidas na região?

b) Quais são os possíveis riscos e perigos à saúde dos trabalhadores relacionados às atividades?

Com base nestas informações, faz-se necessário elaborar coletivamente um adequado planejamento das futuras ações de intervenção em Saúde do Trabalhador.

3.4. COLETA DE DADOS

No presente estudo, foram utilizados dados secundários, repassados pelo Centro de Referência em Saúde do Trabalhador – CEREST Regional, localizado no Município de Uberlândia/MG. Os dados foram coletados através de pesquisa nas fichas do Consolidado do Perfil Ocupacional da ESF/PACS (Anexo 1) referente ao ano de 2013, foram tratadas e analisadas as seguintes variáveis:

- a) Número total de ESF, número total de Famílias cadastradas: número de famílias entrevistadas, número de pessoas cadastradas em ESF, número de pessoas em idade ativa.
- b) Número de pessoas: em atividade domiciliar formal, em atividade domiciliar informal, em manipulação de produto químico no domicílio, em manipulação de produto de beleza no domicílio, em manipulação de alimentos no domicílio, com plantações no terreno do domicílio para consumo próprio, com plantações no terreno do domicílio para comercialização.
- c) Principais atividades domiciliares por equipe, listando a quantidade e nome da atividade domiciliar em ordem decrescente.
- d) Dados Individuais dos Trabalhadores - por equipe, lista das principais ocupações do território, lista da quantidade e nome da ocupação em ordem decrescente, de acordo com o consolidado por equipe.

As definições de todas as categorias dessas variáveis encontram-se disponíveis no “Instrutivo para Execução e Avaliação das Ações de Vigilância em Saúde - Projeto Fortalecimento da Vigilância em Saúde em Minas Gerais (Resolução SES nº 4.238/2014)”, elaborado pela Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, documento *online* para consulta pública.

As informações obtidas foram introduzidas em um banco de dados construído para consultas imediatas e posteriores, como também para realizar

análise estatística de forma sistematizada. Este banco foi criado no Microsoft Office Excel 2007 a fim de tabular e processar os dados.

Foram agendadas via CEREST, várias reuniões e encontros com a Coordenadora e a profissional responsável, com a finalidade de se conhecer todas as ações de Vigilância em Saúde do Trabalhador, que são executadas em conformidade com a Resolução SES-MG nº 4.238, de 19 de março de 2014, bem como com o Instrutivo para Execução e Avaliação das Ações de Vigilância em Saúde. Tais ações buscam realizar e atualizar o Diagnóstico do Perfil Produtivo do município nas Unidades de Saúde que tenham Equipe de Saúde da Família (ESF) e Programa de Agentes Comunitários de Saúde (PACS).

As visitas para coleta de dados foram realizadas no mês de Junho e Julho de 2016. As informações sobre as atividades presentes no território em estudo foram acessadas através do banco de dados, disponibilizado pelos técnicos do CEREST Regional de Uberlândia para a realização deste mapeamento.

O período de 2013 foi definido pelo fato dos bancos de dados já terem sido alimentados e, portanto, apresentarem maior completude de informações.

Para o levantamento do perfil epidemiológico, o setor de Informação em Saúde da Secretaria Municipal de Saúde disponibilizou os dados relativos às principais doenças, utilizando a Classificação Internacional de Doenças, última versão, o CID -10, do território das cinco UBSF nos anos de 2013 e 2014, que tem como fonte o Sistema de Gestão em Saúde-FASTMEDIC.

3.5. ASPECTOS ÉTICOS

Para a realização desta pesquisa foram utilizados somente dados secundários, sem identificação de usuários das Unidades de Atenção Primária em Saúde. Os dados foram disponibilizados mediante termo de autorização da Secretaria Municipal de Saúde de Uberlândia.

O projeto de pesquisa também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal de Uberlândia, sob o CAAE: 52940115.7.0000.5152, e parecer nº 1.603.397.

Nesta pesquisa, o cuidado se refere a preservar o sigilo e a identificação dos sujeitos das fichas de pesquisa, conforme estabelece a resolução 466/12-CNS. Assim, a pesquisadora se compromete com o sigilo absoluto da identidade dos sujeitos. Todos os profissionais do CEREST e Secretaria Municipal de Saúde que concordaram em participar deste estudo foram informados quanto ao objetivo da pesquisa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados que apresentaremos neste capítulo, compreendem uma análise do levantamento quantitativo realizado no âmbito do CEREST, através dos consolidados. Estes dados, são bastante reveladores sobre o perfil ocupacional dos trabalhadores do universo da pesquisa, nos permitindo fazer a descrição em relação à ocupação e os agravos e riscos decorrentes das atividades. Ressalta-se que, este levantamento quantitativo, juntamente com o estudo teórico foram basilares para a elaboração das questões abordadas em seguida nos resultados/discussões.

Neste trabalho foram utilizados os métodos de estatística descritiva, que são úteis para a apresentação e sintetização dos mesmos. Os resultados foram expressos em tabelas para a representação de variáveis quantitativas, permitindo o entendimento rápido e preciso das informações presentes. As análises estatísticas e as tabelas foram confeccionadas no software computacional Excel 2007 para Windows.

Quadro 5. Distribuição de famílias e pessoas cadastradas nas UBSFs no ano de 2013.

Unidade Básica da Família	Nº de famílias Cadastradas	%	Nº de pessoas cadastradas em ESF	%
UBSF Lagoinha I	1.058	17,81	3.222	17,59
UBSF São Jorge II	1.378	23,20	3.315	18,10
UBSF Santa Lúzia	1.050	17,68	3.853	21,04
UBSF São Gabriel	1.209	20,35	3.869	21,12
UBSF SeringueiraII	1.245	20,96	4.056	22,15
Total	5.940	100	18.315	100

Fonte: Formulário de Consolidado do perfil ocupacional da ESF/PACS, 2013 – CEREST Uberlândia

O Ministério da Saúde recomenda que cada ESF acompanhe entre 600 e 1.000 famílias, não ultrapassando o limite máximo de 4.500 pessoas. Cada equipe de Saúde da Família deve ser responsável por, no máximo, 4.000 pessoas, sendo a média recomendada de 3.000, respeitando critérios de equidade para essa definição. Recomenda-se que o número de pessoas por equipe considere o grau de vulnerabilidade das famílias daquele território,

sendo que, quanto maior for este grau, menor deverá ser a quantidade de pessoas por equipe (BRASIL, 2012).

Conforme a quadro 5, as famílias cadastradas foram maior na UBSF São Jorge II com 1.378 famílias (23,20 %), seguida pela UBSF Seringueira II com 1.245 (20,96%), depois a UBSF São Gabriel com 1.209 (20,96%). Quanto ao número de pessoas cadastradas em cada ESF, na UBSF Seringueira II foram 4.056 (22,15 %), seguida pela UBSF São Gabriel 3.869 (21,12 %). Observa-se que as equipes trabalham com uma população adscrita conforme recomendação da Política Nacional de Atenção Básica do Ministério da Saúde.

O cadastro familiar objetivou conhecer as famílias adscritas às equipes da ESF, sendo uma base importante para a construção de relações de vínculo entre a população e os profissionais de saúde da família.

Assim, a utilização do cadastro envolve lançar os dados no SIAB e/ou no sistema gerencial da Secretaria Municipal de Saúde, reunir as equipes da ESF para a discussão dos resultados, utilizarem o cadastro para a classificação das famílias por risco sócio sanitário e atualizar o cadastro anualmente. Uma questão central, nem sempre considerada, é o caráter dinâmico do processo de cadastramento familiar. É preciso que este processo seja contínuo, dadas as mudanças dinâmicas que ocorrem no território e nas famílias (MENDES, 2012).

Por outro lado, as equipes de saúde deverão realizar o cadastramento das famílias através de visitas aos domicílios, segundo a definição da área territorial pré-estabelecida para a adscrição. Nesse processo serão identificados os componentes familiares, a morbidade referida, as condições de moradia, saneamento e condições ambientais das áreas onde essas famílias estão inseridas.

Essa etapa inicia o vínculo da unidade de saúde/equipe com a comunidade, a qual é informada da oferta de serviços disponíveis e dos locais, dentro do sistema de saúde, que prioritariamente deverão ser a sua referência. (BRASIL 1997).

A partir da análise da situação de saúde local e de seus determinantes, os profissionais e gestores possuirão os dados iniciais necessários para o efetivo planejamento das ações a serem desenvolvidas. O cadastramento possibilitará que, além das demandas específicas do setor saúde, sejam

identificados outros determinantes para o desencadeamento de ações das demais áreas da gestão municipal, visando contribuir para uma melhor qualidade de vida da população (BRASIL, 1997).

Para planejar e organizar adequadamente as ações de saúde, a equipe deve realizar o cadastramento das famílias da área de abrangência e levantar indicadores epidemiológicos e socioeconômicos. Além das informações que compõem o cadastramento das famílias, deverão ser também utilizadas as diversas fontes de informação que possibilitem melhor identificação da área trabalhada, sobretudo os oficiais, como dados do IBGE, cartórios e secretarias de saúde. Igualmente, devem ser valorizadas fontes qualitativas e de informações da própria comunidade (BRASIL, 1997).

Portanto, na atenção à Saúde do Trabalhador é importante que, durante a visita domiciliar e/ou o cadastro familiar, os Agentes Comunitários de Saúde realizem o preenchimento ou a atualização dos dados sobre a ocupação, utilizando a ficha de identificação do perfil ocupacional ou instrumento equivalente, conforme orienta o Instrutivo para Execução e Avaliação das Ações de Vigilância em Saúde - Projeto Fortalecimento da Vigilância em Saúde em Minas Gerais (MINAS GERAIS, 2014).

Do total de famílias cadastradas, visto no quadro 5, das 5.940 famílias, observamos no quadro 6 apresentaram 4.070 famílias que foram entrevistadas, isto corresponde a 68,51% de famílias entrevistadas do total das cadastradas.

Quadro 6. Distribuição de famílias entrevistadas e número de pessoas em idade ativa nas UBSFs no ano de 2013.

Unidade Básica da Família	Nº de famílias Entrevistadas	%	Nº de pessoas em idade ativa	%
UBSF Lagoinha I	945	23,22	2.632	23,83
UBSF São Jorge II	768	18,87	2.209	20,00
UBSF Santa Lúzia	721	17,71	1.667	15,10
UBSF São Gabriel	1.053	25,87	3.061	27,72
UBSF SeringueiraII	583	14,32	1.474	13,35
Total	4070	100,00	11.043	100,00

Fonte: Formulário de Consolidado do perfil ocupacional da ESF/PACS, 2013 – CEREST Uberlândia

Quanto à população em idade ativa, a Unidades de Saúde da Família São Gabriel possui 3.061 pessoas (27,72%), seguida da Unidade de Saúde da Família Lagoinha I com 2.632 (23,83%) pessoas, e da Unidade de Saúde da Família São Jorge II com 2.209 (20,00%) pessoas, sendo estas as que apresentaram os maiores números de pessoas em idade ativa.

O contingente de pessoas com 10 anos ou mais de idade (População em Idade Ativa), encontradas foi de 11.043 pessoas. Observa-se que o total de pessoas cadastradas apresentadas no Quadro 5 é de 18.315 pessoas, que corresponde a 100%. Portanto, as pessoas que estão em idade ativa correspondem a 60,29%, ou seja, mais da metade da população do estudo está em idade ativa.

População em idade ativa (PIA) é uma classificação etária que compreende o conjunto de todas as pessoas teoricamente aptas a exercer uma atividade econômica, conforme o Instrutivo para execução e avaliação das ações de Vigilância em Saúde: projeto de fortalecimento da Vigilância em Saúde em Minas Gerais–Resolução SES nº 4.238/2014, que considera pessoas em idade ativa todos os maiores de 10 anos.

Em relação ao trabalho precoce, cresce a cada dia o número de crianças e adolescentes que trabalham. Uns fazem trabalho leve, acompanhados e protegidos pela família, desenvolvendo-se na convivência coletiva e adquirindo os saberes transmitidos através das gerações. Outros, por constituírem-se, às vezes, na única fonte de renda familiar, tornam-se fundamentais para a sobrevivência de seu grupo familiar às custas da própria vida, saúde e oportunidades de desenvolvimento humano que lhes são negadas como direito social (BRASIL, 2001).

Essa última forma de trabalho precoce vem crescendo em todo o mundo e tem sido responsável pela exposição de crianças e adolescentes a situações inaceitáveis de exploração e de extremo perigo, pelas condições adversas a que são submetidas. Pois a pobreza, a insuficiência das políticas públicas, a perversidade da exclusão social e monetária provocadas pelo modelo de desenvolvimento econômico dominante, os aspectos ideológicos e culturais podem ser relacionados como causas do trabalho precoce (BRASIL, 2001).

Qualquer atividade produtiva no mercado formal ou informal, que retire a criança e/ou o adolescente do convívio com a família e com outras crianças, prejudicando, assim, as atividades lúdicas próprias da idade, por comprometer o seu desenvolvimento cognitivo, físico e psíquico, deve ser combatida e constitui-se em situação de alerta epidemiológico em Saúde do Trabalhador (Brasil 2001).

Conforme se pode verificar no quadro 7, no ano de 2013, houve um total de 19 atividades domiciliares formais e 162 atividades domiciliares informais.

Quadro 7. Distribuição de atividade domiciliar formal e informal nas UBSFs, no ano de 2013.

Unidade Básica da Família	Nº de Atividade domiciliar formal	%	Nº de Atividade domiciliar informal	%
UBSF Lagoinha I	0	0	26	16,05
UBSF São Jorge II	2	10,53	30	18,52
UBSF Santa Lúzia	12	63,16	27	16,67
UBSF São Gabriel	1	5,26	41	25,31
UBSF Seringueirall	4	21,05	38	23,46
Total	19	100,00	162	100,00

Fonte: Formulário de Consolidado do perfil ocupacional da ESF/PACS, 2013 – CEREST Uberlândia.

A identificação de atividade domiciliar é fundamental para o perfil produtivo. Considera-se atividade domiciliar qualquer trabalho realizado dentro do domicílio de forma individual ou familiar (fabricação de salgados, marmitas e outros alimentos para venda, lapidação, produção de artesanato, costura, dentre outras tarefas).

Da mesma forma, é importante identificar também se esse serviço é formal ou informal. Considera-se também que o trabalhador é toda pessoa que exerça uma atividade produtiva, independentemente de estar inserido no mercado formal ou informal de trabalho, inclusive na forma de trabalho familiar.

Ainda assim, o trabalhador formal é o trabalhador que possui vínculo empregatício (carteira de trabalho assinada) no regime da CLT ou é servidor público e tem direito à proteção social. O trabalhador informal é o que tem apenas um contrato de trabalho sem comprovação escrita ou trabalha por

conta própria nos casos em que não há contribuição à Previdência (LAGUARDIA, 2014).

A partir da década de 1990, os processos das mudanças na sociedade e a modernização influenciaram a expansão no nível de informalidade no mercado de trabalho brasileiro, situação resultante do aumento da proporção de profissionais que trabalhavam por conta própria, e dos profissionais trabalhando sem carteira de trabalho assinada (ULYSSEA, 2006).

Por certo, quando reconhecido como uma categoria do trabalho informal, o trabalho em domicílio é uma atividade exercida no espaço doméstico, que pode ser realizada por conta própria (autônomo), quando o produto é comercializado diretamente com os compradores ou um trabalho intermediário, cuja comercialização dos produtos gerados no domicílio é realizada por terceiros (ALVES, 2010).

O mercado de trabalho no setor informal apresenta reconhecida vulnerabilidade da população frente aos riscos e aumenta os desafios para atuação dos órgãos governamentais reguladores, dentre estes a Vigilância Sanitária (BRAGA, 2002).

Iriart et al (2008) comentam que houve um aumento do trabalho informal nas últimas décadas, o que ocasiona a esses trabalhadores ausência de seguridade social, de medidas de prevenção de riscos e baixas remunerações. Observaram em suas pesquisas o reconhecimento do trabalho formal e desvalorização simbólica do trabalho informal, principalmente pela garantia dos direitos trabalhistas, com repercussões à autoestima do trabalhador. Os autores consideram necessário maior divulgação e diálogo sobre os direitos trabalhistas, além de uma política pública que contemple a saúde desses trabalhadores informais que não têm um olhar do Estado quanto a sua proteção legal.

Chama a atenção nos territórios em estudo, a quantidade de trabalhadores atuando na informalidade, nos diversos ramos de atividades, autônomos ou prestadores de serviços, sem qualquer respaldo da Consolidação das Leis Trabalhistas.

A literatura registra que as condições de trabalho no setor informal, no domicílio e nas ruas, e mesmo em micro e pequenas empresas, são mais

perigosas e insalubres, observando-se a presença de múltiplos riscos para a saúde e a ausência de dispositivos e mecanismos básicos de proteção. Os instrumentos e maquinários utilizados nos processos produtivos, muitas vezes, são obsoletos, a manutenção é inadequada e o preparo e treinamento dos trabalhadores são ausentes ou insuficientes. Como agravante, no trabalho domiciliar, além dos trabalhadores, os familiares, particularmente idosos e crianças, considerados mais vulneráveis, estão expostos aos efeitos deletérios para a saúde (DIAS, 2002).

Os ambientes de trabalho informal se caracterizam ou pela ausência de limites físicos e territoriais, como ocorre com os trabalhadores de rua ou em ambientes com delimitação física, geralmente domiciliar, com instalações improvisadas, ausência de proteção ambiental e/ou equipamentos de proteção individual e insuficiência de treinamento dos trabalhadores. Mesmo no caso do ambiente delimitado fisicamente, muitas vezes não são enxergados pela fiscalização trabalhista, pelo fato de serem informais (MENDES, 2004).

Esses trabalhadores, de um modo geral, estão expostos a condições de trabalho perigosas e insalubres, em pequenas ou microempresas ou ainda no domicílio e nas ruas. Percebe-se nestes, vários fatores de risco à saúde e ausência de mecanismos de proteção. Associam-se também a isto, a ausência de proteção legal, das normas de segurança, de fiscalização e de cobertura dos acidentes de trabalho.

Além disso, verifica-se a dificuldade que enfrentam com relação à construção de vínculos e poder de mobilização para reivindicação de questões trabalhistas, uma vez que a necessidade de sobrevivência submete o trabalhador à aceitação das piores condições de trabalho, o que é agravado pelo desconhecimento de direitos trabalhistas e seus mecanismos de proteção jurídica (MENDES, 2004).

Antunes (2011) sinaliza que contemporaneamente os processos de trabalho informais se encontram precarizados. O autor explica que enquanto uns trabalhadores realizam uma jornada intensa de até 17 horas diárias, outros são excluídos deste mercado, ou seja, enquanto uns são explorados em busca da mais-valia, outros são descartados, sendo impelidos ao trabalho informal, subemprego ou desemprego.

De acordo com o relatório da Organização Internacional do Trabalho (OIT) publicado em 1995, entre as dez ocupações mais frequentes desenvolvidas pelos trabalhadores em domicílio destacam-se as costureiras e o serviço de indústria de confecções ou reparação de vestuário. Os homens ocupam postos de trabalho mais especializados (ou técnicos) do que as mulheres, que geralmente desempenham tarefas nas quais o requerimento de treinamento formal é baixo, ofícios aprendidos na prática, em casa, junto com parentes ou ao desempenhar funções domésticas (LAVINAS, 1998).

Um estudo realizado em Belo Horizonte por Rodrigues (2006), com equipes da Atenção Primária à Saúde, demonstrou que as principais atividades desenvolvidas no âmbito domiciliar foram: costura, produção de alimentos, tecelagem, separação de material para reciclagem, borracharia, lanternagem e apicultura.

Cangussu (2014) mostrou em estudo uma análise territorial na região sul do município de Palmas – Tocantins, com relação aos potenciais fatores de riscos e impactos à saúde dos trabalhadores advindos das atividades existentes no território da Atenção Primária em Saúde e observou como resultado um predomínio do trabalho informal, autônomo ou não, nos mais variados ramos de atividades, como o comércio de venda de produtos ou serviços, indústria, dentre outros.

Em outras palavras, estes trabalhadores encontram-se vulneráveis às mazelas sociais, trabalhando pela sobrevivência, sem amparo legal. Para o grupo, há entre os trabalhadores informais uma sobrecarga de serviço causada pela incerteza do futuro. No comércio de prestação de serviços, os principais ramos citados foram: oficina mecânica, lava-jatos, salão de beleza, empregada doméstica e profissionais do sexo. Já no comércio de venda de mercadorias destacou-se a grande oferta de produtos, dentre eles, os não duráveis, semiduráveis e duráveis (CANGUSSU, 2014).

A indústria por sua vez apresentou-se mais tímida, como em todo o município de Palmas, sendo descritas nesse território a indústria da construção civil, condimentos, confecções, marmorarias, marcenarias, serralherias e cerâmica (CANGUSSU, 2014).

Em todas estas atividades foram relatadas as situações vividas pelos trabalhadores do território em estudo, descrevendo-se os problemas de saúde identificados. Discorreu-se sobre precariedade desses vínculos empregatícios, que se encontram predominantemente informal, seguido das péssimas condições de trabalho, com estruturas físicas inapropriadas e ausência dos equipamentos de proteção individual (CANGUSSU, 2014).

Ainda segundo a autora, há sobrecarga de trabalho, a exposição a uma série de riscos à saúde desses trabalhadores, o desconhecimento destes riscos pelo trabalhador e os agravos ocasionados pelos mesmos.

Em relação à manipulação de produtos químicos, o quadro 8 mostra, no ano de 2013, 16 atividades domiciliares de manipulação de produto químico, mostrando um número maior na UBSF São Jorge II com 15 destas atividades. Em relação às atividades de manipulação de produtos de beleza, percebe-se 03 atividades referentes a esta manipulação e 20 atividades de produção de alimentos no domicílio, caracterizando estas atividades com possíveis riscos químicos e biológicos.

Quadro 8. Número de manipulação de produtos químicos, de beleza e de alimentos no domicílio nas UBSFs, no ano de 2013.

Unidade Básica da Família	MANIPULAÇÃO					
	Produto químico domiciliar	%	Produto de Beleza domiciliar	%	Alimento no domicílio	%
UBSF Lagoinha I	0	0,00	1	33,33	6	30,00
UBSF São Jorge II	15	93,75	1	33,33	2	10,00
UBSF Santa Lúzia	0	0,00	1	33,33	5	25,00
UBSF São Gabriel	1	6,25	0	0,00	4	20,00
UBSF Seringueira II	0	0,00	0	0,00	3	15,00
Total	16	100,00	3	100,00	20	100,00

Fonte: Formulário de Consolidado do perfil ocupacional da ESF/PACS, 2013 – CEREST Uberlândia.

O instrutivo orienta as equipes, que caso no domicílio algum membro da família manipule produtos químicos (desinfetante, sabão, amaciante), produtos

de beleza para comercialização ou faça alimentos para vender (salgados, doces, marmitas), essa atividade deve ser identificada.

Em relação à manipulação de produtos químicos, na visão de Peixoto (2012), o controle das substâncias químicas é de grande dificuldade devido aos inúmeros tipos de produtos químicos existentes atualmente no mercado. Além de suas características inconstantes de volatilidade, toxicidade e das diversas formas de penetração (vias respiratórias, cutâneas ou ingestão, seja pelo tempo de exposição), outro agravamento está no comportamento de cada organismo, pois algumas pessoas apresentam mais sensibilidade a certas substâncias do que outros que possuem maior resistência.

As substâncias químicas são classificadas pela Higiene Ocupacional em três tipos: aerodispersóides ou aerossóis (encontradas na forma sólida ou líquida, que embora suas partículas menores sejam respiráveis, são as que mais causam problemas à saúde dos trabalhadores devido a sua retenção nos pulmões); gases (moléculas que se espalham no ar); ou vapores (substâncias que se condicionam dependendo da temperatura). No caso dos aerodispersóides, esses podem se apresentar em forma de névoa, neblina, poeira, fumaça, fumos e fibras (PEIXOTO, 2012).

Cada um desses tipos acarreta uma gama de efeitos nocivos à saúde. Estes efeitos acumulam-se com o tempo, deixando os trabalhadores que lidam com essas substâncias cada vez mais vulneráveis. Além disso, essas substâncias químicas potencializam seus efeitos em ambientes fechados e quentes devido à volatilização das substâncias fazendo com que o trabalhador tenha mais contato com o produto (FREITAS; ARCURI, 2000).

Dentro do ambiente de trabalho, os efeitos dessas substâncias podem ser anulados ou minimizados se houver a utilização correta e contínua de equipamentos de proteção individual – EPI e se estes produtos estiverem dentro dos limites de tolerância aceitáveis.

Segundo Nascimento (2014), a manipulação incorreta de produtos químicos de limpeza pode desencadear doenças relativas à exposição química, que vão desde problemas como irritação na pele e olhos, doenças respiratórias, doenças do sistema nervoso, rins, fígado até alguns tipos de câncer.

Logo, é imprescindível que o trabalhador conheça os produtos que estão lidando diariamente. Uma forma para que isso aconteça é a leitura dos rótulos dos produtos, que embora omitam informações importantes, constam informações básicas sobre o uso correto e as precauções para evitar efeitos indesejáveis.

Em relação ao número de manipulação de produtos de beleza, ao quadro 8 mostra, que no ano de 2013, houve apenas 03 atividades domiciliares de manipulação deste produto. Já na categoria de atividades domiciliares de manipulação relacionada a alimentos foi predominante na UBSF Lagoinha I, com 06 atividades de produção de alimentos no domicílio.

Para Laguardia (2014), se no terreno do domicílio há a plantação de verduras, legumes, hortaliças e/ou frutas, deve ser registrado com distinção se a destinação é o consumo próprio ou a comercialização. Observa-se no quadro 9 que há 99 plantações em terreno para consumo próprio e 44 plantações em terreno do domicílio para comercialização. Subtende-se que esse usuário é produtor familiar, sendo estes dados importantes para a prevenção de agravos relacionados a sua atividade produtiva. A exemplo cita-se a manipulação de produtos tóxicos como agrotóxicos.

O Brasil está entre os maiores consumidores mundiais de agrotóxicos. Agrotóxicos e afins são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade é a de alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e os produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (Lei Federal Nº 7802/1989 e Decreto Nº 4.074/2002).

Quadro 9. Distribuição de plantações no terreno do domicílio nas UBSFs, no ano de 2013.

Unidade Básica da Família	PLANTAÇÕES			
	Plantações no terreno para consumo próprio	%	Plantações no terreno para comercialização	%
UBSF Lagoinha I	0	0,00	0	0,00
UBSF São Jorge II	3	3,03	2	4,55
UBSF Santa Lúzia	40	40,40	40	90,91
UBSF São Gabriel	16	16,16	0	0,00
UBSF SeringueiraII	40	40,40	2	4,55
Total	99	100,00	44	100,00

Fonte: Formulário de Consolidado do perfil ocupacional da ESF/PACS,2013 – CEREST Uberlândia

Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), em 2008, as vendas de agrotóxicos, comparado ao ano de 2007, apresentaram um crescimento acumulado de 24%, totalizando um mercado de 12,7 milhões de reais. Os agrotóxicos estão entre os mais importantes fatores de risco para a saúde da população geral, especialmente para saúde dos trabalhadores e para o meio ambiente.

Para sua avaliação e controle existe a Lei Federal de Agrotóxicos n°. 7802, de 11 de julho de 1989. Os agrotóxicos são utilizados em grande escala por vários setores produtivos e mais intensamente pelo setor agropecuário, silvicultura, no tratamento de madeiras em geral, construção, armazenamento de grãos e sementes, produção de flores, combate aos vetores transmissores de doenças, dentre outras atividades.

A exploração do tema torna-se viável e útil e, ao desenvolvê-lo, deve-se caracterizar a população exposta aos riscos de intoxicação por agrotóxicos, mediante o conhecimento dos principais agentes químicos usados, para assim se ajudar na prevenção de ocorrências de contaminação e intoxicação.

A maioria dos agricultores faz uso desse insumo, mas por terem, muitas vezes, baixa escolaridade, não conseguem ler o rótulo do produto. Outros o lêem, mas não o interpretam corretamente. Dessa forma, correm o risco de

intoxicar-se ao manipular essas substâncias. Há ainda mais um agravante, que é a falta ou uso incorreto e até mesmo incompleto dos equipamentos de proteção individual – EPIs (FREITAS, ARCURI, 2000).

Para Gregolis, Pinto e Peres (2012), estudos realizados no Brasil a respeito da percepção de risco no trabalho rural relacionados a grupos rurais expostos a agrotóxicos no contexto da agricultura familiar, constatou-se que o grupo de trabalhadores rurais é o mais vulnerável em relação aos problemas gerados no âmbito das relações saúde, trabalho e ambiente.

Dentre os riscos, destacam-se o fato das atividades de trabalho realizadas no âmbito dessa lógica de produção agrícola envolver toda a família, incluindo mulheres e também crianças, da carência na assistência-técnica oferecida a estes indivíduos, tanto em sua regularidade, quanto em qualidade, o fato de estarem expostos ininterruptamente aos efeitos nocivos destes agentes químicos e a “dificuldade no entendimento das informações disponíveis sobre saúde e segurança relacionadas ao uso de agrotóxicos na agricultura” (GREGOLIS; PINTO; PERES, 2012, p. 100).

Faria, Rosa e Facchini (2007) apontam a relação dos agrotóxicos com várias doenças, em especial intoxicações agudas, “[...] caracterizando os agroquímicos como um dos mais importantes fatores de risco para a saúde humana, além da contaminação ambiental”.

De acordo com os dados secundários fornecidos pelo CEREST, o quadro 10, representa a lista das principais atividades domiciliares nas UBSFs pesquisadas, referente ao ano de 2013, que totalizou em 46 atividades domiciliares no ramo de Comércio/vendas, seguida de 39 atividades domiciliares no ramo de Cabeleireira/Manicure/Salão de beleza, 27 atividades domiciliares no ramo de Costureiras e 26 atividades domiciliares no ramo de Alimentos, tiveram um maior registro dentre as demais.

Quadro 10. Distribuição das principais atividades domiciliares nas UBSFS, no ano de 2013

Atividades Domiciliares	UBSF Santa Luzia	UBSF Lagoinha I	UBSF São Gabriel	UBSF São Jorge II	UBSF Seringueira II	Total
Artesanato	02	08	03	05		18
Bar		01				01
Bordadeira	01		01	02	03	07
Cabeleireira/Manicure/salon beleza	08	09	11	03	08	39
Comércio de variedades	05	02	08	07	04	26
Confeiteiro				05		05
Conserto de eletrodoméstico		01				01
Corretora		01				01
Costureira	09	03	06	03	06	27
Cuidador de criança				01	03	04
Doceira	02					02
Elétrica			01			01
Escola			01			01
Escritório		02				02
Grafica	01					01
Lanternagem		01				01
Oficina mecanica	02	01	01			04
Passadeira		02				02
Pastelaria			01			01
Produção de quitandas	01	03				04
Produção de Produtos de Limpeza			01			01
Produção de Bijoteria		01				01
Produção de sorvetes					01	01
Professor				01		01
Reciclagem	02		01		06	07
Salgadeira	01		01	01	02	05
Sapateiro	01			01		02
Serralheiro					01	01
Tapeçaria	01					01
Venda Alimentos		04	01			05
Venda de Frango Assado			01			01
Venda de perfumes	01					01
Venda de produtos variados		03				03
Venda de Roupas			03			03
Venda de verdura	01					01
Vendas		05		02	06	13
Total	38	47	41	31	40	197

Fonte: Formulário de levantamento do perfil ocupacional/2013- CEREST Uberlândia

O comércio de venda de mercadorias predominantemente varejista no território em estudo é bastante movimentado. Encontra-se neste território uma variedade de ofertas, a venda de produtos não duráveis (produtos alimentícios, perfumes), semiduráveis (vestuários) e duráveis (utilidades domésticas). Estes se encontram na informalidade e sujeitos a riscos à saúde e a ocorrência de agravos.

No estudo de Cangussu (2014) em relação a ocupação no comércio, os resultados apresentam que a fragilidade dos vínculos empregatícios foi ressaltada, uma vez que foram identificadas situações de sobrecarga de serviço, trabalho sob pressão, assédio moral, riscos e agravos à saúde dos colaboradores, dificuldades no estabelecimento de nexos e de acesso aos direitos trabalhistas. Em uma entrevista realizada no trabalho da autora, os participantes relatam os riscos existentes, a saber ergonômicos e os psicológicos - ocasionados pela sobrecarga de trabalho, conforme se pode verificar na narrativa a seguir:

O que a gente observa no comércio é a carga horária excessiva, porque o trabalhador trabalha o dia todo em pé e tem horário só pra entrar, não tem horário pra sair [...]”. “Quer ir embora? não, vai arrumar primeiro ali [...] e eles acabam ficando, sendo que já passou do horário de ir embora, eles falam que vão pagar hora extra, pode até pagar, mas isso vai acarretando estresse, fadiga, na hora de chegar não pode estar atrasado, mas na hora de ir embora não tem horário, aí já sai de lá agoniado [...] (CANGUSSU, 2014, p. 91)

O trabalho sob pressão e o assédio moral foram observados e citados:

Tem um mercadinho lá, que de três em três dias é funcionário largando de trabalhar lá, não sei o que acontece que funcionário lá não dura, é impressionante como não aguenta, a dona bota pressão, bota pressão e ninguém aguenta... eu acho isso horrível... “Tem muito assédio moral também, que os patrões falam há você é lenta, você não sabe, você não dá conta, aí começam a dizer essas palavrinhas irritantes que os trabalhadores sofrem nessas situações, ficam tristes, angustiados. (CANGUSSU, 2014, p. 92)

A ocorrência de acidentes e adoecimentos ocasionados pelo trabalho, relativos à ergonomia são situações vivenciadas no território:

Tem também a questão da postura, eles carregam caixas pesadíssimas. Eu tenho um amigo que foi pegar uma caixa, nem era o serviço dele, mas olha a arrumação, ele tava trabalhando em outra repartição, um outro foi pegar uma caixa pesada demais e pediu ajuda pra ele, ele foi ajudar e começou a sentir uma dor na perna, mas terminou de levar esse peso, aí começou a passar mal, foi levado pro médico mas no outro dia voltou a trabalhar, ele tinha fraturado o osso [...]”. “Tem uma jovem que trabalha em um mercado perto da minha casa, no caixa, ela me disse que está com problema de coluna por excesso de movimento repetitivo [...]”.(CANGUSSU, 2014, p. 92).

O setor informal abarca diversos tipos de atividades econômicas, a exemplo do comércio. Este é um subsetor marcado por heterogeneidade de atividades desenvolvidas e que compreende uma infinidade de tarefas de diversas naturezas, que incluem desde a operação de máquinas registradoras, reposição de estoques em gôndolas e prateleiras, até o desenvolvimento de múltiplas funções (CISNE, 2011).

Outra característica do comércio informal está nos ambientes de trabalho, muitas vezes insalubres, sem preocupações com aspectos de segurança, higiene e desprovidos de instalações mínimas de satisfação das necessidades mais elementares dos trabalhadores.

Além dessa problemática, as condições laborais são precárias, manifestadas na violação dos direitos trabalhistas, na insegurança do posto e do ambiente de trabalho, no aumento do ritmo da produção e das exigências. Tais condições interferem na saúde dos trabalhadores e também no modo de agir, pensar, sentir e fazer (CISNE, 2011).

No estudo de Motta (2011), para o tipo de ocupação, encontrou-se forte associação estatística entre os acidentes e o trabalho como açougueiro. Uma das tarefas prestadas por trabalhadores que comercializam carnes e frangos envolve a atividade de talhar e cortar as mercadorias com a utilização de ferramentas, motorizadas ou não, que podem levar ao risco de lesões nas mãos e nos dedos.

Outro fator que deve ser abordado é a pressão da produtividade, visto que vendedores do comércio, em sua grande maioria, são os proprietários da

unidade comercial e apresentam sua renda mensal de acordo com a quantidade de mercadoria vendida, ou seja, depende do valor da venda/faturamento.

Essa variação de renda, a depender da produtividade, pode proporcionar esgotamento tanto físico quanto psicológico, aumentando suas chances de se acidentar. Outro fator que deve ser abordado é a pressão da produtividade, visto que vendedores de comércio varejista utilizam-se, frequentemente, de planos de remuneração baseados na aplicação de percentuais sobre o valor da venda/faturamento. O esforço do trabalhador em cumprir metas pode proporcionar esgotamento tanto físico quanto psicológico, aumentando suas chances de se acidentar.

De acordo ainda com Motta (2011), as causas predominantes dos acidentes de trabalho ocorridos no ramo de atividade econômica no Comércio foram Queda/Choque/Perda do equilíbrio, com 1.523 casos (22,1%), seguidas de Equipamentos/Maquinas/Matéria-prima usada no trabalho (18,5%), o uso Ferramenta manual não motorizada (15,2%) e Motocicleta (13,0%).

As atividades desenvolvidas em salão de beleza, cabeleireiro, barbeiros e afins, executadas em domicílio configuraram-se como a segunda categoria mais predominante no estudo. Os procedimentos executados em salões de beleza e atividades afins envolvem riscos à saúde da população e sem a devida fiscalização do uso, armazenamento e limpeza adequados de produtos cosméticos e instrumentos de trabalho pelo órgão do Estado, podem acarretar agravos à saúde do cliente e dos próprios trabalhadores (BRITTO, 2004).

No entanto, poucas são as notificações **de** eventos adversos ou infecções relacionadas tanto aos profissionais quanto aos clientes de estabelecimentos de belezas (GARCACCIO; OLIVEIRA, 2013).

Em geral, os produtos de alisamento capilar apresentam risco à saúde pelo fato de possuírem substâncias com potenciais tóxicos para o organismo humano. No que se diz respeito à técnica de alisamento capilar, a utilização de formaldeído merece destaque pela proibição do seu uso estabelecida pela Anvisa, exceto em casos de conservação do produto. Entretanto, o formol continua sendo utilizado em alguns salões de beleza, pelo processo de adição de concentrações acima do autorizado nos alisantes capilares por intermédio do próprio

profissional cabeleireiro como pelos clientes que desconhecem os potenciais riscos e o processo de intoxicação a partir da utilização deste produto, evidenciado em sinais e sintomas agudos, subagudos e crônicos (Garcaccio e Oliveira 2013, p. 98).

Ademais, as práticas desenvolvidas por manicures e pedicures também acarretam riscos de transmissão de patógenos, a exemplo do vírus HIV e, principalmente, do vírus das hepatites B e C, expondo tanto os profissionais quanto os clientes (MOREIRA, 2013).

O estudo de Garcaccio e Oliveira (2013), referente à avaliação dos conhecimentos e adesão às questões de biossegurança, identificou que as manicures e pedicures detinham pouco conhecimento e baixa adesão a procedimentos para a prevenção dos riscos envolvidos em suas atividades.

Ainda nesta mesma linha de consideração, Silva (2014) constatou que há um baixo conhecimento sobre biossegurança por parte destes profissionais, que incluem desconhecimento sobre a distinção entre os métodos de limpeza, desinfecção e esterilização dos artigos utilizados em suas práticas, bem como sobre riscos aos quais estão expostos.

Estas conclusões coadunam com o estudo de Moreira e colaboradores (2013), que identificou em um total de 149 profissionais entrevistados entre manicures, pedicures e podólogos, conhecimento insuficiente sobre a etiologia e as formas de transmissão e prevenção da AIDS e de hepatites virais.

Destaca-se também a baixa adesão ao uso de métodos corretos de reprocessamento e limpeza de materiais, principalmente, a esterilização de materiais perfuro-cortantes e a reutilização de materiais descartáveis (SILVA, 2014).

O estudo de Ghisi e Santin (2011), ao analisar amostras de lixa de unha metálica de cinco centros de estética e cinco domicílios, observou que 100% das amostras apresentaram resultado positivo para fungos patogênico que causam onicomicoses em virtude do indevido processo de esterilização do material.

Além disso, o estudo menciona que a prática de compartilhamento de instrumentos é comum nos dois tipos de ambientes pesquisados e que a incidência de contaminação entre os centros de estéticas e as atividades

realizadas nos domicílios foram equivalentes. Por indicação da Vigilância Sanitária, a lixa de unha é considerada um instrumento de uso único ou, no caso da lixa metálica, de uso pessoal (BRASIL, 2009).

Todos esses achados reforçam a importância destes profissionais serem capacitados pelas equipes de Atenção Primária para executarem seu trabalho de acordo com as técnicas de biossegurança e as boas práticas sanitárias que visam reduzir os riscos presentes nas suas atividades, sejam elas desenvolvidas em domicílios ou em centros de beleza.

A pesquisa de Cangussu (2014) relativa à atividade profissional de salão de beleza, constatou que a atividade é predominantemente feminina e o mercado de trabalho em sua maioria informal, é como uma estratégia de fuga ao desemprego. Após a participação em um curso profissionalizante surge a possibilidade de prestação de serviços a terceiros ou de abertura do próprio negócio, montado muitas vezes em cômodos residenciais, onde não faltam clientes.

E tendo como consequência há a precariedade do vínculo empregatício e a sobrecarga de trabalho, causada pela incerteza do futuro. Também se identifica com clareza os riscos e agravos a que esta categoria profissional está exposta. Quanto aos riscos à saúde, dentre eles destacam-se os riscos ergonômicos e psicológicos da sobrecarga de trabalho, ocasionados pela necessidade de sobrevivência financeira. No estudo constatou-se que as doenças osteomusculares e intoxicações exógenas são relacionadas aos riscos identificados na atividade.

Cunico e Lima (2012) relatam que os cosméticos utilizados em salões de beleza apresentam uma grande quantidade de substâncias químicas e que apesar de estarem sujeitos às normas de órgãos reguladores e precisarem ser registrados pela ANVISA, ainda assim apresentam riscos à saúde, podendo ocasionar doenças ocupacionais. Além disso, esses produtos podem ocasionar reações alérgicas, como a dermatite de contato, irritando a pele ou o couro cabeludo, pela formação de eczemas ou rachaduras.

No estudo de Cangussu (2014), observa-se a necessidade da realização de ações educativas, que orientem os trabalhadores desta atividade profissional sobre os riscos da exposição contínua a esses produtos, da

importância da utilização de produtos que sejam aprovados pelos órgãos competentes e da utilização de equipamentos de proteção individual durante seu uso. Além dos riscos químicos, outros riscos igualmente importantes também são identificados nesta categoria trabalhadora, dentre eles o ergonômico.

Fonseca et al (2013) realizaram uma análise ergonômica deste processo de trabalho. Identificaram alto risco no fator biomecânico para distúrbios musculoesqueléticos e queixas de dores ou desconforto muscular esquelético em todo o corpo, o que pode ser justificado pelas posturas adotadas, execução de movimentos repetitivos e extensa jornada de trabalho.

Contudo, como estratégia de melhoria sugeriu a adaptação do ambiente de trabalho às necessidades corporais das trabalhadoras, tanto as cabeleireiras, como as manicures e as podólogas. Garbaccio e Oliveira (2013) mencionaram o risco biológico identificado nas atividades de trabalho das manicures e podólogas, ocasionado principalmente pela ausência da utilização das medidas de segurança.

O fato é justificado pelo desconhecimento destes profissionais aos fatores de riscos existentes, devido à ausência de ações educativas promovidas pelos órgãos públicos.

Outra pesquisa propôs-se a investigar os limiares auditivos em cabeleireiras, devido ao ruído presente nos salões de beleza, principalmente dos secadores de cabelo. Observou-se um rebaixamento temporário da acuidade auditiva, comparando-se os resultados audiométricos antes e após a jornada de trabalho, apesar dos resultados permanecerem dentro dos padrões de normalidade. Além disso, foram observadas queixas de sintomas auditivos, como zumbido, sensação de plenitude auricular, desconforto a sons intensos, dificuldade de localização da fonte sonora, cefaléia, irritação e vertigem (MARTINS, 2001).

Sabe-se que algumas profissões podem trazer sérios riscos à saúde dos trabalhadores, como a profissão das costureiras, que por realizarem trabalhos cansativos e repetitivos, podem prejudicar suas condições de vida com o passar do tempo. O movimento feito por estas profissionais pode trazer consequências irreparáveis, como por exemplo, problemas de coluna, lesões por esforços repetitivos (distúrbios

osteomusculares relacionadas ao trabalho - DORT), além do stress, cansaço psicológico que é um dos principais agravantes da saúde de pessoas que passam a maior parte do seu dia sentados em uma única posição e fazendo o mesmo tipo de movimento, sem precauções ou fazendo movimentos de maneira correta (CARNEIRO, FERREIRA, 2010, p.45).

As costureiras possuem uma jornada de trabalho cansativa, pois além de longa, é caracterizada por atividades repetitivas que ocorrem em todo o tempo na posição sentada, condição que se torna prejudicial à saúde. As maiores reclamações são relacionadas a dores pelo corpo, cansaço físico e mental (SENA et al, 2008).

Ao analisarmos um estudo realizado por Maciel et al (2006), as costureiras também se queixaram de dores por diversas partes do corpo. A região em que as costureiras mais reclamaram de dores foi a coluna lombar sendo apontada por 17%, 13% de desconforto na coluna cervical e ombros; 12% na cabeça, 10% nas pernas, 9% desconforto no punho, 8% no quadril, 7% na coluna torácica, 6% nos joelhos e 5% desconforto no tornozelo.

Num estudo de Paizante (2006), a frequência de dor osteomusculares nas trabalhadoras do ramo da costura, nos últimos 12 meses foi de 72,3% na coluna lombar, 61,4% na coluna dorsal, 55,3% nos ombros, 54,1% no pescoço, 38,8% nos pulsos/mãos, 36,5% nos quadris/coxas, 34,1% nos joelhos, 28,2% nos tornozelos e 3,5% referiram-se a dores nos cotovelos.

Certamente o ambiente não ergonômico é ainda outro fator relacionado com as dores na coluna vertebral, pois as características incorretas dos mesmos obrigam os trabalhadores a assumirem posturas inadequadas (MORAES, 2002).

A literatura é escassa na verificação sobre os riscos a que estão submetidos os Manipuladores de alimentos no domicílio. Verificou-se a importância da Vigilância em Saúde, por meio da Vigilância Sanitária estar integrada à Saúde do Trabalhador, quanto aos riscos ocupacionais dos trabalhadores em Alimentação e os seus efeitos sobre a saúde.

Na área da saúde, a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 49, instituída em 2013 (ANVISA, 2013), dispõe sobre a regularização de atividades

executadas pelo microempreendedor individual para que sejam sujeitas à ação da Vigilância Sanitária. O principal objetivo desta resolução é promover a segurança sanitária de bens e serviços que apresentam riscos à saúde da sociedade, criando consecutivamente aspectos facilitadores de inclusão social e econômica

E com essa resolução os órgãos de Vigilância Sanitária poderão regularizar atividades instaladas em residências, área com regulamentação precária ou inexistente e em outros locais nos quais são desenvolvidas as atividades produtivas.

No que diz respeito ao trabalho informal, a Vigilância Sanitária não exercita ações de controle e fiscalização, principalmente em atividades realizadas no domicílio.

Haja vista que apesar do poder da polícia ser outorgada pelo Estado a ela, o qual sobrepõe os interesses coletivos sob os individuais, a atividade informal domiciliar é protegida pelo direito constitucional da inviolabilidade do domicílio, que se embasa na determinação de que “a casa é asilo inviolável do indivíduo, ninguém nela podendo penetrar sem consentimento do morador, salvo em caso de flagrante delito ou desastre, ou para prestar socorro, ou, durante o dia, por determinação judicial” (COSTA, 2012).

De acordo com estes termos, as medidas sanitárias em ambiente privado, como é o exemplo do domicílio, só serão possíveis mediante autorização do proprietário, não podendo ninguém adentrar ao estabelecimento sem este consentimento (SUNDFELD, 2004).

A inviolabilidade do domicílio é considerado um “direito negativo”, de defesa do indivíduo perante o Estado. No entanto, com a RDC nº 49 visando a regularização de atividades realizadas em domicílios, o comportamento de abstenção do estado perante essa inviolabilidade entra em conflito com o princípio basilar da supremacia do interesse público sobre o privado. Desta forma, em uma situação de conflitos de interesses, no caso da questão em discussão representada pelos riscos à coletividade que a Atividade Econômica Domiciliar - AED pode apresentar, há de prevalecer o interesse coletivo. Nesta vertente, a intervenção no cenário da informalidade de atividades instaladas em

domicílio configura-se como complexo e desafiador para os órgãos da Vigilância Sanitária e também da Vigilância em Saúde do Trabalhador.

Os cuidados com a higiene pessoal são fundamentais para se alcançar o consumo de alimentos seguros. Nela estão inseridos a higiene corporal, os equipamentos de proteção individual, os bons hábitos e o estado de saúde dos manipuladores de alimentos.

A falta de atenção a estes aspectos fundamentais, durante a preparação de alimentos, pode contribuir para que os colaboradores, responsáveis pela manipulação, sejam os principais responsáveis pela ocorrência de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), inclusive mais do que os inimigos naturais da saúde pública como os vetores e pragas urbanas (REY; SILVESTRE, 2009).

Os maiores perigos de contaminação encontrados nas residências são relacionados a presença de animais domésticos na área de produção, utilização de utensílios de madeira e inadequada higiene pessoal e ambiental, além de que:

(...) dentre as não conformidades domiciliares, destaca-se a falta de higiene das mãos e uniformização inadequada, principalmente as donas de casa pertencentes à classe econômica mais baixa. As donas de casa mantêm contato com seus animais de estimação enquanto manipulam alimentos e não higienizam suas mãos adequadamente durante o processo ou trocam de roupa para isto, aumentando o risco de desenvolvimentos de zoonoses, como a toxoplasmose. Constatou-se que outras donas de casa possuíam utensílios e equipamentos muito antigos e com condição de higiene e manutenção precárias, demonstrando que tais manipuladores não possuem muito conhecimento de todos os perigos aos quais os alimentos podem ser expostos, são eles físicos, químicos ou biológicos (XAVIER, 2009, p. 67).

Diante o exposto acima, reforça-se que a contaminação dos alimentos por microrganismos não pode ser evitada por completo, mas com boas práticas pode ser diminuída, em toda a cadeia produtiva. Durante a manipulação pode haver contaminação por condições precárias de higiene de manipuladores, equipamentos, utensílios, ambiente, por más condições das matérias-primas e

ingredientes, ou mesmo más práticas de armazenamento dos produtos acabados (SOTO et al., 2009).

Com relação aos agravos à saúde dos trabalhadores nas atividades de alimentação, de acordo com Casarotto e Mendes (2003), as atividades desenvolvidas na produção de refeições caracterizam-se por movimentos manuais repetitivos, levantamentos de peso excessivo e permanência por períodos prolongados na postura em pé, ou mesmo em outra postura desconfortável.

Ainda segundo eles, a postura em pé é responsável pela grande prevalência de dores nas pernas e pés. Talvez ela seja responsável pelas dores na coluna lombar, porém existem estudos que mostram que tanto em trabalhos desenvolvidos na postura em pé, quanto na postura sentada, pode ocorrer lombalgia.

Conforme o quadro 11, dentro das 4.586 principais ocupações individuais dos trabalhadores do território das unidades de saúde da família em estudo, observa-se que as dez principais são: Serviços gerais 478 (10,42%), Vendedor 392 (8,54%), Doméstica 385 (8,39%), Atendente 347 (7,56%), Pedreiro 308 (6,71%), Comerciante 234 (5,10%), Motorista 215 (4,68%), Diarista 211(4,60%), Auxiliar Administrativo 210 (4,57%), Auxiliar de Produção 133 (2,90%) e Mecânico 132 (2,87%) tiveram um maior registro dentre as demais.

Quadro 11. Distribuição das principais ocupações individuais dos trabalhadores do território nas UBSFs, no ano de 2013.

OCUPAÇÕES INDIVIDUAIS	UBSF Lagoinha I	UBSF Santa Luzia	UBSF São Gabriel	UBSF São Jorge II	UBSF Seringueira II	Total
Açougueiro	-	01	-	-	03	04
Advogado	04	04	-	-	-	08
Agente Comunitário de Saúde	-	02	02	04	-	08
Artesã	19	-	-	04	02	25
Almoxarife	-	-	-	-	04	04

Atendente	65	41	119	82	40	347
Autônomo	02	30	-	-	-	32
Auxiliar administrativo	44	67	51	41	07	210
Auxiliar de cozinha	04	02	-	-	-	06
Auxiliar de produção	10	12	63	32	16	133
Auxiliar de Montagem	-	-	03	-	-	03
Analista de sistema	-	03	-	-	-	03
Babá	-	-	04	-	-	04
Borracheiro	-	-	05	-	-	05
Cabelereiro	17	21	10	09	07	64
Caixa	23	-	18	18	10	69
Caminhoneiro	03	-	-	-	-	03
Carroceiro	-	-	-	03	-	03
Carpinteiro	05	01	-	-	-	06
Chapa	-	-	-	07	-	07
Cobrador	-	05	03	03	-	11
Comerciante	94	32	33	60	15	234
Confeiteiro	03	-	-	-	-	03
Contador	02	-	-	-	-	02
Corretor	-	05	-	-	-	05
Costureira	16	11	22	29	20	98
Cuidador	-	-	03	-	-	03
Cozinheiro	13	08	39	10	15	85
Dentista	05	-	-	-	-	05
Diarista	65	11	69	21	45	211
Doméstica	91	22	106	70	96	385
Educador Infantil	-	-	-	03	-	03
Eletricista	07	09	04	06	09	35
Empresário	-	07	-	-	-	07

Enfermeiro	06	04	-	-	02	12
Estoquista	-	04	-	-	-	04
Feirante	06	-	03	-	-	09
Frentista	-	-	-	03	04	07
Gari	-	-	-	02	-	02
Garçon	24	02	-	-	02	28
Gesseiro	-	05	-	-	-	05
Gerente	-	22	-	07	-	29
Lavador de Carro	-	-	-	-	02	02
Manicure	10	04	12	07	-	33
Marceneiro	-	-	04	-	-	04
Mecânico	20	30	26	35	21	132
Mestre de obras	02	-	-	-	-	02
Motorista	27	46	52	58	32	215
Motoboy	-	-	05	03	04	12
Oficial Administrativo	-	-	-	03	-	03
Operador de Caixa	-	05	-	-	-	05
Operador de Telemarketing	10	28	16	24	11	89
Operador de Máquinas	-	06	32	16	08	62
Padeiro	05	-	-	-	-	05
Pedagoga	03	-	-	-	-	03
Pedreiro	54	12	113	36	93	308
Pintor	18	07	30	15	15	85
Porteiro	-	02	04	12	03	21
Professor	70	69	21	34	-	194
Promotor de vendas	10	-	-	04	-	14
Recepcionista	-	11	-	-	-	11
Reciclador	-	-	04	-	03	07
Repositor	-	-	09	-	-	09

Representante Comercial	02	13	-	-	-	15
Salgadeira	-	02	-	-	-	02
Secretaria	23	09	14	21	-	67
Segurança	05	-	-	02	06	13
Servente	13	05	42	11	35	106
Serralheiro	-	-	-	-	04	04
Serviços Gerais	41	31	113	89	204	478
Servidor Público	18	24	-	27	04	73
Técnico de Enfermagem	-	09	08	-	01	18
Técnico em Telecomunicações	-	-	-	05	-	05
Vendedor	90	83	82	99	38	392
Vidraceiro	-	02	-	-	-	02
Vigilante	04	08	25	22	09	68
Total	953	737	1.169	937	790	4.586

Fonte: Formulário de Consolidado do perfil ocupacional da ESF/PACS,2013 – CEREST Uberlândia

De acordo com os dados observa-se que a ocupação individual de maior relevância foi a de Serviços Gerais. Esta ocupação merece um estudo maior devido aos riscos e agravos relacionados à atividade.

Portanto, abordaremos sobre esta atividade e riscos a saúde, bem como a atividade da doméstica, visto que, as atividades do vendedor equiparam-se ao do comércio e este foi abordado na análise do quadro anterior.

Tratando-se da limpeza como serviço institucional ou comercial contemporâneo, teremos para fins conceituais nesta análise os pressupostos de diversos pesquisadores, cujas definições se coadunam e encaram a limpeza como uma tarefa manual e/ou mecânica de remoção de poeira, lavagem, polimento, desinfecção e conservação de superfícies fixas como pisos, paredes e tetos, ou de móveis e equipamentos diversos, utilizando grande variedade de produtos químicos e tarefas podendo ser realizadas com ferramentas manuais como vassouras, rodo, mop, balde, pá, escova, esponja, pano, pulverizador ou com o auxílio de máquinas como aspirador de

pó, varredeira, enceradeira, máquina lavadora e extratora, entre outros (MAÇÃIRA, 2004, p. 5 - 6).

Deste modo, como atividade institucional e comercial, os profissionais de limpeza se enquadram dentro de uma classificação ocupacional econômica, apresentando uma codificação nacional e internacional para sua classe e as descrições gerais de suas atividades. Sob os códigos 5142 – 10 (Faxineiro - Auxiliar de limpeza) e 5142 – 25 (Trabalhador de serviços de manutenção de edifícios e logradouros) da Classificação Brasileira de Ocupações (CBO - 2002), temos a seguinte descrição para as condições gerais de exercício da atividade:

Trabalham em companhias e órgãos de limpeza pública, em condomínio de edifícios, em empresas comerciais e industriais, como assalariados e com carteira assinada; as atividades são realizadas em recintos fechados ou a céu aberto. Trabalham individualmente ou em equipe, com ou sem supervisão permanente. O horário de trabalho é variado, podendo ser diurno, noturno ou em regime de rodízio de turnos. Algumas das atividades podem ser exercidas em grandes alturas, subterrâneos ou em posições desconfortáveis por longos períodos, com exposição a ruído intenso e a poluição dos veículos (MTE; CBO 2002, p 599).

Considerado um serviço básico, os profissionais de limpeza inserem-se na nova dinâmica de relações de trabalho atuais, desempenhando suas atividades sob o jugo de empresas terceirizadas que, imersas na nova reestruturação do capitalismo, incorporaram e alocaram uma mão-de-obra desordenada e precarizada, cuja exploração da força de trabalho se manifesta num clima de negligência acerca da segurança e saúde dos trabalhadores. Frente a isto, torna-se imprescindível uma análise em torno deste modelo de alocação de trabalho, e sua relação com a segurança e medicina do trabalho (PADOVANI, 2011).

Conforme definido anteriormente, o conceito de limpeza se refere a um processo histórico-social, cuja finalidade é a remoção de sujidades em diversas superfícies, utilizando ferramentas manuais ou auxílio de máquinas de limpeza. Como atividade organizacional, os serviços de limpeza e conservação podem ser divididos em dois campos distintos de atuação: um direcionado a

estabelecimentos industriais, que incluem condomínios, diversas instituições, órgãos, empresas, dentre outros de caráter não industrial, direcionado mais para residências e domicílios.

E para cada um destes tipos de lugares, ainda podemos classificar o tipo de limpeza que será realizado, cuja finalidade corresponde diretamente aos objetivos a serem alcançados. Assim, podemos realizar uma limpeza concorrente ou diária, que visa somente remover as sujidades e repor os materiais de higiene ou uma limpeza mais específica de caráter terminal, geralmente voltada para hospitais, que envolve um processo mais profundo de limpeza e desinfecção, incluindo todas as superfícies, mobiliários e equipamentos.

Todavia, seja qual for o método utilizado, o processo de limpeza e conservação libera três tipos de energias diferentes: a química, a térmica e a mecânica. A energia química é fornecida pelos produtos de limpeza utilizados na atividade, ao passo que a térmica é fornecida pelo aquecimento da água e, por último, a energia mecânica provém da força manual empregada no ato da limpeza e também pelo uso de máquinas e equipamentos (PADOVANI, 2011).

Em termos de contaminação ambiental e perigo para a saúde dos envolvidos, o uso dos produtos químicos representam, por excelência, os principais riscos inerentes à atividade de limpeza e conservação. Estes produtos químicos são regulados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que os classifica na categoria saneantes, como, por exemplo: detergentes e seus congêneres, alvejantes, desinfetantes, desodorizantes, esterilizantes, algicidas e fungicidas para piscinas, desinfetante de água para o consumo humano, água sanitária, produtos biológicos, inseticidas, raticidas, jardinagem amadora, repelentes, dentre outros. Estabelece-se para cada produto regras técnicas de aplicação, manipulação, destinação e finalidade de emprego. Além disto, estes produtos se dividem em relação à sua aplicação e manipulação, como também pela sua destinação e finalidade de emprego. Assim, de acordo com as classificações da ANVISA, a aplicação dos produtos saneantes se destinam ao uso profissional e não profissional, no qual o profissional inclui os produtos que, por sua forma de apresentação, toxicidade e uso específico devem ser aplicados ou manipulados exclusivamente por profissionais treinados, capacitados ou por empresa especializada. Já os produtos de uso não profissional são os de pronta utilização, podendo ser manipulados por qualquer pessoa (PADOVANI, 2011, p. 602).

Embora pareça contraditório, o uso destes produtos de limpeza e conservação traz consigo um paradoxo na sua finalidade, uma vez que, ao promover a limpeza ambiental potencialmente podem também promover a contaminação ambiental, originada pelo uso dos produtos químicos em demasia, ou pela proliferação de microorganismos resistentes, que exercem em conjunto, um papel nocivo à saúde dos trabalhadores envolvidos na atividade, como também dos usuários dos ambientes que foram limpos.

Assim, esta problemática aumenta exponencialmente à medida que a cada ano são lançados no mercado novos produtos para a limpeza, cujas formulações e toxicidade são desconhecidas para o ser humano.

Portanto, dos desinfetantes aos limpadores de superfícies, passando pelos produtos de limpeza doméstica, as substâncias químicas presentes nestes produtos representam um coquetel potencialmente sensibilizante e irritante para as vias aéreas e/ou pele dos seres humanos. O fator desencadeante destes problemas se deve à presença de componentes denominados surfactantes ou tensoativos presentes nas formulações dos produtos de limpeza e conservação, que associados aos alérgenos biológicos de ambientes interiores, aumentam a sensibilização e a produção de anticorpos nas vias aéreas, desencadeando assim, a ocorrência de irritações e outros problemas respiratórios (PADOVANI, 2011).

Isto nos leva a crer que independente do ambiente ocupacional ou grau de exposição no qual estão sujeitos os trabalhadores da limpeza e conservação, os produtos químicos utilizados são potencialmente nocivos à saúde humana, podendo causar efeitos respiratórios por irritação direta ou por ação tóxica mediada imunologicamente.

Em geral, estes produtos entram em contato com as vias aéreas e cutâneas de diversas formas, uma vez que, dada a natureza das atividades executadas, coexistem condições para a ocorrência de situações de inalação de gases e vapores (PADOVANI, 2011).

Ainda para o autor, no tocante à atividade de limpeza e conservação, as doenças respiratórias e afecções correlatas advêm, em sua grande maioria, da inalação de gases e vapores oriundos dos produtos químicos de limpeza, no

qual a asma e a rinite encabeçam a lista das ocorrências de maior número nos ambulatórios médicos de saúde ocupacional.

Correlato a estas, que são oriundas da exposição aos produtos químicos, ainda se constata outra situação de igual risco para a saúde dos trabalhadores da limpeza, verificada no desenvolvimento de doenças cutâneas que, embora pareça à primeira vista de pouca gravidade, acarretam grande impacto na qualidade de vida e produção dos acometidos. As denominadas Dermatoses ocupacionais constituem atualmente uma grande parcela das doenças profissionais que prevalecem entre os trabalhadores da limpeza e conservação, representando um desafio para os especialistas devido à complexidade de identificação e diagnósticos corretos (PADOVANI, 2011).

Cada vez mais e com crescente rigor, o ritmo de trabalho imposto a esta classe de profissionais tem gerado condições propícias para o desenvolvimento de inúmeras doenças ocupacionais, destacando-se dentre elas, a manifestação das Lesões por Esforços Repetitivos (LER) ou os Distúrbios Osteomusculares Relacionados ao Trabalho (DORT). Diretamente vinculadas à execução de atividades repetitivas e desconfortáveis, as LER/DORT encontraram um campo fértil no ramo de limpeza e conservação, haja vista que, esta atividade caracteriza-se por uma demanda laboral dinâmica e intensiva, exigindo movimentos manuais repetitivos e desconfortáveis para o trabalhador.

Portanto, os profissionais da limpeza e conservação apresentam aspectos favoráveis no exercício de suas atividades para o desenvolvimento destes distúrbios músculo-esqueléticos, devidos à variedades de tarefas empreendidas e a presença de posturas incômodas, além do emprego excessivo de força, repetitividade e insuficiência de repouso nos locais de trabalho (PADOVANI, 2011).

No estudo de Cangussu (2014), prevaleceu o trabalho de Empregada Doméstica dentre as demais áreas ocupacionais, conforme relato abaixo das entrevistadas no estudo:

As empregadas domésticas são muitas, por ser uma área muito carente. Se queixam de problemas de coluna por conta da postura para executar suas atribuições, de acidentes como quedas e cortes e do peso que às vezes precisam carregar, além de intoxicação na utilização dos produtos de limpeza,

principalmente aquele azulin ... Elas falam que trabalham muito pra ganhar pouco e ainda sofrem vários tipos de humilhações...”. “Elas saem pra trabalhar e os filhos ficam em casa, elas vão preocupadas em deixá-los e acabam não fazendo o serviço direito, ficam descobertas porque não tem um lugar adequado para deixar o filho, aí ela vai pro serviço mas a mente dela tá lá na casa, já teve mãe de receber notícia do filho que sofreu acidente, ela sai de lá as pressas preocupada [...]”. (CANGUSSU, 2014, p 88).

Com relação à identificação dos riscos, estes foram apresentados de várias maneiras pelas trabalhadoras. Algumas relataram o espaço doméstico como um local seguro, não conseguindo identificar seus riscos, outras perceberam a existência de riscos de acidente, tais como: riscos de quedas (presentes na limpeza interna e externa de janelas, no uso de escadas em geral e no trabalho em piso úmido e ensaboado) e riscos de cortes e queimaduras, além de torções em membros inferiores e adoecimentos (IRIART *et al* 2008).

O fato de estes acidentes terem ocorrido em residências contribui para que as trabalhadoras os identifiquem como “normais”, entendendo o mesmo como uma fatalidade. Neste olhar, a culpabilidade do acidente volta-se ao trabalhador, deixando o empregador livre de qualquer responsabilidade. Os adoecimentos mencionados foram: dores de coluna e lombares, bursite, dores nas pernas, inchaços no joelho e alergia aos produtos de limpeza. Como mecanismo de enfrentamento, o trabalho em questão sugere a elaboração de estratégias que proporcionem a valorização social desta atividade laboral e o respeito aos direitos trabalhistas já garantidos por lei (Iriart *et al*, 2008).

Para Sanches (2009), o trabalho doméstico é considerado um dos mais precários existentes, apresentando baixas remunerações, más condições de trabalho, altos riscos à saúde e integridade física das trabalhadoras. Menciona-se como riscos identificados nesta profissão, a utilização de produtos químicos, fogo, riscos de altura e eletricidade, além de apresentar altos níveis de assédio sexual e moral.

Nesse sentido, apreender as condições de trabalho é um desafio dialético, materialmente necessário, para qualificar a questão dos eventos adversos à saúde do trabalhador, o conhecimento sobre o que ocorre e o que

pode acontecer em um sistema produtivo é de extrema importância para analisar os eventos, compreender os riscos, além de nortear a implementação de normas de segurança para a saúde do trabalhador.

Conforme os dados do quadro 12, referentes ao período de 2013 e 2014, destacam-se as principais doenças segundo a lista de morbidade CID - 10 nas Unidades de Saúde universo desta pesquisa, a saber: as doenças do aparelho circulatório com 8.138 ocorrências, os transtornos mentais e comportamentais com 4.746, seguido das doenças endócrinas nutricionais e metabólicas com 4.730, as doenças do aparelho respiratório com 3185 e doenças do sistema Osteomuscular e tecido conjuntivo com 2.311.

Quadro 12. Doenças segundo a CID – 10 das cinco Unidades de Saúde da Família do Distrito Sanitário Sul- listadas em 2013 e 2014.

Lista Morbidade CID -10	UBSF Lagoinha I		BSF Santa Luzia		UBSF São Gabriel		UBSF São Jorge II		UBSF Seringueira II		Total
	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	
Algumas doenças infecciosas e parasitárias	555	320	225	53	58	23	236	113	117	55	1755
Neoplasias (Tumores)	21	17	60	00	00	00	17	15	00	05	135
Doenças de Sangue, órgãos hematológicos e transtornos imunitários	64	40	24	10	03	02	36	39	01	08	227
Doenças endócrinas nutricionais e metabólicas	1099	389	330	292	414	160	974	922	90	63	4733
Transtornos mentais e comportamentais	997	340	344	136	455	201	1164	726	303	80	4746
Doenças do sistema nervoso	306	96	70	04	52	14	133	99	13	15	802
Doenças do olho e anexos	53	26	61	06	09	04	55	30	40	13	297
Doenças do ouvido e apófise mastóide	217	83	126	21	32	05	70	68	29	14	665
Doenças do Aparelho Respiratório	866	370	350	140	261	53	573	332	151	89	3185
Doenças do	2377	954	319	333	607	286	1546	1152	420	144	8138

aparelho circulatório											
Doenças do aparelho digestivo	247	89	135	04	24	03	286	220	18	31	1057
Doenças de pele e do Tecido subcutâneo	177	63	105	00	42	13	146	94	21	36	697
Doenças do sist. Osteomuscular e do tecido conjuntivo	453	183	424	62	80	26	502	268	218	95	2311
Doenças do aparelho geniturinário	421	170	192	102	120	19	352	208	90	73	1747
Gravidez parto e puerpério	10	13	14	00	00	01	19	24	04	06	91
Algumas afecções originadas no período perinatal	03	04	00	00	02	00	00	01	00	00	10
Malformações congênitas, deformidades e anomalias cromossômicas	02	01	07	00	01	02	03	03	02	01	22
Sintomas, sinais e achados anormais exame clínico e laboratoriais	437	164	419	42	136	35	228	126	103	25	1715
Lesões, envenenamento e alguma outra Consequência e causas externas	100	37	106	20	18	05	73	25	50	22	456
Causas externas de morbidade e mortalidades	04	07	01	00	00	00	07	02	00	01	22
Contatos com os serviços de saúde	4621	2914	4178	1867	3362	1633	5045	4443	6875	2466	37404

Fonte: Secretaria Municipal de Saúde- Sistema de Gestão em Saúde – FASTMEDIC (2013-2014).

Ao analisarmos os dados referente a 8.138 ocorrências de doenças do aparelho circulatório, referente as UBSFs do estudo, percebe-se um alto número de doenças relacionadas a este grupo.

De acordo com Brasil (2001), aborda que apesar da crescente valorização dos fatores pessoais, como sedentarismo, tabagismo e dieta, na determinação das doenças cardiovasculares, pouca atenção tem sido dada aos fatores de risco presentes na atividade ocupacional atual ou anterior dos pacientes. O aumento dramático da ocorrência de transtornos agudos e crônicos do sistema cardiocirculatório na população faz com que as relações das doenças com o trabalho mereçam maior atenção.

Observa-se, por exemplo, que a literatura médica e a mídia têm dado destaque às relações entre a ocorrência de infarto agudo do miocárdio, doença coronariana crônica e hipertensão arterial, com situações de estress e a condição de desemprego, entre outras.

No Brasil, as doenças cardiovasculares representam a primeira causa de óbito, correspondendo a cerca de um terço de todas as mortes. A participação das doenças cardiovasculares na mortalidade do país vem crescendo desde meados do século XX. Em 1950, apenas 14,2% das mortes ocorridas nas capitais dos estados brasileiros eram atribuídas a moléstias circulatórias. Passaram a 21,5% em 1960, 24,8% em 1970 e 30,8% em 1980. Em 1990, as doenças cardiovasculares contribuíram com cerca de 32% de todos os óbitos nas capitais dos estados brasileiros. Além de contribuírem de modo destacado para a mortalidade, as moléstias do aparelho circulatório são causas freqüentes de morbidade, implicando 10,74 milhões de dias de internação pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e representando a principal causa de gastos em assistência médica, 16,2% do total (LOTUFO & LOLIO, 1995).

Entre as causas de aposentadoria por invalidez, os estudos disponíveis mostram que a hipertensão arterial destaca-se em primeiro lugar, com 20,4% das aposentadorias, seguida dos transtornos mentais (15%), das doenças osteoarticulares (12%) e de outras doenças do aparelho cardiocirculatório, com 10,7%. Assim, as doenças cardiovasculares ocupam o primeiro e o quarto lugar de todas as causas de aposentadoria por invalidez e, juntas, representam

quase um terço de todas as doenças que provocam incapacidade laborativa total e permanente (MEDINA, 1986).

A prevenção das doenças do sistema circulatório relacionadas ao trabalho está baseada nos procedimentos de vigilância em saúde do trabalhador, vigilância epidemiológica dos agravos à saúde e vigilância dos ambientes e condições de trabalho. Utiliza conhecimentos médico-clínicos, de antropologia, epidemiologia, higiene ocupacional, toxicologia, ergonomia, psicologia, entre outras disciplinas, valoriza a percepção dos trabalhadores sobre seu trabalho e a saúde e considera as normas técnicas e regulamentos vigentes.

O estabelecimento da relação causal ou do nexo entre um determinado evento de saúde – dano ou doença – individual ou coletivo, potencial ou instalado, e uma dada condição de trabalho constitui a condição básica para a implementação das ações de Saúde do Trabalhador nos serviços de saúde. De modo esquemático, esse processo pode se iniciar pela identificação e controle dos fatores de risco para a saúde presentes nos ambientes e condições de trabalho e/ou a partir do diagnóstico, tratamento e prevenção dos danos, lesões ou doenças provocados pelo trabalho, no indivíduo e no coletivo de trabalhadores.

Os trabalhadores compartilham os perfis de adoecimento e morte da população em geral, em função de sua idade, gênero, grupo social ou inserção em um grupo específico de risco. Além disso, os trabalhadores podem adoecer ou morrer por causas relacionadas ao trabalho, como consequência da profissão que exercem ou exerceram, ou pelas condições adversas em que seu trabalho é ou foi realizado. Assim, o perfil de adoecimento e morte dos trabalhadores resultará da amalgamação desses fatores, que podem ser sintetizados em quatro grupos de causas (MENDES & DIAS, 1999):

- doenças comuns, aparentemente sem qualquer relação com o trabalho;
- doenças comuns (crônico-degenerativas, infecciosas, neoplásicas, traumáticas, etc.) eventualmente modificadas no aumento da frequência de sua ocorrência ou na precocidade de seu surgimento em trabalhadores, sob

determinadas condições de trabalho. A hipertensão arterial em motoristas de ônibus urbanos, nas grandes cidades, exemplifica esta possibilidade;

- doenças comuns que têm o espectro de sua etiologia ampliado ou tornado mais complexo pelo trabalho. A asma brônquica, a dermatite de contato alérgica, a perda auditiva induzida pelo ruído (ocupacional), doenças músculo-esqueléticas e alguns transtornos mentais exemplificam esta possibilidade, na qual, em decorrência do trabalho, somam-se (efeito aditivo) ou multiplicam-se (efeito sinérgico) as condições provocadoras ou desencadeadoras destes quadros nosológicos;

- agravos à saúde específicos, tipificados pelos acidentes do trabalho e pelas doenças profissionais. A silicose e a asbestose exemplificam este grupo de agravos específicos.

Os três últimos grupos constituem a família das doenças relacionadas ao trabalho. A natureza dessa relação é sutilmente distinta em cada grupo. O quadro 13 resume e exemplifica os grupos das doenças relacionadas de acordo com a classificação proposta por Schilling (1984).

GRUPO I: doenças em que o trabalho é causa necessária, tipificadas pelas doenças profissionais, *stricto sensu*, e pelas intoxicações agudas de origem ocupacional.

GRUPO II: doenças em que o trabalho pode ser um fator de risco, contributivo, mas não necessário, exemplificadas pelas doenças comuns, mais freqüentes ou mais precoces em determinados grupos ocupacionais e para as quais o nexo causal é de natureza eminentemente epidemiológica. A hipertensão arterial e as neoplasias malignas (cânceres), em determinados grupos ocupacionais ou profissões, constituem exemplo típico.

GRUPO III: doenças em que o trabalho é provocador de um distúrbio latente, ou agravador de doença já estabelecida ou preexistente, ou seja, concausa, tipificadas pelas doenças alérgicas de pele e respiratórias e pelos distúrbios mentais, em determinados grupos ocupacionais ou profissões.

Entre os agravos específicos estão incluídas as doenças profissionais, para as quais se considera que o trabalho ou as condições em que ele é realizado constituem causa direta. A relação causal ou nexo causal é direta e imediata. A eliminação do agente causal, por medidas de controle ou

substituição, pode assegurar a prevenção, ou seja, sua eliminação ou erradicação. Esse grupo de agravos, Schilling I, tem, também, uma conceituação legal no âmbito do SAT da Previdência Social e sua ocorrência deve ser notificada segundo regulamentação na esfera da Saúde, da Previdência Social e do Trabalho.

Quadro 13. Classificação das Doenças Segundo sua Relação com o Trabalho.

Categoria	Exemplos
I - Trabalho como causa necessária	Intoxicação por chumbo Silicose Doenças profissionais legalmente reconhecidas
II - Trabalho como fator contributivo, mas não necessário –	Doença coronariana Doenças do aparelho locomotor Câncer Varizes dos membros inferiores
III - Trabalho como provocador de um distúrbio latente, ou agravador de doença já estabelecida	Bronquite crônica Dermatite de contato alérgica Asma Doenças mentais

FONTE: Adaptado de Schilling, 1984.

Os outros dois grupos, Schilling II e III, são formados por doenças consideradas de etiologia múltipla, ou causadas por múltiplos fatores de risco. Nessas doenças comuns, o trabalho poderia ser entendido como um fator de risco, ou seja, um atributo ou uma exposição que estão associados com uma probabilidade aumentada de ocorrência de uma doença, não necessariamente um fator causal (LAST, 1995).

Portanto, a caracterização etiológica ou nexo causal será essencialmente de natureza epidemiológica, seja pela observação de um excesso de frequência em determinados grupos ocupacionais ou profissões, seja pela ampliação quantitativa ou qualitativa do espectro de determinantes causais, que podem ser melhor conhecidos a partir do estudo dos ambientes e das condições de trabalho.

A eliminação desses fatores de risco reduz a incidência ou modifica o curso evolutivo da doença ou agravo à saúde. Classicamente, os fatores de risco para a saúde e segurança dos trabalhadores, presentes ou relacionados

ao trabalho, podem ser classificados em cinco grandes grupos (BRASIL, 2001, p.277).

Físicos: ruído, vibração, radiação ionizante e não-ionizante, temperaturas extremas (frio e calor), pressão atmosférica anormal, entre outros;

Químicos: agentes e substâncias químicas, sob a forma líquida, gasosa ou de partículas e poeiras minerais e vegetais, comuns nos processos de trabalho;

Biológicos: vírus, bactérias, parasitas, geralmente associados ao trabalho em hospitais, laboratórios e na agricultura e pecuária;

Ergonômicos e Psicossociais: decorrem da organização e gestão do trabalho, como, por exemplo: da utilização de equipamentos, máquinas e mobiliário inadequados, levando a posturas e posições incorretas; locais adaptados com más condições de iluminação, ventilação e de conforto para os trabalhadores; trabalho em turnos e noturno; monotonia ou ritmo de trabalho excessivo, exigências de produtividade, relações de trabalho autoritárias, falhas no treinamento e supervisão dos trabalhadores, entre outros;

Mecânicos e de Acidentes: ligados à proteção das máquinas, arranjo físico, ordem e limpeza do ambiente de trabalho, sinalização, rotulagem de produtos e outros que podem levar a acidentes do trabalho.

Diante do exposto, é possível a partir do levantamento do perfil ocupacional, a equipe de Saúde da Família, elaborar a teorização dos riscos à saúde dos profissionais objetos deste estudo, os quais manipulam produtos químicos, produtos de beleza e produtos de alimento; dos que exercem as atividades domiciliares no ramo de cabelereira/manicure/salão de beleza, no ramo de costureiras e no ramo de alimentos e nas ocupações individuais: serviços gerais, vendedores, doméstica, atendente, pedreiro e comerciante; riscos estes dos ambientes e processos de trabalho, a exemplo explicitaremos no quadro a seguir, os fatores de risco físico, químico, biológico, ergonômico, psicológico e de acidente, apenas dos profissionais de salão de Beleza e serviços gerais.

Quadro 14. Riscos à saúde dos trabalhadores dos salões de beleza do território da Região Sul do município de Uberlândia – MG

Físico	Químico De Acidente	Biológico	Ergonômico	Psicológico	De Acidente

Ruído	Risco de intoxicação na manipulação dos produtos químicos, como os alisantes e tinturas.	Intoxicação na manipulação dos produtos químicos, como os alisantes e tinturas. Risco de acidente com material perfuro cortante, no caso de manicures e podólogas.	Movimentos repetitivos, trabalho muito tempo em pé, postura inadequada, sobrecarga de trabalho	Vínculo empregatício precário, incerteza do futuro, ambientes com sobrecarga de trabalho e acúmulo de tarefas, pressão para realizá-las (jornada de trabalho intensa) pressão por produtividade	Queimadura no manuseio de aparelhos em temperatura elevada.
-------	--	--	--	---	---

Quadro 15. Riscos à saúde dos trabalhadores de Serviços Gerais do território da região sul do município de Uberlândia-MG

Físico	Químico De Acidente	Biológico	Ergonômico	Psicológico	De Acidente
Ruído, umidade, iluminação	Risco de intoxicação na manipulação dos produtos químicos	Sujidades no ambiente de trabalho	Postura corporal inadequada, movimentos repetitivos, sobrecarga de trabalho e acúmulo de tarefas	Vínculo empregatício precário, ambientes com sobrecarga de trabalho e acúmulo de tarefas, pressão para realizá-las,	Ambiente de trabalho desorganizado, ausência de utilização do EPI ou utilização incorreta, queda

Observam-se semelhanças entre os riscos à saúde dos profissionais de salão de beleza e dos serviços Gerais, ocasionados pelo ambiente e processo de trabalho a que estes trabalhadores estão expostos. Dentre eles, riscos ergonômicos, psicológicos e de acidentes, ocasionados por: ambientes com sobrecarga de trabalho e acúmulo de tarefas, pressão para realizá-las, trabalho muito tempo em pé, ausência de autonomia no planejamento e execução das

tarefas, ausência de treinamento e capacitação profissional, de organização das atividades, mobiliários inadequados, utilização de materiais e equipamentos obsoletos e estruturas físicas precárias.

No segundo momento, é preciso fazer o estudo sobre quais agravos à saúde os riscos mencionados podem ocasionar. Dentre eles, o estudo abordará sobre a Perda Auditiva Induzida pelo Ruído – PAIR, Distúrbio Osteomuscular Relacionado ao Trabalho – DORT, Intoxicação Exógena, Acidente de Trabalho Grave - ATG e Acidente de Trabalho em Crianças e Adolescentes, Acidente com Exposição ao Material Biológico – AEMB, Dermatoses Ocupacionais, Pneumoconiose, Câncer Relacionado ao Trabalho e Transtorno Mental Relacionado ao Trabalho. Abaixo exemplificamos os possíveis agravos nas ocupações de profissionais dos salões de beleza e serviços gerais.

Nos dois processos de trabalho mencionados é identificado a possibilidade da ocorrência dos agravos: Transtornos Mentais Relacionados ao Trabalho, Acidentes de Trabalho, Intoxicações Exógenas e LER/DORT. A probabilidade da ocorrência do Acidente com Exposição ao Material Biológico identifica-se no trabalho das manicures e podólogas. As Dermatoses Ocupacionais são relacionadas no trabalho dos serviços gerais.

Ao analisar a tabela dos riscos, elaborados anteriormente, com os respectivos agravos que estes podem ocasionar, percebe-se que os transtornos mentais e comportamentais são identificados nos profissionais de salão de beleza e profissionais de serviços gerais, correlacionando no estudo das doenças segundo CID -10 estes transtornos representam um valor de 4.746 pessoas. Importante se faz a análise e estudos das outras ocupações individuais, seus possíveis riscos e agravos e correlacionar com o adoecimento desta população, segundo a CID 10 levantadas no quadro 12.

Ainda podemos destacar que os fatores de adoecimento relacionados à organização do trabalho, em geral considerados nos riscos ergonômicos, podem ser identificados em diversas atividades, desde a agricultura tradicional até processos de trabalho modernos que incorporam alta tecnologia e sofisticadas estratégias de gestão. Os processos de reestruturação produtiva e globalização da economia de mercado, em curso, têm acarretado mudanças

significativas na organização e gestão do trabalho com repercussões importantes sobre a saúde do trabalhador. Entre suas consequências destacam-se os problemas osteomusculares e o adoecimento mental relacionados ao trabalho, que crescem em importância em todo o mundo.

A exigência de maior produtividade, associada à redução contínua do contingente de trabalhadores, à pressão do tempo e ao aumento da complexidade das tarefas, além de expectativas irrealizáveis e as relações de trabalho tensas e precárias, constituem fatores psicossociais responsáveis por situações de estresse relacionado ao trabalho.

Percebe-se que é necessário o aprofundamento do estudo epidemiológico, o qual deve ser objeto das equipes do PSF a análise e planejamento territorial a partir de todas estas informações estudadas, a fim de que o foco seja a prevenção do adoecimento da população com um olhar não só na queixa mas um olhar correlacionado com a ocupação profissional desta população, mapeando os riscos das ocupações de maior prevalência e seus possíveis agravos, intervindo com ações preventivas.

Este tema de grande importância surgiu neste estudo, pela necessidade de estabelecimento do nexo entre adoecimento e trabalho, onde há a necessidade dos profissionais da saúde da Atenção Básica, no atendimento ao usuário, sempre perguntarem a ocupação, o ramo de atividade do trabalhador, pois estas informações que permitem a identificação do acidente ou doença.

Segundo Cangussu (2014), sem a realização do nexo não há notificação dos agravos relacionados e a ausência desta, por sua vez, impossibilita a informação para a intervenção, através das ações de vigilância nos ambientes e processos de trabalho. Há invisibilidade do processo saúde-trabalho-doença, principalmente quando se refere a trabalhadores informais.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo objetivou identificar o perfil de saúde dos trabalhadores e os processos produtivos, bem como os principais agravos e situações de riscos relacionados ao trabalho formal e informal nos territórios das Unidades Básicas de Saúde da Família, no setor Sul, em Uberlândia/MG.

E tendo em mãos os dados, coube analisá-los e agrupá-los, obtendo assim, êxito no objetivo proposto.

Além disso, a análise do referencial teórico apresentado permitiu compreender a importância do diagnóstico do perfil ocupacional e da relação saúde-doença no planejamento e execução das ações de saúde, em especial de saúde do trabalhador, visto que é a partir deste conhecimento e identificação que podemos propor medidas de prevenção e promoção.

Igualmente, a apropriação do conhecimento do perfil produtivo identificado a partir das atividades produtivas desenvolvidas no território, contribuirá para que os profissionais do Programa de Saúde da Família possam efetivar a implementação da Política Nacional de Saúde do Trabalhador e da Trabalhadora - PNSTT no SUS.

Também, foi relevante utilizar os dados secundários nas fichas do Consolidado do Perfil Ocupacional da ESF/PACS referente ao ano de 2013, pois percebeu-se a riqueza das informações ao analisar as variáveis e fazer o tratamento dos dados brutos em consonância com o marco teórico.

Por certo, o estudo compreende o predomínio nos territórios de atuação das equipes dos riscos potenciais em relação às atividades produtivas domiciliares e às ocupações. E tais atividades produtivas, os riscos para a saúde delas decorrentes, o perfil epidemiológico da população trabalhadora, devem ser consideradas no planejamento das ações de vigilância e assistência à saúde, pelas Unidades de Saúde, e permitiu responder às questões propostas inicialmente.

O diagnóstico situacional trouxe informações do território em estudo relativas aos dados de atividades produtivas e indicadores de saúde, sendo identificada a prevalência de atividades domiciliares informais, nos vários ramos de atividade (Comércio/vendas, Cabeleireira/Manicure/Salão beleza, Costureiras e atividades domiciliares no ramo de Alimentos). Estudos citados mostraram que as várias atividades profissionais apresentam riscos à saúde, podendo ocasionar doenças ocupacionais.

Com relação à ocupação individual e sua consequente relação com a saúde, pode-se destacar que as principais ocupações são os Serviços Gerais e

as Domésticas e considera-se prioritária a intervenção nestas ocupações devido aos riscos e agravos relacionados à atividade.

A pesquisa revelou que a maioria dos trabalhadores da região sul de Uberlândia encontram-se na situação de informalidade no domicílio e sujeitos a condições extremamente insalubres e perigosas, geralmente invisíveis aos órgãos fiscalizadores (por não existirem legalmente) e grande parte das vezes ao SUS, que não tem relacionado o acidente ou adoecimento à ocupação do usuário trabalhador.

Além disso, no caso do trabalho domiciliar, também estão sujeitos não só o trabalhador mas há à exposição da família aos riscos, que, ainda que não estejam trabalhando, estão inseridos neste mesmo ambiente laboral, grande parte, sequer tendo conhecimento dos riscos a que estão expostos.

Percebe-se no marco teórico, que os trabalhadores informais encontram-se desamparados, tendo como única esperança, a efetivação das políticas públicas do SUS, que se propõe a atenção integral à saúde dos trabalhadores, independente do vínculo empregatício, através do princípio da universalidade. Mas ainda há caminhos a serem percorridos até que essa legislação possa ser vivenciada na prática, assim como deve ser.

Para tanto se faz necessário identificar os desafios existentes, readequando-os em busca da superação. Esta análise deve ser iniciada pela Atenção Básica à Saúde, porta de entrada do SUS, através da Estratégia Saúde da Família dos territórios em estudo.

Importante ressaltar que os Agentes Comunitários de Saúde, contribuíram com a coleta de dados, e diagnóstico situacional, portanto se faz importante o retorno da análise destes dados, para que haja uma participação efetiva, já que os mesmos conhecem bem a realidade dos trabalhadores locais. E com base nestes resultados, faz-se necessário dar um *feedback* do estudo final e elaborar coletivamente com as Unidades de Saúde e Cerest, um adequado planejamento das futuras ações de intervenção em Saúde do Trabalhador.

Todavia, muitas informações não são analisadas e aproveitadas pela equipe da ESF no planejamento de suas ações, tendo em vista a alta demanda de metas a serem cumpridas e assim comprometendo o planejamento e

realização de atividades que tenham como base as informações trazidas do território. No cotidiano das práticas de saúde destes serviços, o papel do trabalho enquanto determinante do processo saúde-doença dos indivíduos não está incorporada de forma sistematizada.

Nesse contexto, verifica-se que há lacuna no processo de geração de dados e análise pelas equipes das Unidades de Saúde, sendo o momento de fortalecer o papel do CEREST nesta rede, onde se deve valorizar o planejamento de ações a partir do mapeamento das atividades produtivas e do perfil dos usuários trabalhadores nos território da Atenção Básica à saúde, porta de entrada do SUS e espaço de implementação da PNSTT.

Para tanto, faz-se necessário que o CEREST invista seus esforços ao apoio matricial e educação permanente com o objetivo de instrumentalizar e sensibilizar estas equipes em ações de promoção, prevenção e vigilância, que deverá ocorrer através de participações intra e intersetoriais, nos territórios adscritos.

A Portaria da RENAST, vigente, define como papel dos CEREST o apoio técnico na implantação de ações de ST nos serviços do SUS. Considerando que a APS é o contato preferencial do usuário, uma das principais estratégias do CEREST para facilitar a consolidação do cuidado integral aos trabalhadores no SUS, é o suporte técnico aos profissionais e a contribuição ao estabelecimento dos fluxos e protocolos para a atenção aos usuários.

Enfim, se tomarmos como referência os três eixos de atuação – Promoção, Proteção e Vigilância e a Assistência à Saúde - para se alcançar a integralidade da atenção, é possível identificar em cada um deles, ações essenciais de Saúde do Trabalhador.

No eixo da Promoção da Saúde - reconhecer o trabalho como oportunidade de saúde considerando que não existe doença inerente ao trabalho, mas que a forma de inserção no “mundo do trabalho” é um dos componentes básicos da determinação social do processo saúde-doença. Nesse sentido, é essencial empoderar os trabalhadores para que eles participem do cuidado – individual e coletivamente - da saúde e das lutas pela melhoria das condições de vida e trabalho.

No eixo da Proteção e Vigilância da Saúde: reconhecer a presença de perigos e de riscos para a saúde e o ambiente, para antecipar e prevenir os danos e mudar os processos de trabalho geradores de doença e morte evitáveis.

No eixo da Assistência à Saúde: conhecer as atividades produtivas desenvolvidas e o perfil dos trabalhadores que vivem e trabalham em um dado território de saúde, para planejar adequadamente as ações de vigilância e de assistência à saúde, estabelecendo, quando presente, a relação entre o adoecimento e o trabalho e desencadear os desdobramentos legais, trabalhistas e previdenciários cabíveis.

Efetivamente é necessário promover pactuações de ações de Vigilância e Assistência, nos níveis mais complexos da rede; bem como desenvolver, com o apoio das referências técnicas em ST do CEREST, projetos específicos voltados para a melhoria das condições de trabalho nas atividades produtivas, em especial as desenvolvidas nos espaços domiciliares; informar as famílias e aos trabalhadores, utilizando estratégias de comunicação de risco e de educação ambiental, sobre os riscos potenciais em relação às atividades produtivas domiciliares e às ocupações; promover a qualificação e educação permanente dos profissionais da ABS em ST, incentivando o trabalho multidisciplinar e interinstitucional; no cuidado e atenção integral à Saúde do Trabalhador e garantir no acolhimento e nas consultas clínicas na UBS seja identificada a condição de trabalhador e ou a ocupação do usuário no cadastro e nos atendimentos na UBSF a suspeita e ou o estabelecimento da relação entre o agravo ou doença com a situação de trabalho e estruturar a linha de cuidado por meio da elaboração de protocolos – linhas guia – e definir fluxos para a assistência e a vigilância.

Ainda, efetivar e valorizar a educação permanente em saúde, por meio de instrumentos informativos e processos de formação sobre saúde do trabalhador e políticas de saúde para entidades e lideranças sindicais, profissionais, gestores e conselheiros, visando ao fortalecimento de sua atuação no controle social do SUS.

Além da formação dos recursos humanos, seria importante a implementação de um sistema logístico de informatização da comunicação ágil, que integrasse os diversos setores envolvidos nas políticas públicas de saúde do trabalhador.

Importante se faz, ao estabelecer o elenco de ações de Saúde do Trabalhador que deverão ser desenvolvidas, definidas a partir do diagnóstico da situação de saúde baseado no perfil produtivo e perfil epidemiológico dos agravos relacionados ao trabalho, inserir nos instrumentos de gestão do SUS, a exemplo nos Planos Municipais de Saúde, que serão submetidos à deliberação dos respectivos Conselhos de Saúde.

Por fim, consideramos que esta pesquisa possa subsidiar futuras investigações, pois há de se fazer estudos mais aprofundados da relação do adoecimento e riscos à saúde com os processos de trabalho.

Além disso, faz-se necessário também analisar a situação da saúde dos trabalhadores nos demais territórios da cidade, a fim de contribuir com o planejamento de ações a estas questões, que realmente venha de encontro à necessidade da população.

Espera-se que a discussão contribua com a efetiva implementação da Política Nacional de Saúde do Trabalhador e da Trabalhadora (PNSTT) no SUS, percebendo que apesar de todos os esforços do CEREST Regionais neste sentido, e de vários avanços alcançados desde a Constituição Federal de 1988, ainda hoje são muitos os desafios a serem superados.

O Sistema Único de Saúde deve encarregar-se do papel de vigilância da saúde dos trabalhadores, assim como da integração das políticas internas da saúde que afetam o trabalho. Os Centros de Referência em Saúde do Trabalhador devem ser compreendidos como pólos irradiadores, no âmbito de um determinado território, da cultura especializada, subentendida na relação processo de trabalho – processo saúde/doença, assumindo a função de suporte técnico e científico desse campo do conhecimento. Suas atividades só fazem sentido se articuladas com os demais serviços da rede do SUS, orientando-os e fornecendo retaguarda às suas práticas, de forma que os agravos à saúde relacionados ao trabalho possam ser atendidos em todos os níveis de atenção do SUS, de forma integral e hierarquizada.

REFERÊNCIAS

ALVES, A. E. S., CUNHA, T. R.A.. Memória do trabalho domiciliar e gênero. In: Seminário Internacional Fazendo Gênero: Diásporas, Diversidades, Deslocamentos Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2010. p. 1-10.

ANTUNES, R. *Os modos de ser da informalidade: rumo a uma nova era da precarização estrutural do trabalho?* Serv. soc. soc. São Paulo, n. 107, p. 405-419, 2011.

BRAGA TS. A ocupação informal na região metropolitana de Salvador: uma análise das décadas de oitenta e noventa. In: *8º Encontro da Associação Brasileira de Estudos Populacionais*. Ouro Preto. Ouro Preto: Associação Brasileira de Estudos Populacionais, 2002.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Referência técnica para o funcionamento dos serviços de estética e embelezamento sem responsabilidade médica*. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2009.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC nº 49, de 31 de outubro de 2013*. Dispõe sobre a regularização para o exercício de atividade de interesse sanitário do microempreendedor individual, do empreendimento familiar rural e do empreendimento econômico solidário e dá outras providências. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0049_31_10_2013.html Acesso em: 10 jul. 2016.

BRASIL. Constituição (1988). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF: Senado Federal, 1988.

BRASIL. Decreto nº 7.602, de 7 de novembro de 2011. Dispõe sobre a Política Nacional de Segurança e Saúde no Trabalho - PNSST. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 7 nov. 2011. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2011/Decreto/D7602.htm. Acesso em: 10 ago. 2016

BRASIL. *Diretrizes para Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos*. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília: Casa Civil, 1990.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Área Técnica de Saúde do Trabalhador Saúde do trabalhador. *Cadernos de Atenção Básica*. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação de Saúde da Comunidade. Saúde da Família: uma estratégia para a reorientação do modelo assistencial. *Diário Oficial da União*. Brasília: Ministério da Saúde, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política nacional de atenção básica / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, *Departamento de Atenção à Saúde*. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Política Nacional de Saúde do Trabalhador para o SUS*. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. 3ª Conferência Nacional de Saúde do Trabalhador: 3ª CNST: *Trabalhar, sim! adoecer, não!*. : coletânea de textos. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. *Política Nacional de Promoção da Saúde*., Brasília: Ministério da Saúde, 2005. Disponível em: <www.saude.gov.br>. Acesso em: 20 jul. 2016.

BRASIL. Portaria n. 1.823 de 23 de agosto de 2012. Institui a Política Nacional de Saúde do trabalhador e da Trabalhadora. *Diário Oficial da União*. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Portaria nº 2.488/ GM, de 21 de outubro de 2011. Aprova a Política Nacional de Atenção Básica, estabelecendo a revisão de diretrizes e normas para a organização da Atenção Básica, para a Estratégia Saúde da Família (ESF) e o Programa de Agentes Comunitários de Saúde (PACS). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Portaria nº 3.120, de 1º de julho de 1998. Instrução Normativa de Vigilância em Saúde do Trabalhador no SUS. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília: Ministério da Saúde, 1998.

BRASIL, PORTARIA nº 3.252 de 22 de dezembro de 2009. Aprova as diretrizes para execução e financiamento das ações de Vigilância em Saúde pela União, Estados, Distrito Federal e Municípios e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. PORTARIA nº 4.279, de 30 de dezembro de 2010. Estabelece diretrizes para a organização da Rede de Atenção à Saúde no âmbito do Sistema Único de Saúde. *Diário Oficial da União*, Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRAVO, Maria Inês Sousa. et al. *Saúde e Serviço Social*. 3. ed. São Paulo: Cortez; Rio de Janeiro: UERJ, 2007.

BRITTO, M. das G. M. *Obrigatoriedade da licença para funcionamento em salões de beleza no Distrito Federal*. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/rdisan/article/view/79841>. Acesso em: 20 ago. 2016.

CANGUSSU, B. M. A categoria território como ferramenta estratégica no planejamento das ações de vigilância em saúde do trabalhador no SUS: uma

experiência participativa na região sul do município de Palmas – Tocantins. 2014.

CASAROTTO R. A.; MENDES, L.F. Queixas, doenças ocupacionais e acidentes de trabalho em trabalhadores de cozinhas industriais. *Rev. bras. saúde ocup.* vol.28 no.107-108 São Paulo 2003.

CARNEIRO, T. L; FERREIRA, M. C. Redução de jornada melhora a Qualidade de Vida no Trabalho? A experiência de uma organização pública brasileira. *Psicologia*, Florianópolis, v. 7, p. 131-158, 2007.

CARVALHO, B. G.; MARTIN, G. B.; CORDONI JUNIOR, L. A organização do sistema de saúde no Brasil. In: ANDRADE, S. M.; SOARES, D. A.; CORDONI JUNIOR, L. (Org.). *Bases da saúde coletiva*. Londrina: Eduel, 2001. p.27-56.

CHIAVEGATTO, C. V. *Percepção dos profissionais de nível superior da atenção primária quanto ao desenvolvimento de ações de saúde do trabalhador no SUS em Minas Gerais*. 2010. 128 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)-Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

CISNE A. M. B., Oliveira L. S., Santos P. J. P., Pinto V. R. S. *Trabalhadores do comércio: como não negociar a saúde*. São Paulo: Instituto Brasileiro de Saúde e Meio Ambiente, 2011.

CONSELHO NACIONAL DE SEECRETÁRIOS DE SAÚDE. Atenção Primária-Seminário do Conass para construção de consensos /Conselho Nacional de Secretários de Saúde. - Brasília : CONASS, 2004.44 p., (CONASS Documenta ; v.2)

COSTA E.A. Regulação e vigilância: proteção e defesa da saúde. In: *Epidemiologia & saúde*. 7. ed. Rio de Janeiro: MedBook, 2012. p. 493-520.

CUNICO, Mirian Machado LIMA, Cristina Peitz de. *Os cosméticos e os riscos da vaidade precoce*. Cidade: editora, 2012.

DIAS, E. C. Setor informal de trabalho: um novo-velho desafio para a saúde do trabalhador. IN; SALIM, C. A.; Carvalho L. F. *Saúde e segurança no ambiente de trabalho: contextos e vertentes*. São João Del Rei: Universidade Federal de São João Del Rei, 2002.

DIAS, E. C.; HOEFEL, M. da G. O desafio de implementar as ações de saúde do trabalhador no SUS: a estratégia da RENAST. *Ciência & Saúde Coletiva*, Cidade, v. 10, n. 4, p. 817–827, dez. 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232005000400007. Acesso em: 5 ago. 2015.

DIAS, E. C.; LACERDA E SILVA, T.; ALMEIDA, M. H. C. Desafios para a construção cotidiana de ações de Vigilância em Saúde do Trabalhador e

Ambiental na Atenção Primária à Saúde. *Cadernos de Saúde Coletiva*, Cidade: v. 20, n. 1, p. 15-24, 2012.

DIAS, E.C.; SILVA, T.L. *Contribuições da Atenção Primária em Saúde para a implementação da Política Nacional de Saúde e Segurança no Trabalho (PNSST)*. Rev. bras. saúde ocup. vol.38 no.127 São Paulo Jan./June 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0303-76572013000100007>

DIAS, Elizabeth Costa, SILVA, Thais Lacerda. *Saúde do Trabalhador na Atenção à Saúde: possibilidades, desafios e perspectivas*. Belo Horizonte: Coopmed, 2013.

DONABEDIAN, Aspects of medical care administration: specifying requirements for health care. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1973.

FONSECA, Estela da Silva et al. Análise Ergonômica do Trabalho em um salão de beleza no município de Viçosa–MG. *VI Workshop de Análise Ergonômica do Trabalho. III Encontro Mineiro de Estudos em Ergonomia. VIII Simpósio do Programa Tutorial em Economia Doméstica*, Viçosa, MG: editora 2013.

FREITAS, N.B.B.; ARCURI, A.S.A. *Riscos devido a substâncias químicas*. São Paulo: Kingraf, 2000.

GARBACCIO, Juliana Ladeira; OLIVEIRA, Adriana Cristina de. O risco oculto no segmento de estética e beleza: uma avaliação do conhecimento dos profissionais e das práticas de biossegurança nos salões de beleza. *Texto & contexto enferm.* Cidade, v. 22, n. 4, p. 989-998, 2013.

GHISI J, Santin N. C. *Avaliação do possível crescimento de fungos em amostras de lixas de unha metálicas coletadas em centros de estéticas e residências do município de Campos Novos, SC*. Disponível em: editora.unoesc.edu.br/index.php/acbs/article/download/680/pdf_127. Acesso em: 25 ago. 2016.

GREGOLIS, Thais Blaya Leite; PINTO, Wagner de Jesus; PERES, Frederico. *Percepção de riscos do uso de agrotóxicos por trabalhadores da agricultura familiar do município de Rio Branco*. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0303-76572012000100013. Acesso em: 05 ago. 2016.

HOEFEL M. G., Dias E. C.; Silva J. M.. *A atenção à Saúde do Trabalhador no SUS: a proposta de constituição da RENAST*. Brasília, Ministério da Saúde, 2005.

IRIART, Jorge Alberto Bernstein et al. Representações do trabalho informal e dos riscos à saúde entre trabalhadoras domésticas e trabalhadores da construção civil. *Ciênc. saúde coletiva*, Cidade: v. 13, n. 1, p. 165-174, 2008.

LACAZ, F. A. de C. Conhecimentos, práticas em Trabalho-Saúde e as abordagens da medicina social e da medicina do trabalho no Brasil: final do século XIX até os anos 1950-60. *Cadernos de Psicologia Social do Trabalho*, Cidade, v. 10 n.1, jun. 2007.

LACAZ, F. A. de C. Saúde dos trabalhadores: cenário e desafios. *Cadernos de Saúde Pública*, Cidade, v. 13, 1997.

LACAZ, F. A. C. *Saúde do Trabalhador*: um estudo sobre as formações discursivas da academia, dos serviços e do movimento sindical. 1996. N° de folhas. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1996.

LACAZ, F. A. C.; MACHADO, J. M. H.; PORTO, M. F. S. *Relatório Final do Projeto*. Estudo da situação e tendências da Vigilância em Saúde do Trabalhador no Brasil. Cidade: OPAS/ Abrasco, 2002.

LAGUARDIA, Filipe Curzio et al (org.). *Instrutivo para execução e avaliação das ações de vigilância em saúde: projeto fortalecimento da vigilância em saúde em Minas Gerais (Resolução SES nº 4.238/2014)* Belo Horizonte: SES-MG, 2014

LAST, J. M. Dictionary of epidemiology. 3th ed. Oxford: Oxford University, 1995

LAVINAS, L. ET AL. *Trabalho a domicílio*: novas formas de contratação. Rio de Janeiro. IPEA, 1998.

LOTUFO, P. A.; LOLIO, C. A. Tendências de evolução da mortalidade por doenças cardiovasculares: o caso do estado de São Paulo. In: MONTEIRO, C. A. (Org.). Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças. São Paulo: Hucitec, Abrasco, Edusp, 1995, p. 279-288.

MAÇÃIRA, Elayne de Fátima. *Morbidade respiratória em trabalhadores em limpeza interna da região metropolitana do Estado de São Paulo*. 2004. 164 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004

MACHADO, J. M. H. Alternativas e processos de vigilância em Saúde do Trabalhador: a heterogeneidade da intervenção. 1996. 149 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública)-Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1996

MACIEL, A. C. C. et al. Prevalência dos fatores associados à sintomatologia dolorosa entre profissionais da indústria têxtil. *Revista Brasileira de epidemiologia*, São Paulo, vol. 9, n. 1 março 2006

MARTINS, A. *Mudança temporária de limiar*: Um estudo em cabelereiros. 2001. 52 f. Monografia (Especialização em fonoaudiologia clínica). Centro de Especialização em Fonoaudiologia Clínica, 2001.

MEDINA, M. C. G. A aposentadoria por invalidez no Brasil. São Paulo, 1986. Tese (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo

MENDES, R.; DIAS, E. C. Saúde dos trabalhadores. In: ROUQUAYROL M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. (Eds.). Epidemiologia & Saúde. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999, p. 431-456.

MENDES, E.V. Atenção Primária à saúde. Mimeo, 2002.

MENDES, E. V. O cuidado das condições crônicas na atenção primária à saúde: o *imperativo da consolidação da estratégia da saúde da família*. Brasília: OPAS, 2012.

MENDES, E. V. *As redes de atenção à saúde*. Belo Horizonte: Escola de Saúde Pública de Minas Gerais; 2009.

MENDES, E. V. *As redes de atenção à saúde*. Ciência & Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, v. 15, n. 5, p. 2297-2305, ago. 2010.

MENDES, E. V. Agora mais do que nunca – uma revisão bibliográfica sobre Atenção Primária à Saúde. In: *Conselho Nacional De Secretários De Saúde: Oficinas de Planificação da Atenção Primária à Saúde nos Estados*. Brasília: CONASS, 2009.

MENDES, Eugênio Vilaça (org.). As políticas de saúde no Brasil nos anos 80: Conformação da reforma Sanitária e a Construção da Hegemonia do Projeto Neoliberal. In: *Distrito Sanitário: O processo social de mudança das práticas sanitárias do Sistema Único de Saúde*. 3. ed. São Paulo - Rio de Janeiro: Hucitec-Abrasco, 1995.

MENDES, René; CAMPOS, Ana Cristina Castro. Saúde e segurança no trabalho informal: desafios e oportunidades para a indústria brasileira. *Rev Bras Med Trab*, Cidade, v. 2, n. 3, p. 209-223, 2004.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Subsecretaria de Vigilância e Proteção à Saúde. Projeto de Fortalecimento da Vigilância em Saúde em Minas Gerais. SES, Belo Horizonte: Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, 2012.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Resolução SES Nº 3.049, de 07 de dezembro de 2011. Aprova o edital de convocação para adesão dos municípios ao Projeto de Fortalecimento da Vigilância em Saúde no Estado de Minas Gerais. SES. Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/RESOLUCaO%20SES%203152-%20Vigilancia%20em%20Saude.%2028.02%20RQ.pdf>. Acesso: 03 mai. 2016.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Resolução SES Nº 3.152, de 14 de fevereiro de 2012. Aprova o edital de convocação para adesão dos municípios ao Projeto de Fortalecimento da Vigilância em Saúde no Estado de Minas Gerais. SES. Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/RESOLUCaO%20SES%203152-%20Vigilancia%20em%20Saude.%2028.02%20RQ.pdf>. Acesso: 03 mai. 2016.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Resolução SES Nº 3717, 17 de abril de 2013. Divulga o Edital nº 01/2013 de convocação para adesão ao Projeto de Fortalecimento da Vigilância em Saúde e dá outras providências. SES. Disponível em: http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/resolu%C3%A7%C3%A3o_3717.pdf. Acesso: 03 mai. 2016.

MINAS GERAIS. Secretaria do Estado de Saúde. Resolução SES/MG nº 4.238, de 19 de março de 2014. Institui o Edital de convocação para adesão ao Projeto de Fortalecimento da Vigilância em Saúde, para o exercício 2014-2015. Disponível em: http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/resol%C3%A7%C3%A3o_4238.pdf. Acesso em: 13 ago. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Organização Pan-Americana da Saúde no Brasil. Doenças relacionadas ao trabalho: manual de procedimentos para os serviços de saúde / Ministério da Saúde do Brasil, Organização Pan-Americana da Saúde no Brasil; organizado por Elizabeth Costa Dias ; colaboradores Idelberto Muniz Almeida et al. – Brasília: Ministério da Saúde do Brasil, 2001.

MINAYO-GOMEZ, C.; THEDIM-COSTA, S. M. DA F. *A construção do campo da saúde do trabalhador: percurso e dilemas*. Cadernos de Saúde Pública, vol.13, Rio de Janeiro 1997.

MORAES, M. A. A. et al. Sintomas músculos esqueléticos e condições de trabalho de costureiras de um hospital universitário. *Revista Paulista de Enfermagem*, Cidade, v. 21, n. 3, p. 249-54, 2002

MOREIRA A. C. A., SILVA F. L., SILVA K. F., MOREIRA J. L. Grau de informações dos profissionais de salões de beleza sobre AIDS e hepatite. *Rev Ciênc Méd Biol*, Cidade, v. 12, n. 3, p. 359-366, 2013.

MOTTA, P.T, CARVALHO, R. L. R., DUARTE, M. E. L., ROCHA, A. D. M. Análise dos acidentes de trabalho do setor de atividade econômica comércio no município de Belo Horizonte. *REME Rev Min Enferm*, Cidade, v. 15, p. 427-433, 2011.

NASCIMENTO, Simone Daniel do. Produtos químicos domésticos: ações contextualizadas em educação ambiental. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Centro de Ciências e Tecnologia Universidade Estadual da Paraíba, 2014. 42p.

PADOVANI, Ariovaldo. *SST em serviços terceirizados de limpeza e conservação: aspectos gerais*. 2011. Disponível em: <http://www.areaseg.com/pdf/sstemservicosterceirizados.pdf>. Acesso em: 31 ago. 2016.

PAIM J. S. *O QUE É SUS?* Rio de Janeiro: Fiocruz; 2009. 148 p.

PAIZANTE, G. O. *Análise dos fatores de risco da coluna lombar em costureiras de uma fábrica de confecção de moda íntima masculina no município de Muriaé – MG*. 2006. 69f. Dissertação (Mestrado em meio ambiente e sustentabilidade) Centro Universitário de Caratinga. 2006.

PEIXOTO, Neverton Hofstadler; FERREIRA, Leandro Silveira. *Higiene Ocupacional I* - Santa Maria: UFSM, CTISM. Rede e-Tec Brasil, 2012.

POÇO, J.L.C. O processo de desconcentração na atenção em saúde do trabalhador: A experiência do CEREST de Juiz de Fora/MG. Monografia (conclusão de curso de especialização) - HC/UFGM/CEREST, Belo Horizonte, 2008

POLIT, D. F.; HUNGLER, B. P. - Fundamentos de pesquisa em enfermagem. 3. ed., porto Alegre, Artes Médicas, 1995. 391p.

PORTO, M. F. S.; LACAZ, F. A. C.; MACHADO, J. H. M. Promoção da saúde e intersectorialidade: contribuições e limites da vigilância em Saúde do Trabalhador no Sistema Único de Saúde (SUS). *Saúde em Debate*, Rio de Janeiro, v. 27 n. 65, p. 192-206, set./dez. 2003.

RENAST. 3ª Conferência Nacional de Saúde do Trabalhador. : *Trabalhar sim! Adoecer não! Coletânea de Texto*. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

REY, A. M.; SILVESTRE, A. A. *Comer sem riscos 1* – manual de higiene alimentar para manipuladores e consumidores. São Paulo: Varela, 2009.

ROUQUAYROL. M. Z.; FILHO. N. A. *Epidemiologia &Saúde*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003,736p

SANCHES, Solange. *Trabalho doméstico: desafios para o trabalho decente*, Rev. Estud. Fem. vol.17 no.3 Florianópolis Sept./Dec. 2009.

SANTORUM, K. M. T. *Pelas fendas do trabalho vivo: textos, contextos e atos na atividade de vigilância em Saúde do Trabalhador*. 2006. 173 f. Tese (Doutorado em Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

SCHILLING, R. S. F. More effective prevention in occupational health practice. *Journal of the Society of Occupational Medicine*, n. 39, p. 71-79, 1984.

SENA, R. B. et al. Análise dos riscos ergonômicos em costureiras: Utilizando o Software Era (Ergonomic Risk Analysis) em uma empresa do Pólo de Confecções do Agreste de Pernambuco. *Enegep*. Disponível em: http://www.abepro.org.br/biblioteca/enegep2008_tn_sto_072_514_11382.pdf.

Acesso em: 22 ago. 2016.

SILVA L. M. S., SILVA D. C., DINIZ J. S., FELIPE I. M. A., NUNES S. P.H. Prevenção da transmissão de hepatites virais entre manicures e pedicures: uma revisão. *Infarma*, Cidade, v. 26, n. 2, p. 82-89, 2014.

SILVEIRA, A. M.; RIBEIRO, F. S. N.; LINO, A. de F. P. F. O Controle social no SUS e a RENAST. In: Conferência Nacional de Saúde do Trabalhador, 3, 2005, Brasília. Trabalhar sim, adoecer não: textos de apoio. Brasília, 2005.

SOUZA M. E. A; SANTOS J. A. S.; SIMONASSI, M. *Mecanismos de proteção dos direitos fundamentais*. Disponível em: fadipa.educacao.ws/ojs-2.3.3-3/index.php/cjuridicas/article/download/133/pdf. Acesso em: 04 ago. 2016.

SOTO, F. R. M. Aplicação experimental de um modelo de conduta de inspeção sanitária no comércio varejista de alimentos. *Revista Ciência e Tecnologia Alimentar*, Campinas, v. 29, n.2. p. 371-374, abr.-jun., 2009. ISSN 0101-2061.

STARFIELD, B. *Atenção Primária: equilíbrio entre necessidades de saúde, serviços e tecnologia*. Brasília: UNESCO, Ministério da Saúde, 2002.

SUNDFELD C. O interesse público em sentido mínimo e em sentido forte: o problema da vigilância epidemiológica frente aos direitos constitucionais. In: FREITAS J; PASQUALINI A. (org). *Interesse público*. Porto Alegre: Fórum, 2004. p. 29-42.

VIANA, Ana L. As políticas de saúde nas décadas de 80 e 90: O (longo) período das reformas. In: CANESQUI, Ana Maria (org). *Ciências Sociais e Saúde para o ensino médico*. São Paulo: Hucitec, 2000.

VIEIRA, S. *Metodologia científica para a área da saúde*. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

VILELA, R. A. G. *Desafios da vigilância e da prevenção dos acidentes do trabalho*. São Paulo: LTR, 2003.

ULYSSEA, G. Informalidade no mercado de trabalho brasileiro: uma resenha da literatura. *Rev Econ Política*. Cidade, v. 26, n. 4, 2006.

XAVIER, R. N. *Convivendo com o inimigo: cozinha domiciliar e risco de contaminação dos alimentos*. 2009. 42 f. Monografia (especialização) - Centro de Excelência em Turismo, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

ANEXO A**Instrumento de Consolidado do Perfil Ocupacional da ESF**

Consolidado do Perfil Ocupacional da ESF	
Ano:	
Nome da ESF:	
Nº famílias cadastradas:	Nº famílias entrevistadas:
Nº de famílias cadastradas em ESF:	Nº de pessoas em idade ativa:

Nº de micro-áreas:							
<ul style="list-style-type: none"> Consolidado dos dados gerais da família 							
Dados de atividades domiciliares							
	Micro área 1	Micro área 2	Micro área 3	Micro área 4	Micro área 5	Micro área 6	Total
Nº de atividade domiciliar formal							
Nº de atividade domiciliar informal							
Manipulação de produto químico no domicílio							
Manipulação de produto de beleza no domicílio							
Manipulação de alimentos no domicílio							
Plantações no terreno do domicílio para consumo próprio							
Plantações no terreno do domicílio para comercialização							
Total							
Lista das principais atividades domiciliares –por micro-área							
Nome da micro-área				Lista das 10 principais atividades domiciliares- listar quantidade e nome da atividade domiciliar em ordem decrescente			
Micro área 1							
Micro área 2							
Micro área 3							
Micro área 4							
Micro área 5							
Micro área 6							
Consolidado da ESF							
<ul style="list-style-type: none"> Consolidado dos dados individuais dos trabalhadores-por micro-área 							
Nome da micro-área				Lista das 20 principais ocupações do território- Listar quantidade e nome da ocupação em ordem decrescente			
Micro área 1							
Micro área 2							
Micro área 3							
Micro área 4							
Micro área 5							
Micro área 6							
Consolidado da ESF							



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**INFLUÊNCIA DOS ÍONS Ce^{4+} , Sm^{3+} E Gd^{3+} NAS PROPRIEDADES
FOTOLUMINESCENTES E FOTOCATALÍTICAS DO ÓXIDO DE
ZINCO**

JULIANE ZACOUR MARINHO

UBERLÂNDIA - MG

2017

JULIANE ZACOUR MARINHO

**INFLUÊNCIA DOS ÍONS Ce^{4+} , Sm^{3+} E Gd^{3+} NAS PROPRIEDADES
FOTOLUMINESCENTES E FOTOCATALÍTICAS DO ÓXIDO DE
ZINCO**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química do Instituto de Química da
Universidade Federal de Uberlândia,
como requisito à obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Cristina de Lima

UBERLÂNDIA - MG

2017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 60/PPQUI.**

DATA: 17/02/2017

DISCENTE: Juliane Zacour Marinho

MATRÍCULA: 11313QMI003

TÍTULO DO TRABALHO: Influência dos íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} nas propriedades fotoluminescentes e fotocatalíticas do óxido de zinco.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Ciência dos Materiais: Química do Estado Sólido

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Estudo de materiais nanoestruturados obtidos via método hidrotermal.

Às quatorze horas do dia dezessete de fevereiro do ano dois mil e dezessete, no Auditório A/B, Bloco 5R, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Maria Rita de Cássia Santos, da Universidade Federal de Goiás, Márcio de Sousa Góes, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Edson Nossol e Rosana Maria Nascimento de Assunção, do Instituto de Química da UFU e Renata Cristina de Lima, orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Regulamentar nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidata(o). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será o mesmo

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 18 horas e 51 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Profª. Dra. Maria Rita de Cássia Santos – UFG

Prof. Dr. Edson Nossol – IQUFU

Prof. Dr. Márcio de Sousa Góes – UNILA

Profª Dra. Rosana Maria Nascimento de Assunção – IQUFU

Professor(a) Orientador(a): Renata Cristina de Lima – IQUFU

Dedico meu trabalho aos meus pais, Liliane e Sérgio por todo amor incondicional, exemplos de caráter e dedicação total à minha educação. Por acreditarem que a educação é o melhor caminho para prosperar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora por estar sempre presente em minha vida, dando-me forças para concluir todo esse percurso no caminho da ciência em minha vida.

À toda a minha família e de um modo bastante especial, aos meus pais, Liliane e Sérgio, à minha irmã Ana Luiza e à minha avó Antônia. Agradeço toda a ajuda recebida, a oração, o carinho, a compreensão e o amor incondicional.

À minha orientadora, Profa. Dra. Renata Cristina de Lima, pela oportunidade concedida de realizar este trabalho, pela orientação desde o mestrado, pelos ensinamentos, pela competência profissional e confiança.

Agradeço a todos os colegas de laboratório pela convivência, experiências compartilhadas e pelos momentos de risada para descontrair o ambiente.

Às amigas, Naiara, Fernanda e Samantha pelas conversas trocadas e pelas dicas na pesquisa.

Ao Prof. Dr. Antonio Otavio de Toledo Patrocínio e seu grupo de pesquisa LAFOT-CM/ IQ-UFU, em especial aos alunos Leonardo e Bárbara, pela amizade e pela realização dos testes fotocatalíticos.

Ao Prof. Dr. Noélio Oliveira Dantas e Profa. Dra. Anielle C. Almeida por conceder a utilização da estrutura do LNMIS (Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores) do Instituto de Física – UFU.

Ao Prof. Dr. Elson Longo e demais colaboradores do LIEC – UFSCar, em especial agradecimento ao Rori, a Ana, Rosana, Larissa, Leilane e Madalena, por terem possibilitado o acesso ao laboratório para a realização das medidas de caracterização.

Às queridas colegas Denise e Mônica pela dedicação e boa vontade durante as medidas de Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX).

As amigas Bárbara e Mônica pela boa vontade e paciência na hora de realizar as medidas de área superficial (BET) das amostras.

Aos meus queridos amigos Luiza, Laiz, Fernanda, Bárbara, Leandro, Samuel, Leonardo, Breno, Verônica, Fernando, Sinval, Danilo, Adriângela e Drielly por tornarem os meus dias mais leves e doces.

Aos demais amigos conquistados no Instituto de Química durante esses anos.

À Universidade Federal de Uberlândia, ao Instituto de Química - IQUFU e aos demais técnicos, pelo apoio e oportunidade de realizar este curso de pós-graduação.

Aos órgãos de fomento, FAPEMIG e CNPq pelo suporte financeiro durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa em Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT) e Rede Mineira de Química.

À CAPES pela bolsa concedida.

“Hoje, neste tempo que é seu, o futuro está sendo plantado. As escolhas que você procura, os amigos que você cultiva, as leituras que você faz, os valores que você abraça e os amores que você ama, tudo será determinante para a colheita futura.”

Padre Fábio de Melo

PUBLICAÇÕES

- F. C. Romeiro, J. Z. Marinho, A. C. A. Silva, N. F. Cano, N. O. Dantas, R. C. Lima. “Photoluminescence and magnetism in Mn^{2+} -doped ZnO nanostructures grown rapidly by the microwave hydrothermal method”, *Journal of Physical Chemistry C*, 117, 26222-26227, 2013.
- J.Z. Marinho, R.H.O. Montes, A.P. de Moura, E. Longo, J.A. Varela, R.A.A. Munoz, R.C. Lima. “Rapid preparation of α -FeOOH and α -Fe₂O₃ nanostructures by microwave heating and their application in electrochemical sensors”, *Materials Research Bulletin*, 49, 572–576, 2014.
- J. Z. Marinho, L. M. Santos, L. R. Macario, E. Longo, A. E. H. Machado, A. O. T. Patrocinio, R. C. Lima. “Rapid preparation of (BiO)₂CO₃ nanosheets by microwave-assisted hydrothermal method with promising photocatalytic activity under UV-Vis light”, *Journal of Brazilian Chemical Society*, 26, 498-505, 2015.
- F. C. Romeiro, J. Z. Marinho, S. C. S. Lemos, A. P. de Moura, P. G. Freire, L. F. da Silva, E. Longo, R. A. A. Munoz, R. C. Lima. “Rapid synthesis of Co, Ni co-doped ZnO nanoparticles: Optical and electrochemical properties”, *Journal of Solid State Chemistry*, 230, 343–349, 2015.

RESUMO

Nanoestruturas de ZnO puro e dopado com os íons terras raras (TR: Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+}), preparadas pelo método hidrotérmico de micro-ondas (HM), com propriedades fotoluminescentes e fotocatalíticas foram obtidas no presente trabalho. Os materiais foram sintetizados sob baixa temperatura, à 90 °C, e em curtos tempos de reação, de 2 e 16 minutos. A formação da fase hexagonal wurtzita foi observada para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} . Os resultados de refinamento Rietveld exibiram coeficientes de confiabilidade referentes a um bom refinamento. Os espectros Raman revelaram a presença do modo $\text{E}_{2\text{H}}$ em 438 cm^{-1} confirmando a formação da estrutura hexagonal wurtzita do ZnO para todas as amostras obtidas e as distorções locais geradas pela adição dos íons terras raras causando uma desordem à curto alcance na estrutura do ZnO. As imagens de MEV-FEG mostraram a importância do tempo de síntese na formação das nanoestruturas de ZnO puro e dopado. As amostras sintetizadas em 2 minutos são constituídas de partículas com formas irregulares, enquanto que após 16 minutos de síntese, observou-se um crescimento direcional das partículas com a formação de placas homogêneas e espessura média de 45 nm. Os espectros EDX confirmaram a presença dos elementos cério, samário e gadolínio nas amostras dopadas e a pureza das mesmas. Todas as amostras apresentaram propriedades fotoluminescentes com banda larga na região visível do espectro, com emissão máxima na região verde-laranja. A incorporação dos íons dopantes levou a um aumento na porcentagem de área de emissão na região do verde, associada à presença de vacâncias de oxigênio. A morfologia e o tamanho das partículas formadas, que tiveram influência especialmente da dopagem e do tempo de reação hidrotérmica, desempenharam um papel fundamental na atividade fotocatalítica dos materiais sintetizados. Todos os materiais obtidos apresentaram atividade fotocatalítica, sendo que os catalisadores que apresentaram um ótimo desempenho frente à degradação do corante azul de metileno foram: ZnO dopado com 2% em mol de Gd^{3+} à 2 minutos, 1% em mol de Gd^{3+} à 16 minutos e 2% em mol de Sm^{3+} à 16 minutos, com 65%, 73% e 100% de eficiência, respectivamente.

Palavras-Chave: óxido de zinco; terras raras; método hidrotérmico de micro-ondas; fotoluminescência; fotocatalise.

ABSTRACT

Nanostructures of ZnO pure and doped with rare earth ions (TR: Ce^{4+} , Sm^{3+} and Gd^{3+}), prepared by the microwave hydrothermal (MH) method, with photoluminescent and photocatalytic properties were obtained in the present work. The materials were synthesized under low temperature at 90 °C and in short reaction times of 2 and 16 minutes. The formation of the wurtzite hexagonal phase was observed for samples of pure ZnO and doped with the Ce^{4+} , Sm^{3+} and Gd^{3+} ions. The Rietveld refinement results exhibited reliability coefficients for good refinement. Raman spectra revealed the presence of the $\text{E}_{2\text{H}}$ mode at 438 cm^{-1} confirming the formation of the ZnO wurtzite hexagonal structure for all samples obtained and the local distortions generated by the addition of the rare earth ions causing a short-range disorder in the ZnO structure. MEV-FEG images showed the importance of the time of synthesis in the formation of pure and doped ZnO nanostructures. The samples synthesized in 2 minutes are irregularly shaped particles, while after 16 minutes of synthesis, a directional growth of the particles was observed with the formation of homogeneous plates with a mean thickness of 45 nm. The EDX spectra confirmed the presence of the cerium, samarium and gadolinium elements in the doped samples and their purity. All samples presented photoluminescent properties with broad band in the visible region of the spectrum, with maximum emission in the green-orange region. The incorporation of doping ions led to an increase in the percentage of emission area in the green region, associated to the presence of oxygen vacancies. The morphology and size of the formed particles, which had a special influence on doping and hydrothermal reaction time, played a fundamental role in the photocatalytic activity of the synthesized materials. All the materials obtained showed photocatalytic activity, and the catalysts that presented the best performance against the degradation of the methylene blue dye were: ZnO doped with 2 mol% Gd^{3+} at 2 minutes, 1 mol% Gd^{3+} at 16 minutes and 2 mol% Sm^{3+} at 16 minutes, with 65%, 73% and 100% efficiency, respectively.

Keywords: zinc oxide; rare earths; microwave-hydrothermal method; photoluminescence; photocatalysis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estruturas cristalinas do ZnO do tipo (a) sal rocha (NaCl), (b) blenda de zinco e (c) wurtzita, no qual as esferas em cinza e em preto representam o zinco e o oxigênio, respectivamente.	3
FIGURA 2	Representação da estrutura hexagonal de ZnO com os parâmetros de rede externos: o plano basal (a), o plano uniaxial (c) e o parâmetro interno (u) (O parâmetro interno u indica o deslocamento de Zn-O ao longo da constante de rede c.).	4
FIGURA 3	Representação esquemática das dimensões estruturais dos materiais e algumas de suas propriedades esperadas.	9
FIGURA 4	Espectro eletromagnético.	11
FIGURA 5	Esquema representativo da direção de fluxo de calor por (a) aquecimento de convecção convencional e (b) por aquecimento de micro-ondas.	13
FIGURA 6	Representação dos processos de excitação, decaimento radiativo e decaimento não radiativo durante o fenômeno da luminescência.	16
FIGURA 7	Representação esquemática dos três principais modelos teóricos para a explicação do fenômeno de emissão fotoluminescente.	18

FIGURA 8	Representação esquemática do modelo teórico de banda larga.	19
FIGURA 9	Estrutura molecular do corante azul de metileno.	22
FIGURA 10	Representação esquemática do mecanismo simplificado de fotoativação de um semicondutor.	23
FIGURA 11	Representação esquemática do processo de síntese para amostra pura.	30
FIGURA 11.1	Representação esquemática do processo de síntese para as amostras dopadas.	31
FIGURA 12	Imagens do sistema HM e seus demais componentes	32
FIGURA 13	Sistema fotoquímico empregado em escala de laboratório (1) Fonte de radiação com uma lâmpada de xenônio de 300 W, (2) Reator fotocatalítico, (3) Sistema de resfriamento (mangueiras com entrada de água).	38
FIGURA 14	Difratogramas de raios X para o ZnO puro (a), dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (b), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (c) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} obtidos no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	40

FIGURA 15	Difratogramas de raios X para o ZnO puro (a), dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (b), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (c) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} obtidos no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	42
FIGURA 16	Região ampliada do pico (101) nos difratogramas de raios X para as amostras de ZnO puro e dopadas com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} obtidos no tempo de 2 minutos (a) – (c) e 16 minutos (d) - (f) pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	43
FIGURA 17	Resultados obtidos por refinamento Rietveld para as amostras ZnO puro (a), dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (b) – (c), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (d) – (e) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} (f) – (g) obtidas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	45
FIGURA 18	Resultados obtidos por refinamento Rietveld para as amostras ZnO puro (a), dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (b) – (c), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (d) – (e) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} (f) – (g) obtidas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	46

FIGURA 19	Representação das estruturas hexagonal do óxido de zinco puro e dopado (2% em mol de Ce^{4+} , Gd^{3+} e Sm^{3+}) e as estruturas das fases secundárias (hexagonal $\text{Sm}(\text{OH})_3$ e cúbica CeO_2) obtidas por meio do Refinamento Rietveld. As esferas vermelhas representam o átomo de oxigênio, esferas cinza o zinco, esferas rosa claro o hidrogênio, roxa o samário, verde o gadolínio e amarelo o cério.	52
FIGURA 20	Espectros Raman das amostras de ZnO puro (a), dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (b), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (c) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	55
FIGURA 21	Espectros Raman das amostras de ZnO puro (a), dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (b), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (c) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	56
FIGURA 22	Espectros no UV-vis das amostras de ZnO puro, dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} , dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} sintetizadas no tempo de (a) 2 minutos e (b) 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	59
FIGURA 23	Imagens obtidas por MEV-FEG e espectros EDX das amostras de ZnO puro (a), dopado com 1% em mol de Ce^{4+} (b) e 2% em mol de Ce^{4+} (c) sintetizadas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	62

FIGURA 23.1	Imagens obtidas por MEV-FEG e espectros EDX das amostras de ZnO dopado com 1% em mol de Sm^{3+} (d), 2% em mol de Sm^{3+} (e), 1% em mol de Gd^{3+} (f) e 2% em mol de Gd^{3+} (g), sintetizadas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	63
FIGURA 24	Imagens obtidas por MEV e espectros EDX das amostras de ZnO puro (a), dopado com 1% em mol de Ce^{4+} (b) e 2% em mol de Ce^{4+} (c) sintetizadas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	65
FIGURA 24.1	Imagens obtidas por MEV e espectros EDX das amostras de ZnO dopado com 1% em mol de Sm^{3+} (d), 2% em mol de Sm^{3+} (e), 1% em mol de Gd^{3+} (f) e 2% em mol de Gd^{3+} (g), sintetizadas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	66
FIGURA 25	Espectros de emissão fotoluminescente ($\lambda_{\text{exc}} = 350,7 \text{ nm}$) para as amostras dopadas com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (a), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (b) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} (c) sintetizadas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	69
FIGURA 26	Decomposição das bandas de emissão fotoluminescente para as amostras de ZnO puro, dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} , dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	70

FIGURA 27	Espectros de emissão fotoluminescente ($\lambda_{exc} = 350,7 \text{ nm}$) para as amostras dopadas com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (a), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (b) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} (c) sintetizadas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	74
FIGURA 28	Decomposição das bandas de emissão fotoluminescente para as amostras de ZnO puro, dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} , dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	75
FIGURA 29	Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio pelas amostras de ZnO puro e dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	79
FIGURA 30	Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio pelas amostras de ZnO puro e dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	80
FIGURA 31	Fotodegradação do azul de metileno na ausência do catalisador (a). Tempo total de 180 min. Espectro de absorbância no UV-vis do azul de metileno na presença de ZnO puro (b), (c) 1% em mol de Ce^{4+} e (d) 2% em mol de Ce^{4+} . (e) Curso temporal de degradação fotocatalítica de azul de metileno. Para as amostras obtidas no tempo de 2 minutos.	85

FIGURA 32	Espectros de absorbância no UV-vis do azul de metileno na presença de ZnO puro (a), (b) 1% em mol de Sm^{3+} e (c) 2% em mol de Sm^{3+} . Curso temporal de degradação fotocatalítica de azul de metileno (d). Para as amostras obtidas no tempo de 2 minutos.	86
FIGURA 33	Espectros de absorbância no UV-vis do azul de metileno na presença de ZnO puro (a), (b) 1 mol% Gd^{3+} e (c) 2 mol% Gd^{3+} . Curso temporal de degradação fotocatalítica de azul de metileno (d). Para as amostras obtidas no tempo de 2 minutos.	87
FIGURA 34	A descoloração de AM mediada pelos catalisadores ZnO puro, 1% em mol e 2% em mol de Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} preparados pelo método hidrotérmico de micro-ondas durante 2 minutos, ajustados de acordo com uma cinética de pseudo-primeira ordem.	90
FIGURA 35	Espectros de absorbância no UV-vis do azul de metileno na presença de ZnO puro (a), (b) 1% em mol de Ce^{4+} e (c) 2% em mol de Ce^{4+} . Curso temporal de degradação fotocatalítica de azul de metileno (d). Para as amostras obtidas no tempo de 16 minutos.	92
FIGURA 36	Espectros de absorbância no UV-vis do azul de metileno na presença de ZnO puro (a), (b) 1% em mol de Sm^{3+} e (c) 2% em mol de Sm^{3+} . Curso temporal de degradação fotocatalítica de azul de metileno (d). Para as amostras obtidas no tempo de 16 minutos.	93

- FIGURA 37** Espectros de absorbância no UV-vis do azul de metileno na presença de ZnO puro (a), (b) 1% em mol de Gd^{3+} e (c) 2% em mol de Gd^{3+} . Curso temporal de degradação fotocatalítica de azul de metileno (d). Para as amostras obtidas no tempo de 16 minutos. 94
- FIGURA 38** A descoloração de AM mediada pelos catalisadores ZnO puro, 1% em mol e 2% em mol de Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} preparados pelo método hidrotérmico de micro-ondas durante 16 minutos, ajustados de acordo com uma cinética de pseudo-primeira ordem. 97
- FIGURA 39** Esquema representativo proposto para a fotodegradação de azul de metileno utilizando ZnO puro e dopado com Gd^{3+} sob irradiação UV-vis. 99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Algumas propriedades físico-químicas dos lantanídeos.	7
TABELA 2	Reagentes empregados na síntese hidrotérmica	28
TABELA 3	Coeficientes de confiabilidade obtidos para cada amostra sintetizada no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	47
TABELA 4	Coeficientes de confiabilidade obtidos para cada amostra sintetizada no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	48
TABELA 5	Valores dos parâmetros de rede para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} obtidos no tempo de 2 minutos pelo método de Rietveld.	48
TABELA 6	Valores dos parâmetros de rede para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} obtidos no tempo de 16 minutos pelo método de Rietveld.	49
TABELA 7	Fração de cada fase obtida pelo método de Rietveld para as amostras dopadas com 2% em mol de TR (TR = Ce^{4+} , Sm^{3+}).	50

TABELA 8	Valores de largura à meia altura relativa ao modo E_{2H} em 438 cm^{-1} no Raman.	58
TABELA 9	Valores de E_{gap} para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} .	61
TABELA 10	Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para a amostras de ZnO puro obtida em 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	71
TABELA 11	Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para a amostras de ZnO dopadas com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} obtidas em 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	72
TABELA 12	Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para a amostras de ZnO dopadas com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} obtidas em 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	72
TABELA 13	Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para a amostras de ZnO dopadas com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} obtidas em 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	73

TABELA 14	Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para a amostras de ZnO puro obtida em 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	76
TABELA 15	Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para a amostras de ZnO dopadas com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} obtidas em 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	76
TABELA 16	Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para a amostras de ZnO dopadas com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} obtidas em 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	77
TABELA 17	Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para a amostras de ZnO dopadas com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} obtidas em 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	77
TABELA 18	Área superficial específica e porosidade estimada para as amostras de ZnO puro e dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	81

TABELA 19	Área superficial específica e porosidade estimada para as amostras de ZnO puro e dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	82
TABELA 20	Eficiência de fotodescoloração para as diferentes amostras obtidas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	88
TABELA 21	Constante aparente de velocidade k calculada para os diferentes catalisadores preparados pelo método hidrotérmico de micro-ondas durante 2 min.	91
TABELA 22	Eficiência de fotodescoloração para as diferentes amostras obtidas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.	95
TABELA 23	Constante aparente de velocidade k calculada para os diferentes catalisadores preparados pelo método hidrotérmico de micro-ondas durante 16 min.	98

LISTA DE ABREVIACÕES

TR – terras raras

AM – azul de metileno

BV - banda de valência

BC - banda de condução

DRX – Difração de raios X

MEV-FEG – Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo

EDX - Análise de raios X por dispersão em energia

FL – Fotoluminescência

HM – método hidrotérmico de micro-ondas

λ – Comprimento de onda

UV-vis – Ultravioleta e visível

GSAS – “*General Structure Analysis System*” - Software de análise da estrutura de materiais

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Nanotecnologia e Nanomateriais: histórico e avanços	1
1.2	Óxido de zinco (ZnO)	2
1.3	Terras raras (TR)	5
1.4	Métodos químicos de síntese de materiais nanoestruturados	8
1.4.1	Método hidrotérmico de micro-ondas (HM)	10
1.5	Luminescência	14
1.6	Processos fotocatalíticos: fotocatalise heterogênea e catalisadores	21
2.	OBJETIVOS	27
3.	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	28
3.1	Reagentes	28
3.2	Síntese dos materiais	29
3.3	Método hidrotérmico de Micro-ondas (HM)	32
3.4	Caracterizações	33
3.4.1	Difração de raios X (DRX)	33
3.4.2	Espectroscopia de espalhamento Raman	34
3.4.3	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG) e análise de raios X por dispersão em energia (EDX)	35
3.4.4	Espectroscopia de reflectância difusa na região do Ultravioleta e visível (UV-vis)	35
3.4.5	Fotoluminescência	36
3.5	Área superficial específica	36
3.6	Ensaio Fotocatalítico	37

4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
4.1	Difração de raios X (DRX)	39
4.2	Espectroscopia Raman	52
4.3	Espectroscopia no Ultravioleta-visível (UV-vis)	58
4.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG) e análise de raios X por dispersão em energia (EDX)	61
4.5	Estudo das propriedades fotoluminescentes	68
4.6	Área superficial específica	78
4.7	Estudo da atividade fotocatalítica	84
5.	CONCLUSÕES	100
6.	PERSPECTIVAS	102
7.	REFERÊNCIAS	103

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nanotecnologia e nanomateriais: histórico e avanços

A área do conhecimento, estabelecida no século XXI, conhecida como Nanotecnologia é responsável pelo conjunto de conhecimentos que permitem estudar as propriedades da matéria em nanoescala, com a geração de novos materiais e dispositivos. Alguns dos objetivos são o desenvolvimento de dispositivos para a geração e armazenamento de energia, a criação de novos materiais, com o intuito de melhorar a eficiência de materiais convencionais, além do desenvolvimento de novas tecnologias para transporte de fármacos, os chamados *drugs delivery* (ZARBIN, 2007; KUMAR e RAO, 2015; CHEN *et al.*, 2016).

As propriedades ópticas, magnéticas, dielétricas e catalíticas desses materiais nanoestruturados são fortemente dependentes da forma (morfologia) e do tamanho de suas partículas. Desta forma, os diversos materiais, como óxidos semicondutores, cerâmicas, compósitos e polímeros podem ter suas propriedades moldadas ou modificadas sem que haja alteração de sua composição química e/ou estrutura, mas somente pelo controle do tamanho e morfologia de suas partículas com o método de síntese (ZARBIN, 2007). A compreensão do termo nanotecnologia foi apresentada em 1974, pelo professor Norio Taniguchi, com o desenvolvimento de pesquisas para o processamento de novos materiais (PACHECO-TORGAL e JALALI, 2011).

A popularização da palavra "nanotecnologia" ocorreu nos anos 80-90 pelo cientista americano Eric Drexler, o qual se referia à construção de máquinas em escala molecular, como motores, braços mecânicos, computadores, além das várias pesquisas realizadas na engenharia molecular (DREXLER, 1992). Drexler passou a descrever e analisar esses aparelhos, dando respostas às acusações de ficção científica geradas na época. Com a descoberta do microscópio eletrônico de varredura de tunelamento por Binning, Rohrer, Gerber e Weibel em 1982 (GARCIA, 1986) e pela descoberta dos nanotubos de carbono por Sumio Iijima (IJIMA, 1991), a nanotecnologia recebeu mais atenção da comunidade científica de forma a impulsionar as pesquisas desenvolvidas nesta área. A química, a biologia, a física, a medicina, a engenharia, a eletrônica e a agronomia beneficiam-se com os avanços da nanotecnologia, devido ao fato dos

nanomateriais exibirem características promissoras compatíveis com as propriedades esperadas em cada aplicação de determinada área de pesquisa.

Diversos óxidos metálicos, como o TiO_2 , o ZnO , o Ag_2WO_4 , o CoWO_3 e o Bi_2O_3 por exemplo, têm recebido grande atenção devido ao uso em dispositivos eletrônicos, óticos e eletroquímicos produzidos em nanoescala (BESSEKHOUAD *et al.*, 2005; CHEN e LO, 2011; XIANG *et al.*, 2012; MARINHO *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2016; KUMAR e KARUPPUCHAMY, 2016; ZHU *et al.*, 2016).

As propriedades químicas, óticas, elétricas e magnéticas dos materiais podem depender do meio de síntese e das condições de obtenção. O material preparado por diferentes métodos de síntese pode apresentar mudanças significativas na sua estrutura cristalina, na morfologia e em suas propriedades físico-químicas (LEE e YANG, 2005; SHOJAEE *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2016; PHURUANGRAT *et al.*, 2016). Inúmeros são os materiais nanométricos de interesse na literatura como o SnO_2 , TiO_2 , WO_3 , Fe_2O_3 , ZnO , etc. O óxido de zinco é o material investigado no presente estudo.

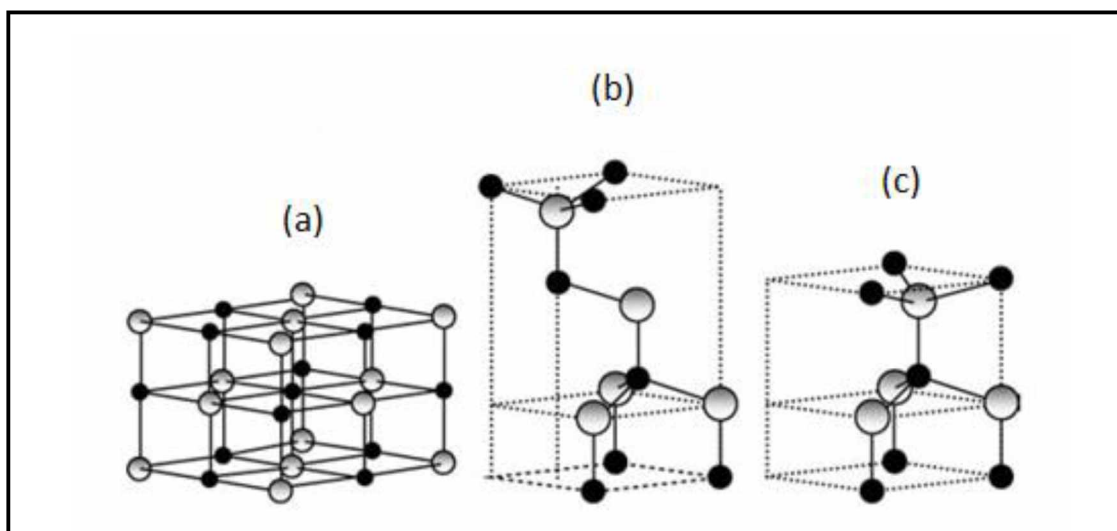
1.2. Óxido de zinco (ZnO)

O óxido de zinco, um semicondutor binário do grupo II-VI, pode-se cristalizar tanto na forma cúbica (blenda de zinco e sal rocha) quanto na forma hexagonal (wurtzita). Na estrutura hexagonal, cada ânion do cristal (oxigênio) é ligado a um cátion (zinco) nos vértices de um tetraedro. Essa coordenação tetraédrica é típica de uma ligação sp^3 covalente, mas estes materiais também apresentam um caráter substancial iônico, tendendo a aumentar a energia de *band gap* (OZGUR *et al.*, 2005; JANOTTI e VAN DE WALLE, 2007; LIMA *et al.*, 2008; SU *et al.*, 2015; SAMADI *et al.*, 2016). O caráter iônico do ZnO está no limite entre os semicondutores iônicos e covalentes, ou seja, sob condições de pressão hidrostática, os semicondutores II-VI podem ter sua estrutura alterada para sal rocha (por exemplo, NaCl) (MORKOÇ e OZGUR, 2009).

Das três estruturas cristalinas apresentadas, apenas a estrutura do tipo wurtzita é termodinamicamente estável à temperatura ambiente. As demais estruturas são obtidas somente em condições especiais de síntese. A estrutura blenda de zinco pode ser estabilizada somente por crescimento em substratos cúbicos e a estrutura sal rocha (NaCl) pode ser obtida somente sob altas pressões (OZGUR *et al.*, 2005; ZHANG e

HUANG, 2007; MORKOÇ e OZGUR, 2009; LEITNER *et al.*, 2013). A Figura 1 ilustra os tipos de cristais citados acima no texto.

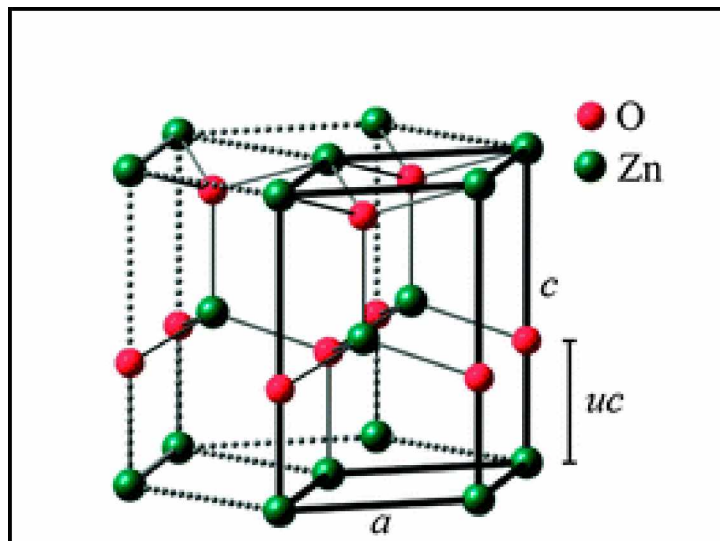
Figura 1. Estruturas cristalinas do ZnO do tipo (a) sal rocha (NaCl), (b) blenda de zinco e (c) wurtzita, no qual as esferas em cinza e em preto representam o zinco e o oxigênio, respectivamente.



Fonte: Adaptado de (OZGUR *et al.*, 2005).

O ZnO na fase wurtzita consiste em uma estrutura hexagonal, com parâmetros de rede $a = b \neq c$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$ pertencente ao grupo espacial C_{6v}^4 ou $P6_3mc$ e classe cristalográfica 6mm, na qual, na cela unitária, cada átomo de zinco ocupa o centro de um tetraedro distorcido, coordenado a quatro outros átomos de oxigênio (Figura 2). A célula unitária da wurtzita possui dois parâmetros de rede externos: o plano basal (a) e o plano uniaxial (c) e um parâmetro interno u , que descreve as posições do cátion e do ânion em relação ao eixo z . A constante interna u e o volume, V , podem ser expressos em função dos parâmetros externos a e c da seguinte maneira: $u = \frac{1}{4} + (c / 3.a)$, e $V = (3^{1/2}/2). a.c$ (JANOTTI e VAN DE WALLE, 2009; MORKOÇ e OZGUR, 2009; NISKANEN *et al.*, 2013).

Figura 2. Representação da estrutura hexagonal de ZnO com os parâmetros de rede externos: o plano basal (a), o plano uniaxial (c) e o parâmetro interno (u) (O parâmetro interno u indica o deslocamento de Zn-O ao longo da constante de rede c).



Fonte: (NISKANEN *et al.*, 2013).

O ZnO é conhecido como um semicondutor não estequiométrico caracterizado por exibir metal em excesso (Zn_{1+x}O) ou deficiência em oxigênio (ZnO_{1-x}). Este metal em excesso incorpora-se na estrutura cristalina do ZnO como átomos intersticiais (Zn_i), ocorrendo a formação de vacâncias de oxigênio (V_O). Estes defeitos ionizam-se e doam elétrons para a banda de condução, tornando o material um semicondutor intrínseco do tipo- n (JANOTTI e VAN DE WALLE, 2007; DROUILLY *et al.*, 2012).

Os átomos de zinco e de oxigênio não ocupam mais do que 40% do volume da cela unitária e somente a metade dos sítios tetraédricos é ocupada pelos cátions deixando espaços livres. Logo, a estrutura do ZnO é relativamente aberta, pouco compacta com todas as posições octaédricas e metade das posições tetraédricas vazias. Desse modo é relativamente fácil incorporar impurezas ou dopantes na célula unitária do ZnO (SHRIVER e ATKINS, 2008; BERGER, 2013), com a finalidade de investigar os efeitos sobre suas propriedades.

O óxido de zinco é um dos materiais mais importantes de uso industrial e tecnológico devido às suas diversas propriedades físico-químicas, tais como eletroluminescência (ALVI *et al.*, 2010), catodoluminescência (CHANG, 2014), fotoluminescência (WANG *et al.*, 2007; MURMU *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2016) e propriedades magnéticas (NGUYEN DUC *et al.*, 2016; SHINGANGE *et al.*, 2017),

permitindo à aplicação em sensores de gás (MHLONGO *et al.*, 2016; YIN *et al.*, 2016) devido às vacâncias de oxigênio, fotocatalise heterogênea (YANG *et al.*, 2004; YAYAPAO *et al.*, 2013; MOUSSA *et al.*, 2016), atividade antibactericida (MARY *et al.*, 2016), células solares (BOUJNAH *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2016) e em dispositivos optoeletrônicos, devido à sua energia de *gap* (3,37 eV) (KAJBAFVALA *et al.*, 2012; KIOMARSIPOUR e RAZAVI, 2012).

Em particular, a síntese de nanoestruturas de óxido de zinco tem atraído grande interesse em razão das diversas aplicações apresentadas e das novas possibilidades de aplicações geradas com a variação do método de síntese, dos fatores experimentais e com a inserção de dopantes na matriz do óxido. O interesse na adição de íons terras raras nas redes de óxidos semicondutores tem aumentado na literatura, especialmente na investigação das propriedades fotoluminescentes e fotocatalíticas, conforme o objetivo deste trabalho.

1.3. Terras raras (TR)

De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) o termo lantanídeo refere-se aos quatorze elementos que seguem o lantânio na tabela periódica (Ce-Lu), sendo que a inclusão dos elementos escândio e ítrio origina o termo metais das “terras raras”, embora seja mais comum na literatura incluir o lantânio na nomenclatura dos lantanídeos (ABRÃO, 1994; GÁLICO, 2014).

A terminologia “terra rara” foi originalmente utilizada para descrever a ocorrência em misturas de óxidos (arcaicamente denominada terras). Embora haja uso do termo “terra rara”, estes não são elementos raros e a sua abundância é relativamente alta, sendo encontrados principalmente em fosfatos minerais, como a monazita (ABRÃO, 1994).

A história das TR iniciou-se por volta do ano 1788 quando o capitão Arrhenius encontrou uma pedra preta próxima a Ytterby na Suécia. No ano de 1794, J. Gadolin isolou um óxido daquele mineral preto e nomeou de “Ytterbia”. Outro mineral foi encontrado por Klaproth e denominado de “ceria”, mais tarde descobriu que a partir deste mineral foi possível extrair lantânio, samário e gadolínio. A partir do mineral ítria foram separados os elementos ítrio, térbio, itérbio, escândio, túlio, hólmio, lutécio e disprósio. Demoraram cerca de 150 anos para que todos os metais terras raras fossem

isolados, devido à similaridade nas suas propriedades químicas (SERRA *et al.*, 2000; TROVARELLI, 2002; KODAIRA, 2003).

Nas últimas décadas, as terras raras tornaram-se vitais para uma grande variedade de materiais e tecnologias avançadas, incluindo os catalisadores, ligas metálicas, ímãs, ópticos, materiais luminescentes e lasers, baterias, eletrônica, conversão de energia eólica e solar, bio-análises e de imagem.

Muitos objetos do cotidiano contêm terras raras, como os carros, os telefones celulares, displays eletrônicos, lâmpadas fluorescentes, díodos emissores de luz (LEDs), fibras ópticas, micromotores, scanners médicos, entre outros. Além disso, é importante mencionar as aplicações militares, tais como os sistemas de orientação e binóculos de visão noturna (YANG *et al.*, 2002; MARTINS e ISOLANI, 2005; ELISEEVA e BUENZLI, 2011; SERRA *et al.*, 2015; RUNOWSKI e LIS, 2016).

A química dos elementos terras raras é predominantemente iônica e determinada principalmente pelo tamanho dos seus cátions trivalentes, sendo que os raios iônicos variam do lantânio (1,06 Å) ao lutécio (0,85 Å) dentro da série do lantânio, conforme apresentado na Tabela 1. O único lantanídeo no estado de oxidação (+IV) que é suficientemente estável em solução aquosa é o íon Ce^{4+} , podendo ser encontrado neste estado tetravalente em alguns compostos com alto poder oxidante (SASTRI *et al.*, 2003; MARTINS e ISOLANI, 2005).

Tabela 1. Algumas propriedades físico-químicas dos lantanídeos.

Número atômico (Z)	Nome	Símbolo	Configuração eletrônica	Valências	Raio M^{3+} (Å)
57	Lantânio	La	$[Xe]5d^1 6s^2$	3	1,06
58	Cério	Ce	$[Xe]4f^1 5d^1 6s^2$	3,4	1,03
59	Praseodímio	Pr	$[Xe]4f^3 6s^2$	3,4	1,01
60	Neodímio	Nd	$[Xe]4f^4 6s^2$	3	0,99
61	Promécio	Pm	$[Xe]4f^5 6s^2$	3	0,98
62	Samário	Sm	$[Xe]4f^6 6s^2$	2,3	0,96
63	Európio	Eu	$[Xe]4f^7 6s^2$	2,3	0,95
64	Gadolínio	Gd	$[Xe]4f^7 5d^1 6s^2$	3	0,94
65	Térbio	Tb	$[Xe]4f^8 6s^2$	3,4	0,92
66	Disprósio	Dy	$[Xe]4f^9 6s^2$	3	0,91
67	Hólmio	Ho	$[Xe]4f^{10} 6s^2$	3	0,89
68	Érbio	Er	$[Xe]4f^{11} 6s^2$	3	0,88
69	Túlio	Tm	$[Xe]4f^{12} 6s^2$	3	0,87
70	Íterbio	Yb	$[Xe]4f^{13} 6s^2$	2,3	0,86
71	Lutécio	Lu	$[Xe]4f^{14} 5d^1 6s^2$	3	0,85

Fonte: (SASTRI *et al.*, 2003).

Na configuração trivalente os dois elétrons da subcamada 6s e um elétron 5d (ou um elétron 4f caso não possua elétron 5d) são removidos ficando os elétrons f fortemente atraídos pelo núcleo. O orbital correspondente aos elétrons 4f está localizado mais próximo do núcleo que os orbitais 5s e 5p, assim um íon Ln^{3+} não tem orbitais de fronteira com preferência direcional e suas ligações são melhores consideradas como provenientes de atrações eletrostáticas. Portanto o fato dos orbitais f estarem preenchidos ou vazios influenciam pouco as propriedades químicas desses elementos, no entanto seus espectros eletrônicos e suas propriedades magnéticas são dependentes da configuração eletrônica (SERRA *et al.*, 2015).

Uma importante característica desses elementos é a ocorrência da contração lantanídica, uma diminuição uniforme no tamanho atômico e iônico com o aumento do número atômico. A principal causa da contração é o efeito eletrostático associado com o aumento da carga nuclear blindada imperfeitamente pelos elétrons 4f (ABRÃO, 1994; MARTINS e ISOLANI, 2005; SERRA *et al.*, 2015). Essas pequenas diferenças de

tamanho podem influenciar nas propriedades destes íons em solução ou em matrizes sólidas.

Um aspecto interessante de aplicações das terras raras é que, nem sempre, são necessárias grandes quantidades para obter as propriedades desejadas. Como por exemplo, em diversos materiais, devido às suas propriedades especiais, requer-se uma simples dopagem com terras raras em baixa concentração. Encontra-se reportado na literatura (LIANG *et al.*, 2015), o óxido de zinco dopado com 1% em mol de Ce^{4+} aplicado na fotodegradação do corante têxtil azul de metileno, sendo observados bons resultados para descoloração do corante (70% de descoloração). Por outro lado, neste estudo, foi observado que a partir do aumento da concentração do íon Ce^{4+} para 5% em mol, obteve-se uma menor eficiência fotocatalítica, com 50% de descoloração.

O estudo dos metais TR como dopante inserido na matriz do ZnO, especialmente obtido pela síntese hidrotérmica de micro-ondas com aplicação fotocatalítica e fotoluminescente ainda é um estudo relativamente novo. Os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} vêm despertando grande interesse no estudo da dopagem de ZnO por inserir novos níveis de energia entre o *gap* do material. Estes defeitos gerados com a dopagem possibilitam a aplicação em dispositivos ópticos, nos processos fotocatalíticos e fotoluminescentes (OPREA *et al.*, 2012; FAISAL *et al.*, 2013; REZAEI e HABIBI-YANGJEH, 2013; KHATAEE *et al.*, 2015; FAROOQI e SRIVASTAVA, 2016; KAUR *et al.*, 2016).

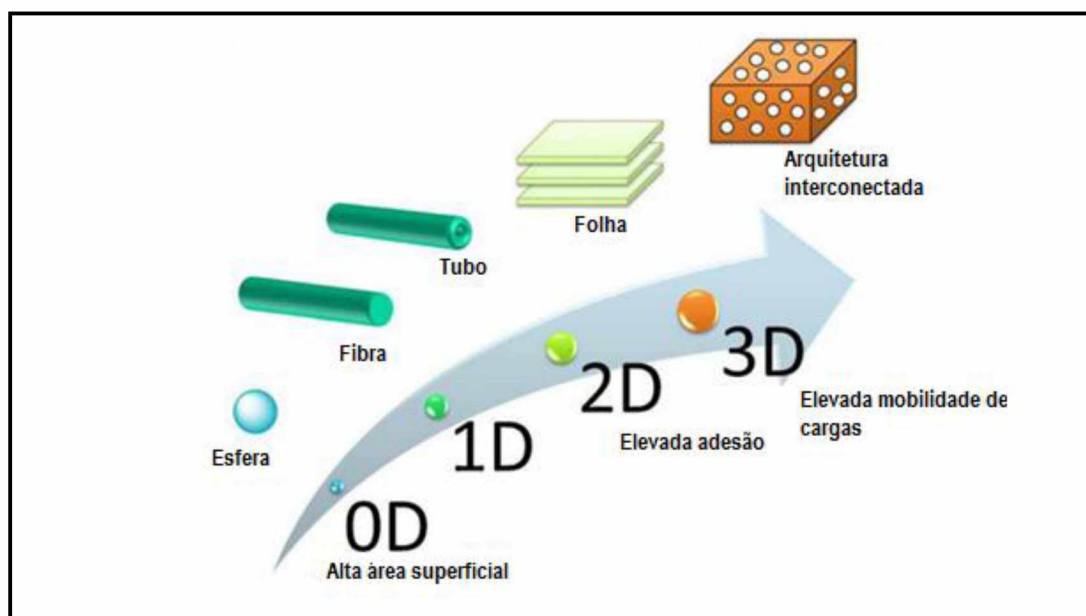
No presente trabalho foram empregados os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} como dopantes na matriz do ZnO. A possibilidade de escolha do dopante lantanídeo permite trabalhar as propriedades do material sintetizado, especialmente as propriedades fotoluminescentes e fotocatalíticas.

1.4. Métodos químicos de síntese de materiais nanoestruturados

O uso de óxidos semicondutores nanoestruturados é uma alternativa muito interessante para aplicações, por exemplo, em fotocatalise, pois muitos fatores podem influenciar em suas propriedades, como tamanho de partícula, área superficial específica e volume dos poros, além de sua estrutura cristalina. Dessa forma, é importante o desenvolvimento de métodos de síntese para a obtenção de diferentes morfologias e tamanhos de partículas a fim de melhorar as propriedades do material. A Figura 3 ilustra diversos tipos de morfologias, que contemplam variadas áreas superficiais, adequadas

para os mais diversos usos, como no caso deste trabalho, a fotocatalise heterogênea e a fotoluminescência. Portanto, ressalta-se ainda que essas diferenças nas morfologias possam afetar também as propriedades do material (NAKATA e FUJISHIMA, 2012; LIM *et al.*, 2016; OSMAN *et al.*, 2016).

Figura 3. Representação esquemática das dimensões estruturais dos materiais e algumas de suas propriedades esperadas.



Fonte: Adaptado de (NAKATA e FUJISHIMA, 2012).

A síntese de óxidos semicondutores, especialmente o ZnO, em escala nanométrica sob condições brandas de temperatura e pressão, com o controle da cristalinidade, do tamanho e forma das partículas continua sendo um dos desafios da Química de Materiais.

Vários métodos para obtenção do ZnO têm sido utilizados, entre eles, o método sol-gel (LIMA, S. A. M. *et al.*, 2007; NGUYEN DUC *et al.*, 2016) baseia-se nas reações de hidrólise e condensação do precursor permitindo a formação de partículas de tamanho coloidal (sol) e posterior formação da rede tridimensional (gel), o método decomposição térmica (SRIKANTH e JEEVANANDAM, 2009) que envolve a obtenção do óxido pela decomposição do precursor pelo seu aquecimento em fornos mufla, o aquecimento por micro-ondas (TSAI *et al.*, 2012) que envolve a decomposição do precursor sob irradiação de micro-ondas, o hidrotérmico convencional (BARUAH e

DUTTA, 2009; JIANG *et al.*, 2010; AKHOON *et al.*, 2015) no qual solvente, neste caso a água, e o precursor é aquecido num sistema fechado sob pressão com a temperatura acima do ponto de ebulição do solvente, o método dos precursores poliméricos (SANCHEZ *et al.*, 2010; FANG *et al.*, 2013) que há a formação de um quelato de cátions misturados através de um ácido hidroxicarboxílico, a solução do sal no ácido é misturada com um álcool poli-hidroxilado (usualmente etilenoglicol) sob aquecimento, o método solvotermal (CHENG *et al.*, 2008; RAI *et al.*, 2013) analogamente ao método hidrotérmico, porém utiliza-se uma mistura de água e álcool como solvente e o método hidrotérmico de micro-ondas (HUANG *et al.*, 2008; DE MOURA *et al.*, 2010; MARINHO *et al.*, 2012; ROMEIRO *et al.*, 2013; LI, X. *et al.*, 2014) em que tem-se a combinação do método hidrotérmico com o aquecimento por micro-ondas.

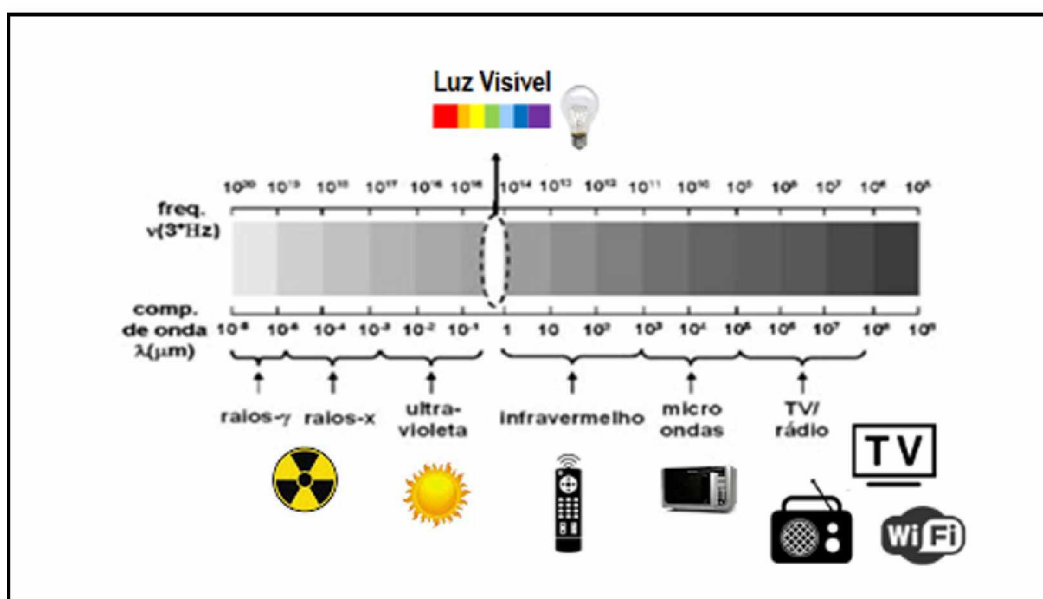
O método hidrotérmico de micro-ondas (HM) tem gerado grande interesse devido à simples manipulação do equipamento, o baixo custo, tecnologia limpa, os tempos curtos e as baixas temperaturas de síntese que são requeridos (KOMARNENI e KATSUKI, 2002; DOS SANTOS *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2012; MARINHO *et al.*, 2013; LI, D. *et al.*, 2014; THANKACHAN *et al.*, 2017).

A seguir, serão abordados os principais fundamentos do método de síntese utilizado neste trabalho – o hidrotérmico de micro-ondas, utilizado para a obtenção das nanoestruturas de óxido de zinco puro e dopado com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} para estudo das propriedades fotoluminescentes e a fotocatalíticas.

1.4.1. Método hidrotérmico de micro-ondas (HM)

As micro-ondas são definidas por ondas eletromagnéticas com frequência entre 0,3 e 300 GHz, correspondendo a comprimentos de onda de 1 cm a 1 m, encontrando-se na região do espectro eletromagnético entre o infravermelho e as ondas de rádio (Figura 4). A energia associada a estas ondas eletromagnéticas é muito baixa, diferentemente do que é observado para a radiação ultravioleta, na qual é principalmente utilizada em processos fotoquímicos (MERESHCHENKO *et al.*, 2016; SARMIENTO *et al.*, 2016).

Figura 4. Espectro eletromagnético.



Fonte: Adaptado de (MICHA *et al.*, 2011).

No período da Segunda Guerra Mundial houve grandes interesses e investimentos em tecnologias militares, devido a isso, a invenção do magnetron possibilitou o uso das propriedades de micro-ondas (MO) (KOMARNENI *et al.*, 1992; PAPOULIS *et al.*, 2013) em sistemas de radares para a detecção de aeronaves e submarinos. Com o fim da Segunda Guerra, essa radiação eletromagnética passou a ser conhecida na fabricação dos primeiros fornos domésticos. Nestes fornos, o aquecimento dos alimentos é decorrente da ressonância das moléculas de água com uma frequência de 2,45 GHz (KOMARNENI e KATSUKI, 2010; DE MOURA *et al.*, 2011; RIDHA *et al.*, 2013).

O uso da tecnologia de micro-ondas, no âmbito da Ciência dos Materiais e das Ciências da saúde, tem despertado um interesse na síntese de compostos inorgânicos e orgânicos, no tratamento térmico dos materiais em escala laboratorial ou industrial, e na inativação de micro-organismos (PISANI JÚNIOR *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2012).

Na década de 60, deu-se início à utilização do forno de micro-ondas em laboratório na secagem de cerâmicas vermelhas. A Química Analítica foi a primeira a utilizar o forno de MO, sendo que os primeiros relatos de secagem de amostras, digestão de solução para análise elementar e dessorção térmica de compostos se deu na década de 70. O interesse pelo uso de MO tem decorrido da redução das etapas de síntese, melhoria das propriedades físico-químicas em cerâmicas e na economia de

tempo e energia alcançada no processamento de diferentes materiais (BARBOZA *et al.*, 2001; SANSEVERINO, 2002).

O tratamento hidrotérmico tem se mostrado bastante útil na preparação de materiais nanoestruturados devido ao processo de reação ser bastante simples e fácil de ser controlado; sobretudo, a temperatura requerida de reação é baixa, proporcionando também um controle sobre o tamanho das partículas. Dentro deste contexto, S. Komarneni *et al.* (1992) foram os pioneiros a combinar a radiação de micro-ondas com o sistema hidrotérmico na síntese de pós cerâmicos, buscando solucionar a questão do gradiente térmico e da lenta velocidade de reação. A utilização da energia de micro-ondas associada ao sistema hidrotérmico para a síntese de materiais oferece vantagens quanto à redução do tempo de processamento, economia de energia e baixa poluição atmosférica (KOMARNENI e KATSUKI, 2002; WU *et al.*, 2012).

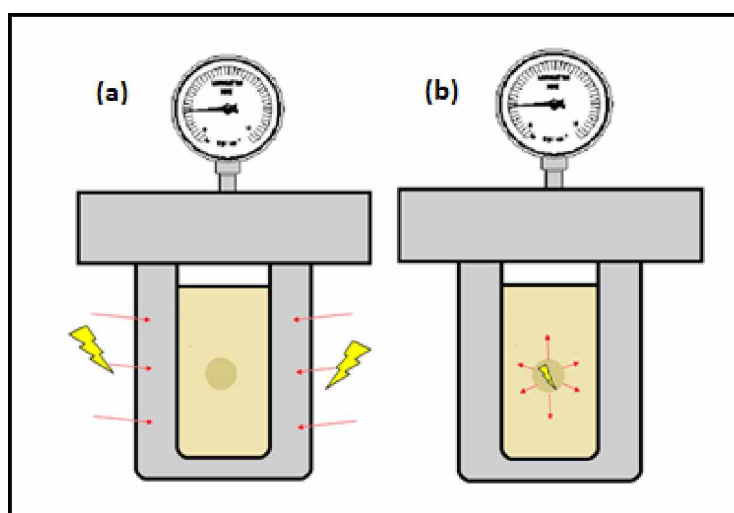
Alguns óxidos nanoestruturados tais como, óxidos de cobre, níquel, titânio e zinco têm sido obtidos por síntese hidrotérmica convencional em temperaturas amenas, na ordem de 90 °C a 200 °C e em tempos longos de síntese que podem variar entre 12 a 120 horas (CAO *et al.*, 2015; BURUNGALÉ *et al.*, 2016; FTERICH *et al.*, 2016; JIAO *et al.*, 2016). No sistema convencional, o solvente é aquecido de forma indireta por transmissão de calor. O reator, de aço inoxidável, é aquecido por meio de uma fonte externa de calor (por exemplo, por resistência elétrica) via condução térmica, e, por conseguinte, as regiões da solução em contato com a parede interna do reator irão se aquecer primeiramente, causando o aparecimento de gradientes térmicos (LIENHARD, 2013). No sistema hidrotérmico de micro-ondas, o aquecimento da solução é direto e homogêneo. Na associação do método hidrotérmico com a radiação de MO, o gradiente térmico praticamente não existe, o aquecimento ocorre no interior do material e dele é transferido para toda vizinhança. Devido a este processo, é possível observar uma nucleação homogênea e um crescimento uniforme das partículas (VOLANTI *et al.*, 2007; CHEN e LO, 2011; DE MOURA *et al.*, 2011; LEBEDEV *et al.*, 2012; PHURUANGRAT *et al.*, 2016).

A síntese hidrotérmica assistida por micro-ondas proporciona um aquecimento rápido no sistema. Esse rápido tratamento térmico, chamado de aquecimento dielétrico, envolve dois mecanismos principais para a transformação de energia eletromagnética em calor. O primeiro deles é chamado rotação de dipolo que se relaciona com o alinhamento das moléculas (que tem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo eletromagnético aplicado. Quando o campo é removido, as moléculas voltam a um

estado desordenado, e então, a energia que foi absorvida é dissipada na forma de calor. Como o campo eletromagnético oscila constantemente, ocorre assim um pronto aquecimento destas moléculas. O segundo mecanismo é conhecido como condução iônica, em que há uma movimentação translacional das cargas quando um campo elétrico é aplicado, levando a um aumento das colisões efetivas, portanto, a geração de energia cinética em energia térmica (SANSEVERINO, 2002; VOLANTI *et al.*, 2007).

Na Figura 5, estão ilustrados os dois processos de aquecimento, o convencional e o HM.

Figura 5. Esquema representativo da direção de fluxo de calor por (a) aquecimento de convecção convencional e (b) por aquecimento de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

I. M. Pinatti *et. al* (2016) sintetizaram CaTiO_3 puro e dopado com Sm^{3+} pelo método HM nas condições de síntese de 140°C por 16 minutos. Neste estudo, descreveram um processo para a obtenção direta de nanocristais de CaTiO_3 , em que a metodologia utilizada foi responsável pela presença de propriedades incomuns e interessantes para estes novos materiais luminescentes.

A. Phuruangrat *et. al* (2016) descreveram as propriedades magnéticas das nanopartículas de CuFe_2O_4 obtidos pelo método HM a 150°C por 20 minutos. A variação do pH na síntese influenciou nas morfologias das ferritas assim como na formação de diferentes defeitos estruturais, influenciando nas propriedades magnéticas. O grau de cristalinidade e o tamanho de partícula das nanoestruturas CuFe_2O_4 foram

melhorados aumentando da basicidade das soluções precursoras. A magnetização por saturação, a remanência e coercividade aumentaram com o aumento do tamanho das partículas e o grau de cristalinidade das nanopartículas.

L. F. da Silva *et. al* (2016) descreveram a formação de nanobastões de Ag_2WO_4 pelo método HM em 160 °C por 60 minutos, em que as amostras foram testadas para detecção de acetona, etanol e amônia. As experiências para detecção de gás, realizadas a 350 °C revelaram sua maior sensibilidade à acetona, em comparação aos outros gases, com tempo de resposta rápida e boa reprodutibilidade.

L. S. R. Rocha *et. al* (2016) sintetizaram nanoestruturas de ZnO obtidas pelo método HM variando a temperatura de reação (120 e 140 °C) a um tempo curto de síntese de 8 minutos. Estes materiais demonstraram um grande potencial como novos sensores de gás O_3 e mostrou boa sensibilidade para baixas concentrações de O_3 .

K. Shingange *et. al* (2017) sintetizaram nanoestruturas de ZnO com diferentes morfologias pelo método HM a 100 °C no tempo de síntese de 10 minutos. Avaliou-se o efeito da variação do pH e também o efeito da temperatura de calcinação (450 °C) na morfologia das partículas, nas propriedades luminescentes, magnéticas e na aplicação como sensor de gás na detecção de amônia.

R. M. Thankachan *et. al* (2017) sintetizaram nanoestruturas de ZnO com diferentes morfologias pelo hidrotérmico de micro-ondas variando o tempo de síntese de 1 - 2 minutos, com posterior calcinação à 400 °C por 60 minutos. Avaliou-se o efeito da variação do tempo de síntese e também o efeito da temperatura de calcinação na morfologia das partículas e nas propriedades fotocatalíticas, avaliadas frente à degradação do corante rodamina B.

1.5. Luminescência

No decorrer da história da ciência, desde a antiguidade há um fascínio em materiais que brilham, ou seja, sólidos que possuam propriedades de luminescência intrínseca tem contribuído para o desenvolvimento de pesquisas científicas e tecnológicas em toda área acadêmica.

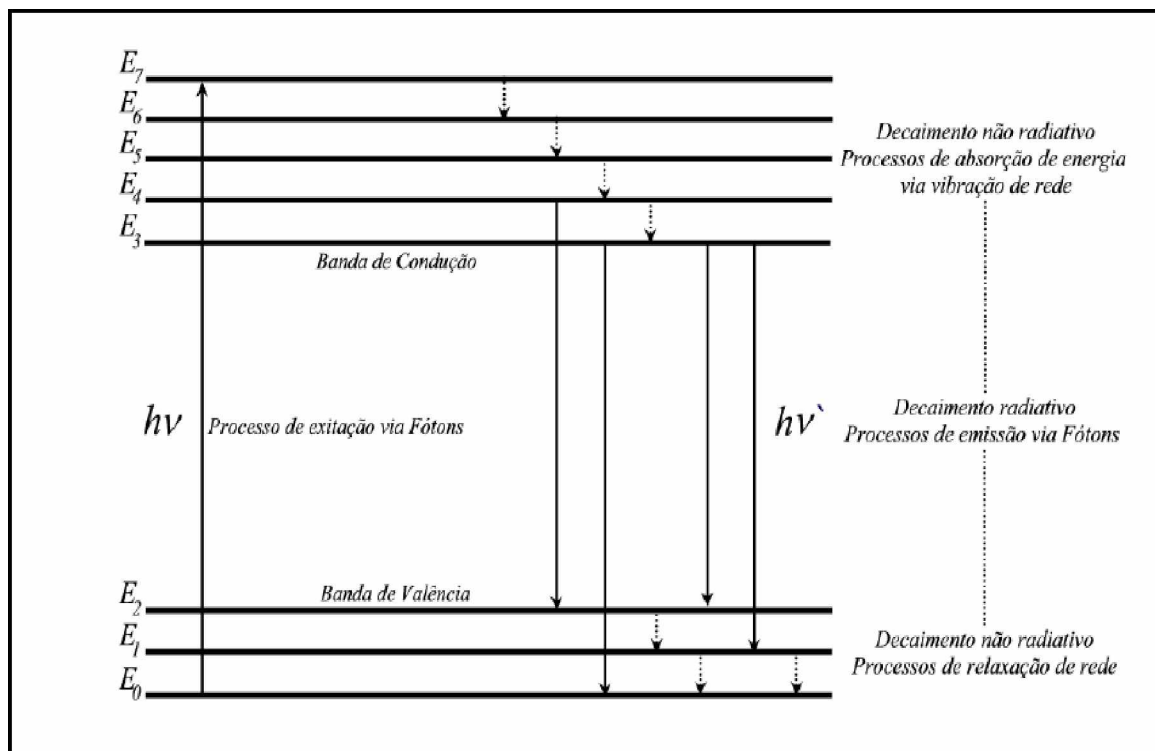
Os primeiros estudos relatados a respeito da luminescência de materiais sólidos são registrados no século XVII em 1603, em que foram realizados por um sapateiro

italiano chamado Vincenzo Cascariolo, situado na província de Bolonha na Itália. Vincenzo observou que ao promover um tratamento de redução térmica do mineral barita (BaSO_4) com carvão mineral, o produto obtido (BaS) emitia luz após ser exposto à radiação solar, por horas ou até dias. Levou mais de 400 anos para que os cientistas entendessem o fenômeno, o qual foi identificado impurezas no mineral - íons Cu^+ , que intensificam o processo de luminescência. O mineral logo passou a ser chamado de Pedra de Bolonha, um fato importante para os primeiros registros do fenômeno de luminescência persistente, conhecida como a emissão de luz observada após exposição a uma dada fonte de radiação (BRITO *et al.*, 2012; LASTUSAARI *et al.*, 2012).

A luminescência é um fenômeno no qual um fóton de maior energia é absorvido e um fóton de menor energia é então emitido, sendo que esse termo usualmente vem acompanhado de um prefixo que se relaciona com a fonte de energia excitante. O fenômeno da luminescência pode ser classificado de acordo com a fonte excitante de energia (CASALI *et al.*, 2014), como, por exemplo, a eletroluminescência, a termoluminescência, a catodoluminescência, a bioluminescência, a quimiluminescência, e a fotoluminescência. A eletroluminescência consiste no processo em que a energia de excitação é proveniente de tensões elétricas, a termoluminescência a emissão de luz é resultante de estímulos por aquecimento e a catodoluminescência, a energia provém do feixe de elétrons ou de raios catódicos. Na quimiluminescência e bioluminescência, a energia é proveniente de reações químicas e dos mecanismos biológicos, respectivamente, e na fotoluminescência, o processo de excitação ocorre por meio de fótons cujos comprimentos de onda estão localizados na região do visível e ultravioleta do espectro eletromagnético (LUCENA *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2015).

O processo de luminescência é apresentado na Figura 6, em que uma fonte de excitação emite um fóton de maior energia que é absorvido por um elétron no estado fundamental (E_0), conduzindo-o ao estado excitado (E_7). Ao retornar para o estado fundamental (E_0) ocorre a emissão de radiação eletromagnética (processo radiativo). No entanto, existe um processo competitivo com o fenômeno fotoluminescente (processo não radiativo), no qual a energia é dissipada na forma de vibrações (OLIVEIRA, 2012).

Figura 6. Representação dos processos de excitação, decaimento radiativo e decaimento não radiativo durante o fenômeno da luminescência.



Fonte: (OLIVEIRA, 2012).

O interesse em desenvolver materiais que apresentem propriedade fotoluminescente (FL) pode ser observado após ser reportada na literatura a emissão FL na região do visível em silício poroso à temperatura ambiente (CANHAM, 1990). Os defeitos estruturais no silício gerados com o aumento da porosidade fez-se com que o material apresentasse emissão FL na região do visível à temperatura ambiente, enquanto que o material completamente ordenado não apresentou propriedade FL.

Em particular, neste trabalho o estudo do comportamento óptico dos materiais no estado sólido será baseado no fenômeno da Fotoluminescência, visto que em sólidos semicondutores, a emissão de luz se dá através de uma luminescência interbanda (onde o elétron decai da banda de condução para a banda de valência) quando o semicondutor é excitado por um fóton com energia maior que a energia da banda proibida (energia de $gap - E_g$). Uma fonte de excitação emite fótons de alta energia que promovem os elétrons da banda de valência para a banda de condução, que momentaneamente geram buracos na banda de valência. Neste processo, inicialmente, os elétrons são promovidos para estados mais altos na banda de condução, permanecendo por pouco

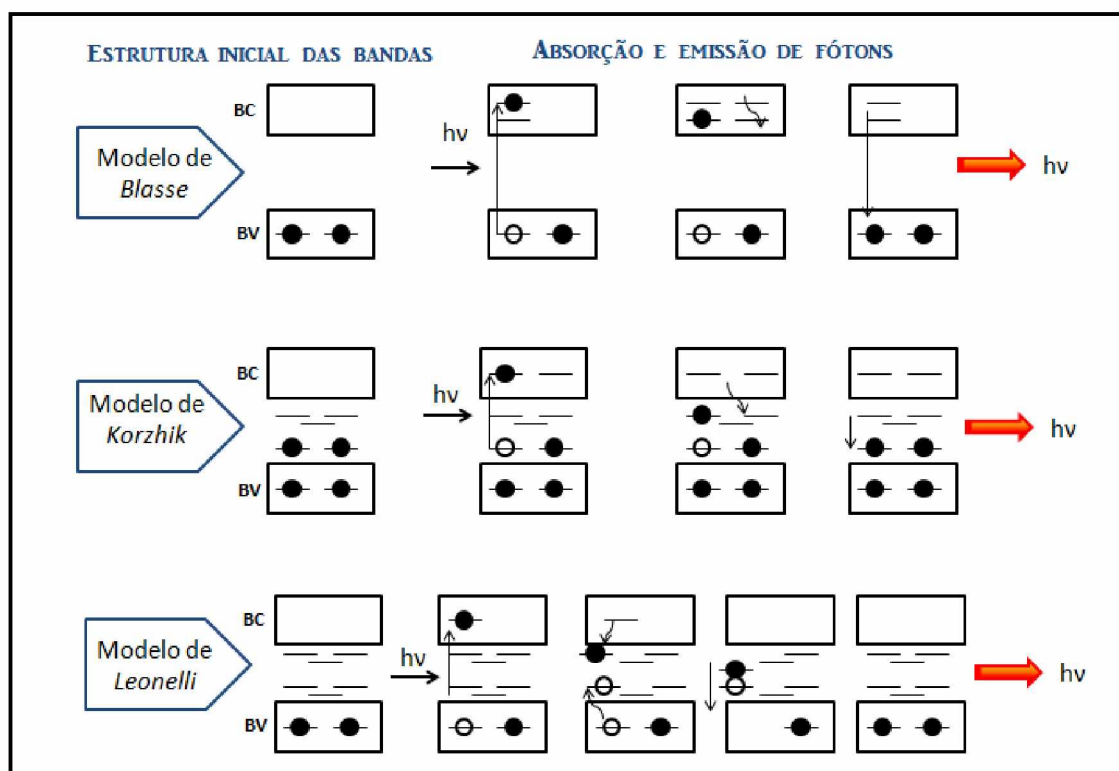
tempo nestes estados (CAVALCANTE *et al.*, 2008; ISHIZUMI *et al.*, 2011; OLIVEIRA, L. H. *et al.*, 2012).

A fotoluminescência tem sido aplicada como uma técnica bastante eficaz na caracterização óptica de materiais, pois fornece informações importantes de defeitos e formação de novos estados intermediários na região do *gap* em níveis superficiais e profundos da maioria dos semicondutores. Os semicondutores também podem apresentar defeitos estruturais advindos do método de preparação e do crescimento no meio reacional que poderão influenciar nas propriedades fotoluminescentes (DE MOURA *et al.*, 2010; ISHIZUMI *et al.*, 2011; CAVALCANTE *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2012; PINATTI *et al.*, 2016).

Na literatura (ANICETE-SANTOS *et al.*, 2007) descrevem-se alguns modelos que interpretam os mecanismos responsáveis pelo processo de fotoluminescência em semicondutores. Destacam-se três modelos que explicam a origem da fotoluminescência:

- 1- O modelo proposto por *Blasse* é baseado diretamente nas transições dos elétrons da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC). O processo de decaimento do elétron pode ser acompanhado por recombinações radiativas e não radiativas (vibrações de rede) (BLASSE e GRABMAIER, 1994).
- 2- O modelo de *Korzhik* é proposto na modificação do modelo de *Blasse* e sugere a existência de estados intermediários entre as bandas de valência e de condução, principalmente devido à presença de defeitos estruturais causados pelas vacâncias de oxigênio (KORZHIK *et al.*, 1996).
- 3- O modelo de *Leonelli* levou em consideração a polarização da rede cristalina. O pesquisador propôs que durante a excitação os movimentos dos elétrons no cristal podem causar deformações estruturais (efeito conhecido como *polaron*) dentro da banda proibida (LEONELLI e BREBNER, 1986). Uma representação esquemática dos modelos descritos acima pode ser visualizada na Figura 7.

Figura 7. Representação esquemática dos três principais modelos teóricos para a explicação do fenômeno de emissão fotoluminescente.



Legenda: BC (banda de condução) e BV (banda de valência). E os círculos pretos representam os elétrons e os círculos brancos representam os buracos.

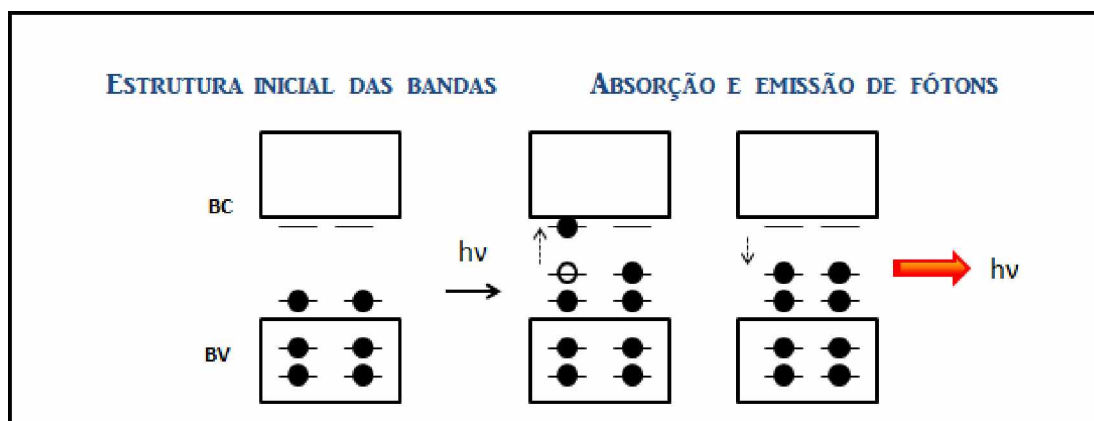
Fonte: adaptado de (ANICETE-SANTOS *et al.*, 2007).

O estudo das propriedades fotoluminescentes atualmente tem sido baseado no modelo de banda larga (Figura 8). Este modelo pressupõe que a quebra de simetria causada por distorções (curto ou médio alcances) sobre os clusters modificadores da rede cristalina, gera uma distribuição não homogênea de cargas na estrutura. Como consequência disto, origina-se estados energeticamente localizados próximos à banda de valência que podem capturar os elétrons aleatoriamente, nesse contexto ainda, os fótons incidentes podem excitar os elétrons aprisionados próximo a banda de valência. Após o decaimento (processo de emissão), as variadas contribuições dos diferentes estados de energia resultam em espectro de fotoluminescência de banda larga, podendo abranger todo espectro eletromagnético (CAVALCANTE *et al.*, 2007).

O modelo de banda larga implica na existência de ordem-desordem estrutural nos clusters a médio e curto alcances. Quando ocorre uma relativa mudança na posição de equilíbrio dos átomos de um cluster via distorção de ângulos, por exemplo, pode-se

dizer que há uma desordem a médio alcance. A ordem a curto alcance é o arranjo espacial dos átomos que se estende apenas aos vizinhos mais próximos de cada átomo observados em materiais cristalinos (ANICETE-SANTOS *et al.*, 2007; CAVALCANTE *et al.*, 2007; LIMA, R. C. *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2012).

Figura 8. Representação esquemática do modelo teórico de banda larga.



Legenda: BC (banda de condução) e BV (banda de valência). E os círculos pretos representam os elétrons e os círculos brancos representam os buracos.

Fonte: adaptado de (ANICETE-SANTOS *et al.*, 2007; CAVALCANTE *et al.*, 2007).

O comportamento dos espectros de fotoluminescência do ZnO puro e dopado com íons terras-raras ainda é limitado, ou seja, a propriedade óptica de fotoluminescência é dependente tanto do grau de organização estrutural, quanto do método de preparação dos materiais, dificultando a construção de um modelo ou teoria. Portanto, é importante compreender a influência de diferentes métodos de síntese no grau de organização estrutural e nas propriedades ópticas. Pode-se destacar, por exemplo, alguns trabalhos relevantes publicados de fotoluminescência aplicada ao ZnO.

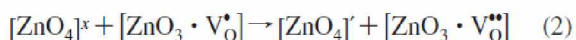
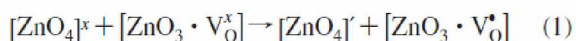
K. Vanheusden *et. al* (1995) estudaram a propriedade FL do ZnO comercial de variados fornecedores e correlacionaram com os resultados obtidos por Ressonância Paramagnética Eletrônica. Os autores relataram que V_O^\bullet (vacâncias de oxigênio monopositivas) é o defeito pontual intrínseco paramagnético que está relacionado com a emissão na região do verde do espectro eletromagnético.

S. A. Studenikin *et. al* (1998) estudaram o efeito da fotoluminescência em filmes de ZnO preparados pelo método spray pirólise. As bandas de FL observadas na região do visível estão associadas com a quantidade de oxigênio no filme. A emissão verde

surge pela deficiência de oxigênio em uma camada abaixo da superfície do cristalito, enquanto que as emissões amarelo-laranja surgem nas amostras ricas em oxigênio.

S. A. M. Lima *et. al* (2001) sintetizaram ZnO pela decomposição térmica do hidroxicarbonato de zinco, na qual, a emissão na região ultravioleta se dá pelos processos de recombinação excitônica e atribuíram que banda de emissão na região verde-amarela em 2,32 eV é devido à presença de Zn^{2+} intersticial (Zn_i).

R. C. Lima *et. al* (2008) descreveram o mecanismo envolvido na fotoluminescência do ZnO em relação ao grau de ordem/desordem estrutural que o material pode apresentar de acordo com as possíveis configurações adotadas pelo ZnO durante o processo de síntese hidrotérmico convencional e hidrotérmico de micro-ondas. A ordem/desordem está ligada com a modulação de oxigênio em relação ao cluster $[ZnO_4]$ dando origem a interação entre os clusters $[ZnO_3]$ e as espécies V_O^x , V_O^\bullet e $V_O^{\bullet\bullet}$ e criando clusters complexos, $[ZnO_3 \cdot V_O^x]$, $[ZnO_3 \cdot V_O^\bullet]$ e $[ZnO_3 \cdot V_O^{\bullet\bullet}]$ segundo as equações 1 e 2. Com a criação destes clusters complexos são formados novos estados intermediários dentro do *band gap* que podem ser associados às vacâncias de oxigênio – Zn^{2+} intersticiais.



W. E. Mahmoud (2010) sintetizou ZnO dopado com Ce^{4+} (15% em mol) pelo método hidrotérmico convencional (150°C – 24h), com posterior calcinação dos precursores a 600 °C. As fortes emissões FL na região do ultravioleta e verde do espectro visível foram atribuídas a inserção do dopante na estrutura cristalina do ZnO, apontando uma sensível relação entre a propriedade FL e os defeitos estruturais gerados com a dopagem.

N. Qin *et. al* (2014) sintetizaram nanoestruturas de ZnO com diferentes formas (disco hexagonal, primas e pirâmide) pelo método hidrotérmico, investigando o efeito do pH (7-10), do surfactante e da temperatura de calcinação neste sistema. Os resultados apontaram para uma sensível dependência da fotoluminescência com os defeitos estruturais e com os aspectos morfológicos. A forma do tipo disco hexagonal com a face (0001) mais exposta tem uma maior quantidade de vacâncias de oxigênio do que as outras três microestruturas, evidenciando uma emissão verde/azul mais intensa.

T. Pandiyarajan *et al.* (2015) por intermédio do método hidrotérmico após calcinação (500 °C por 1h), prepararam ZnO dopado com Sm^{3+} (0 – 1,5% em mol). Todos os espectros fotoluminescentes exibiram a emissão UV forte e com menor intensidade bandas de emissão na região visível, assim, confirmaram que as nanoestruturas preparadas possuíam menor concentração de defeitos estruturais.

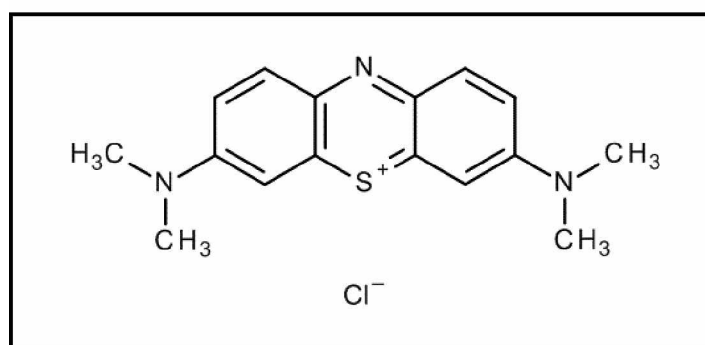
1.6. Processos fotocatalíticos: fotocatalise heterogênea e catalisadores

As indústrias químicas de cosméticos, farmacêutica, de couro, de papel, embalagens e têxteis, por exemplo, utilizam grandes quantidades de corantes em escala de produção e consomem água limpa durante esses processos, retornando ao meio ambiente como efluente. O descarte destes efluentes coloridos no ecossistema é uma fonte dramática de poluição ambiental, de eutrofização e de perturbações na vida aquática (LUCILHA e TAKASHIMA, 2009; BRILLAS, 2014; LOPES *et al.*, 2015).

O corante com uma ampla gama de aplicação no meio industrial é o azul de metileno (AM), comumente utilizado na produção de papel e em outros materiais, como fibras de poliésteres e nylons. Além destas aplicações citadas, o AM é também utilizado como indicador em reações químicas, nas análises biológicas e na indústria farmacêutica (HOUAS *et al.*, 2001; LACHHEB *et al.*, 2002; HONORATO *et al.*, 2015; PAL *et al.*, 2016).

O AM, *Colour Index* (C.I.) 52015, é classificado como um composto aromático heterocíclico (Figura 9), com fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ e massa molar 373,86 g. mol⁻¹, o qual trata-se de um corante básico com absorção máxima em 663 nm. Uma das características dos corantes básicos é o fato de serem solúveis em água produzindo cátions coloridos e, portanto, também são assim reconhecidos como corantes catiônicos (LACHHEB *et al.*, 2002; SCOTTI *et al.*, 2006; LIBERATTI *et al.*, 2014; HONORATO *et al.*, 2015).

Figura 9. Estrutura molecular do corante azul de metileno.



Fonte: (HOUAS *et al.*, 2001).

Em virtude de sua aplicação irrestrita e seu efeito tóxico causado sobre o ambiente aquático, tem-se uma necessidade de um tratamento prévio de seus efluentes antes do lançamento nas águas; desta forma, novas tecnologias vem sendo estudadas com o intuito de minimizar estes riscos (KUNZ *et al.*, 2002; RAFATULLAH *et al.*, 2010; WIEDMER *et al.*, 2016). Assim, há uma crescente necessidade pelo desenvolvimento de novos processos de tratamento de efluentes que garantam um baixo nível de contaminantes.

O desenvolvimento de tratamentos químicos tem mostrado que a fotocatalise heterogênea, fazendo parte dos processos de oxidação avançados (POAs), representam uma valiosa alternativa para redução de subprodutos e cor desses efluentes (NOGUEIRA e JARDIM, 1998; PALFI *et al.*, 2011; RAVELLI *et al.*, 2011). Os POAs são métodos de fotocatalise avançada que utilizam como fonte de degradação os radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) os quais, são altamente oxidantes e não seletivos capazes de reagir com quase todas as classes de compostos orgânicos (HOFFMANN *et al.*, 1995; HOUAS *et al.*, 2001; HERRMANN *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2008).

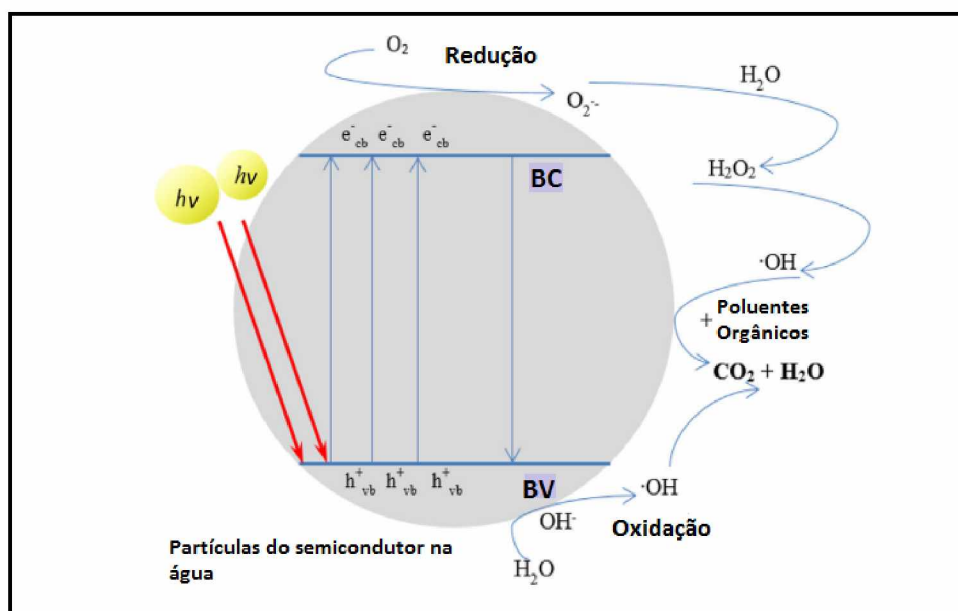
O conceito para o desenvolvimento de fotocatalise heterogênea surgiu em 1972 com Fujishima e Honda, que descreveram a foto-oxidação da água em eletrodos de dióxido de titânio (TiO_2) para a obtenção de hidrogênio e oxigênio (FUJISHIMA e HONDA, 1972). Esse processo fotocatalítico é baseado na irradiação de um semicondutor (catalisador) que posteriormente é fotoexcitado para a formação de sítios oxidantes e redutores, promovendo grande extensão de reações químicas.

A habilidade de um semicondutor, sob irradiação solar ou artificial, em aumentar a velocidade de degradação de um composto orgânico, por exemplo, é atribuída à sua estrutura eletrônica, caracterizada pela separação de cargas das bandas de valência

completa e de condução, vazia. Ao irradiar o semicondutor com energia igual ou maior que a energia de *gap*, os elétrons da banda de valência (BV) são excitados à banda de condução (BC) levando a um processo de separação de cargas, entre os elétrons e buracos (HOFFMANN *et al.*, 1995; KUMAR e DEVI, 2011).

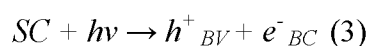
O buraco gerado na BV possuirá um potencial elevado e suficientemente positivo para incentivar a geração de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) a partir de moléculas de água adsorvidas na superfície do semicondutor (Figura 10), os quais podem subsequentemente oxidar o contaminante orgânico até a completa mineralização (MACHADO *et al.*, 2008; JANITABAR-DARZI, 2014; PAN, 2016).

Figura 10. Representação esquemática do mecanismo simplificado de fotoativação de um semicondutor.

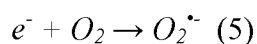
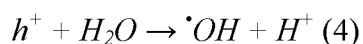


Fonte: adaptado de (LEE *et al.*, 2016).

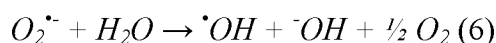
O elétron da banda de condução é capturado pelo oxigênio, obtendo radicais superóxido, que podem também promover a oxidação de compostos orgânicos. A fotoativação da partícula do semicondutor começa a partir da absorção de luz (NOGUEIRA e JARDIM, 1998; LUCILHA e TAKASHIMA, 2009), conforme demonstrado na equação 3:



Estes pares podem se recombinar e dissipar a energia como calor, ou migrar à superfície do semicondutor e participar das reações de oxidação-redução interfaciais com a formação de $\bullet\text{OH}$ (Equação 4) e do ânion radical superóxido, $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Equação 5) (OLIVEIRA, D. F. M. *et al.*, 2012; PAPOULIS *et al.*, 2013; PAN, 2016).



O ânion radical superóxido na presença de H_2O é convertido em radical hidroxila (Equação 6) que degrada o contaminante (NOGUEIRA e JARDIM, 1998; GIRALDI *et al.*, 2012):



Algumas características desejáveis para a escolha de um bom semicondutor são estabilidade química e fotoquímica, insolubilidade na água, não toxidez, área superficial elevada, possibilidade de ativação por luz, baixo custo e distribuição uniforme de tamanho (HOFFMANN *et al.*, 1995; HERRMANN, 2005a; MACHADO *et al.*, 2008; MACHADO, 2011; WANG *et al.*, 2015).

Estes materiais quando submetidos a uma fonte de radiação de energia maior ou igual a sua energia de *gap*, são capazes de impulsionar os elétrons da banda de valência para banda de condução, ativando então o semicondutor. Os semicondutores são sólidos geralmente cristalinos que apresentam condutividade elétrica intermediária, ou seja, entre condutores e isolantes. A quantidade de energia necessária para excitar um elétron da banda de valência e promovê-lo para banda de condução é o que determina se um sólido será um condutor, semicondutor ou isolante. Para um semicondutor, pela definição esta energia é abaixo dos 4,0 eV e acima disto é considerado isolante (SHACKELFORD, 2008).

Os óxidos semicondutores como TiO_2 , CeO_2 , ZnO , WO_3 , Fe_2O_3 , Bi_2O_3 e SnO_2 podem atuar como sensibilizadores em fotocatalise heterogênea devido a sua estrutura eletrônica e propriedades, tais como fotoatividade e fotoestabilidade (YANG *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2013; KUMAR e RAO, 2015; LEI *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015; PAN *et al.*, 2016; WANG e HUANG, 2016; SAMADI *et al.*, 2016).

Dentre os catalisadores citados acima, o TiO_2 tem apresentado, segundo a literatura maior aproveitamento nos processos catalíticos e maior rendimento quântico na mistura das fases anatase e rutilo, devido à sua formação em temperaturas abaixo de $600\text{ }^\circ\text{C}$, o que favorece a formação de partículas com grande área superficial e alta densidade de sítios ativos (HERRMANN, 1999; LIU *et al.*, 2010; DING *et al.*, 2016).

Apesar das vantagens ao uso de TiO_2 frente aos processos catalíticos, algumas alternativas tem sido buscadas, como por exemplo o ZnO . Este óxido apresenta características análogas ao TiO_2 (anatase), praticamente apresentam mesma energia de *gap* e além disso, como vantagem o ZnO é mais barato.

A dopagem com cátions metálicos ou ânions não metálicos tem sido amplamente utilizada para a modificação de ZnO para melhorar a sua atividade fotocatalítica ou para prolongar a sua absorção de luz na região visível (AHMAD *et al.*, 2013; ACHOURI *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2016; SAMADI *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2016). Sabe-se que a dopagem com íon metálico pode modificar as propriedades de superfície de ZnO , que dificultam a recombinação dos pares elétron-buraco fotogerados, e aumenta a quantidade de sítios ativos. Em especial, a atividade fotocatalítica de ZnO pode ser significativamente melhorada a partir da dopagem com os íons lantanídeos possuindo configuração 4f (AHMAD *et al.*, 2015; HEMALATHA *et al.*, 2016).

A dopagem de ZnO com íons terras-raras para o estudo das propriedades fotocatalíticas ainda é relativamente pouco estudado na literatura. No entanto, tem-se observado resultados promissores para a fotodegradação de corantes têxteis e alimentícios, tais como, vermelho 23, rodamina B, azul de metileno, alaranjado de metila, *acid Orange 7*, dentre outros (FAISAL *et al.*, 2013; ÖKTE, 2014; KHATAEE *et al.*, 2015; KUMAR, R. *et al.*, 2015; LIANG *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2015; HEMALATHA *et al.*, 2016).

Entre os íons, a dopagem com cério é um pouco mais explorada, despertando um interesse devido ao tamanho relativamente grande do íon, o qual produz uma perturbação de carga localizada durante a dopagem substitucional na rede cristalina do ZnO , podendo provocar então um aumento na sua atividade fotocatalítica (REZAEI e HABIBI-YANGJEH, 2013; CHANG, LIN e HSU, 2014; AHMAD *et al.*, 2015). A dopagem com íons Sm^{3+} e Gd^{3+} para a aplicação em fotocatalise ainda é pouco investigada, o que desperta um interesse especial em investigar também as propriedades destes íons terras-raras.

Dentro deste contexto, no presente trabalho, foi desenvolvido um estudo a respeito do método de obtenção do óxido semicondutor ZnO e da investigação do efeito dos íons terras-raras Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} na estrutura cristalina e eletrônica do óxido em questão.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- ✓ Propor uma rota experimental visando a obtenção das nanoestruturas de ZnO puro e dopado com os íons Ce^{4+} , Gd^{3+} e Sm^{3+} em condições de baixa temperatura de síntese e curtos tempos de reação;
- ✓ Estudar o efeito dos íons terras-raras Ce^{4+} , Gd^{3+} e Sm^{3+} incorporados na rede do ZnO em relação à estrutura cristalina e eletrônica, à morfologia, ao tamanho das partículas e área superficial;
- ✓ Investigar as propriedades fotoluminescentes dos materiais obtidos;
- ✓ Avaliar a atividade fotocatalítica dos materiais obtidos frente à degradação do corante têxtil azul de metileno.

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Neste trabalho, as amostras puras e dopadas de ZnO foram sintetizadas pelo método hidrotérmico de micro-ondas. Para uma melhor compreensão das etapas de formação dos materiais, bem como, de suas propriedades estruturais e ópticas, este tópico foi orientado para uma descrição minuciosa dos reagentes químicos utilizados, do equipamento de micro-ondas para síntese e das técnicas de caracterização empregadas.

3.1. Reagentes

Todos os reagentes químicos utilizados nas sínteses hidrotérmicas foram de grau analítico. As empresas fornecedoras e os respectivos graus de pureza de cada precursor estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Reagentes empregados na síntese hidrotérmica.

Reagentes	Fórmula	Pureza (%)	Procedência
Acetato de zinco dihidratado	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	99,9	Sigma-Aldrich
Nitrato de cério (III) hexahidratado	$\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	99	Vetec
Óxido de gadolínio	Gd_2O_3	99	Sigma-Aldrich
Óxido de samário	Sm_2O_3	99	Sigma-Aldrich
Hidróxido de potássio	KOH	99	Synth
Polietilenoglicol (400)	$(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}_2\text{O}$	99	Sigma - Aldrich
Ácido Nítrico P.A.	HNO_3	96	Sigma - Aldrich
Álcool etílico P.A.	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	99	Synth

Fonte: o Autor (2017).

3.2. Síntese dos materiais

No presente trabalho, foram utilizados os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} como dopantes, variou-se a concentração dos mesmos e o tempo de síntese, mantendo os parâmetros de síntese, tais como, temperatura e taxa de aquecimento para todas as amostras. Os procedimentos da síntese foram realizados sob condições de alta pureza a fim de se evitar quaisquer contaminações externas.

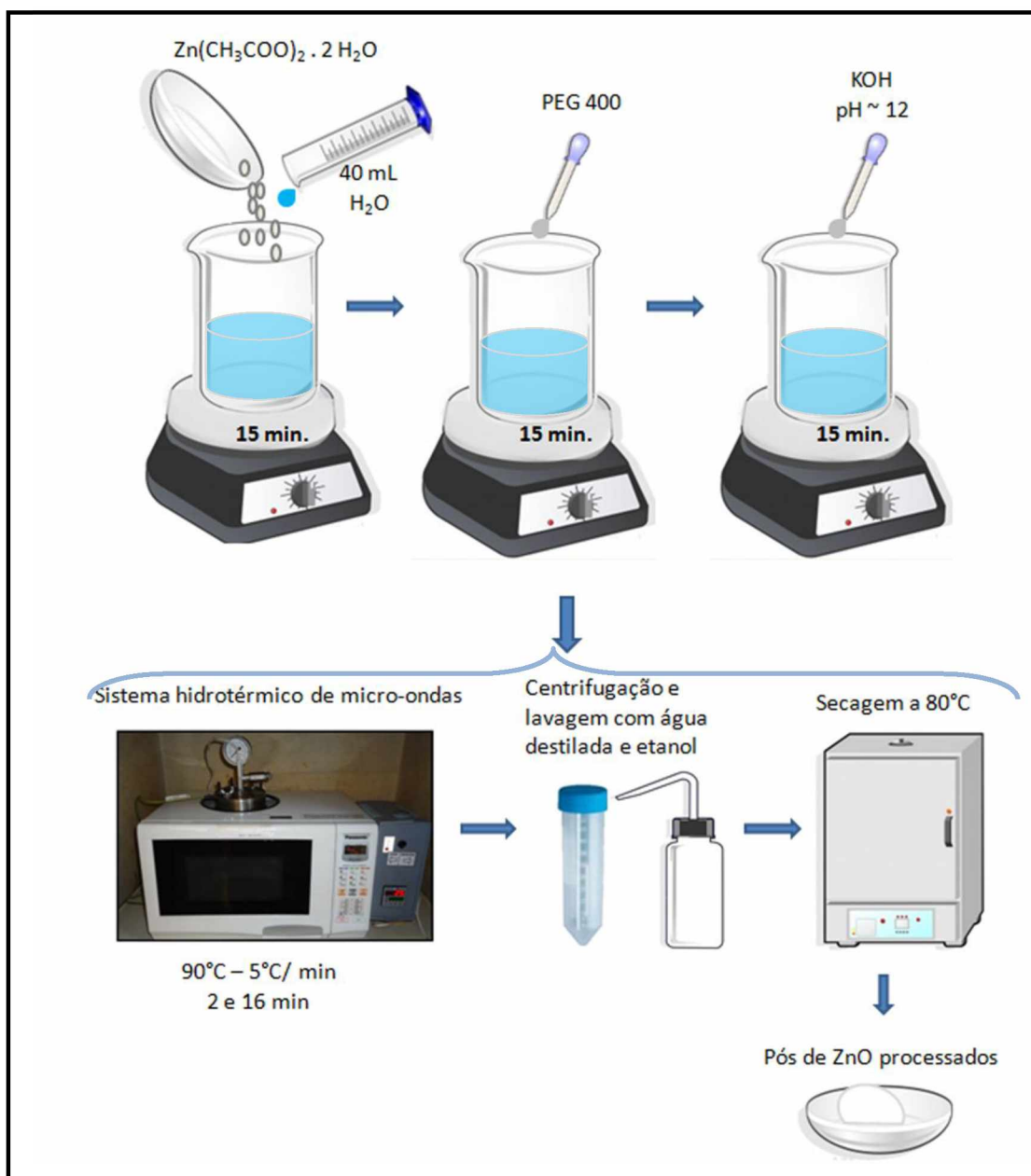
Primeiramente, para a síntese do óxido de zinco puro, foi adicionado 2,68 g de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ à 40 mL de água destilada. Esta solução foi colocada sob constante agitação até dissolução completa do sal. A esta solução foi acrescentada 1,0 mL de polietilenoglicol 400 (PEG 400). O valor de pH foi elevado a aproximadamente 12 com a adição de uma solução de KOH 2 mol.L⁻¹.

As soluções dos íons Sm^{3+} e Gd^{3+} foram preparadas a partir dos óxidos correspondentes, utilizando o HNO_3 concentrado e aquecimento. As amostras dopadas com Sm foram obtidas com a adição estequiométrica da solução de $\text{Sm}(\text{NO}_3)_3$ 0,28 mol.L⁻¹ (1,0 e 2,0% em mol), sob constante agitação. O mesmo foi feito para as amostras dopados com Gd, utilizando uma solução de $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3$ 0,28 mol.L⁻¹. Para o preparo das amostras dopadas com Ce seguiu-se o mesmo procedimento, porém foram adicionadas quantidades estequiométricas de Ce^{3+} (1,0 e 2,0% em mol) a partir do precursor $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$.

As soluções foram transferidas para o recipiente de politetrafluoretileno (Teflon) que foi inserido no reator, com posterior fechamento do reator. Sob as condições do método hidrotérmico de micro-ondas, o sistema reacional foi aquecido a uma temperatura de 90 °C variando-se o tempo de síntese por 2 e 16 minutos, com taxa de aquecimento de 5 °C / minuto. A pressão dentro da autoclave ficou estabilizada em 1,5 atm.

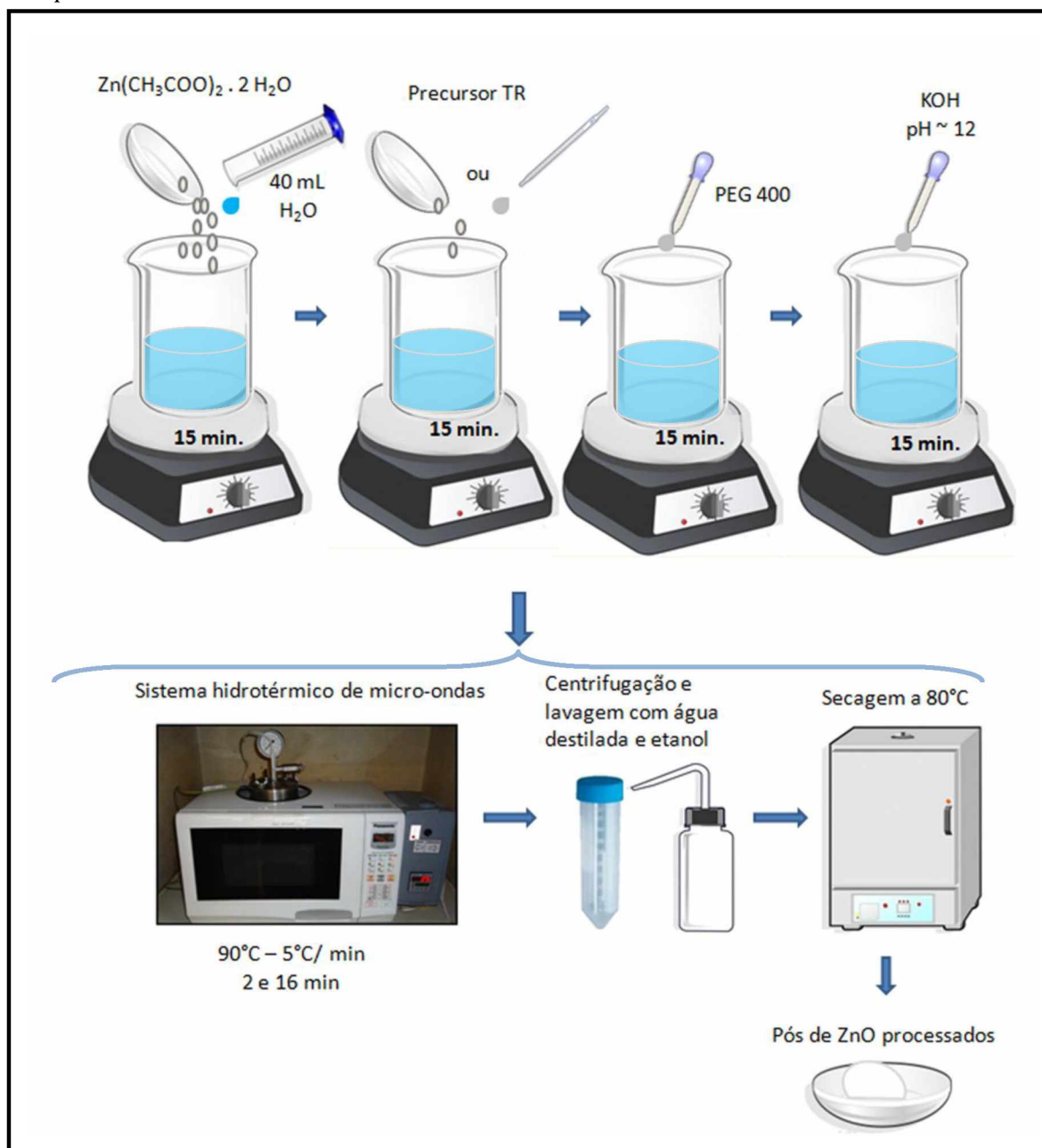
Os produtos obtidos foram centrifugados, lavados repetidas vezes com água destilada a quente e etanol, por fim, secos em estufa à 80 °C. As Figuras 11 e 11.1 apresentam uma representação esquemática do processo de síntese das amostras obtidas pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

Figura 11. Representação esquemática do processo de síntese para amostra pura.



Fonte: o Autor (2017).

Figura 11.1. Representação esquemática do processo de síntese para as amostras dopadas.



Fonte: o Autor (2017).

3.3. Método hidrotérmico de micro-ondas (HM)

O equipamento para sínteses hidrotérmicas neste trabalho foi desenvolvido a partir da modificação de um forno de micro-ondas doméstico (Panasonic - 2,45 GHz, 800 W) (Figura 12). Como garantia de um melhor desempenho, segurança e controle durante as sínteses, o painel eletrônico do forno micro-ondas foi desativado e o funcionamento do magnetron foi diretamente ligado ao comando de um controlador externo de temperatura (limite de 140 °C). Todos os equipamentos metálicos do sistema foram aterrados para evitar a formação de arcos voltaicos que possa causar danos ao equipamento. A célula reacional para o processamento hidrotérmico foi quase toda constituída em Teflon, pois é inerte e um bom isolante térmico.

A tampa superior do reator foi totalmente fabricada em aço inoxidável para minimizar a corrosão causada por solventes químicos, evitando a contaminação do meio reacional desta ordem. Além disso, nesta tampa, são fixados uma válvula de pressão (limitada a 15 bar), um manômetro de pressão para a leitura da pressão interna e uma espécie de “entrada” de aço inoxidável para abrigar o termopar.

A parte inferior do reator, o qual fica inteiramente dentro do micro-ondas, é um cilindro constituído de Teflon. Na cavidade interna é reservado um espaço para o devido encaixe do copo reacional, também de Teflon, pois o torna transparente a ação das micro-ondas.

Figura 12. Imagens do sistema HM e seus componentes.



Fonte: o Autor (2017).

3.4. CARACTERIZAÇÕES DOS MATERIAIS

3.4.1. Difração de raios X (DRX)

Para estudar e analisar o comportamento da estrutura e o grau de cristalinidade das amostras de ZnO puro e dopado com íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} preparados pelo método hidrotérmico de micro-ondas, medidas de difratometria de raios X foram obtidas em um difratômetro modelo Shimadzu XRD 6000, usando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) com tensão 20 kV e 10 mA em um intervalo de 10 a 100° no modo 2θ , com passo de $0,02^\circ$ e com acumulação de 1s / ponto. As medidas de DRX foram realizadas no Laboratório Multiusuário (LMIQ – UFU) do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

Os difratogramas das amostras foram comparados e analisados com base nas fichas cristalográficas padrão JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standard).

A análise de refinamento Rietveld é uma ferramenta de análise estrutural para interpretação dos padrões de difração de raios X. A concepção fundamental deste método é obter o melhor ajuste possível de um difratograma experimental em relação a um padrão de difração. Isto permite encontrar informações relacionadas à estrutura cristalina, como por exemplo, determinação de fases cristalográficas, dos parâmetros de rede (dimensão de célula unitária), volume da cela unitária e posições atômicas (SAKATA e COOPER, 1979; BISH e HOWARD, 1988; PAUFLER, 1995).

No método de Rietveld, o refinamento dos parâmetros é definido por meio de uma função de minimização de resíduo (S) com o número de pontos medidos no difratograma baseado no princípio dos mínimos quadrados (PAUFLER, 1995):

$$S = \sum W_i (Y_i - Y_{ic})^2 \quad (7)$$

Em que W_i é o peso correspondente a cada intensidade ($W_i = 1/Y_i$), Y_i e Y_{ic} são as intensidades observadas e calculadas no i -ésimo ponto, respectivamente.

Para verificar a qualidade do refinamento, devem-se analisar alguns indicadores de confiabilidade executados no método de Rietveld, os mais comumente utilizados são o R_{wp} , R_{exp} , R_{Bragg} e χ^2 . O R_{wp} , índice ponderado do refinamento é descrito em função dos pontos do perfil do gráfico, como uma função da média ponderada das intensidades

calculadas e experimentais. Esse é o índice que deve ser analisado para verificar se o refinamento está convergindo. O R_{exp} diz respeito ao valor estatisticamente esperado para o R_{wp} relacionando-se com o número de parâmetros refinados. O R_{Bragg} é descrito como uma função das intensidades integradas, o parâmetro que indica a qualidade do modelo estrutural refinado, sendo que a intensidade integrada está relacionada com a estrutura cristalina. O fator de convergência ou precisão do ajuste, χ^2 , é determinado (JANSEN *et al.*, 1994; PAUFLER, 1995):

$$\chi^2 = R_{wp} / R_{exp} \quad (8)$$

Um valor de χ^2 igual a 1 indica que o R_{wp} atingiu o máximo de valores estatisticamente esperados para todos os parâmetros refinados.

Para as amostras de ZnO puro e dopada com os diferentes íons terras-raras, os refinamentos foram realizados por meio do programa *General Structure Analysis System* (GSAS) (LARSON e DREELE, 2000) com interface gráfica EXPGUI (TOBY, 2001). Os padrões difratométricos escolhidos foram retirados do banco de dados ICSD (*Inorganic Crystal Structure Database*) (Bases de estruturas cristalinas - Portal Periodicos CAPES).

3.4.2. Espectroscopia de espalhamento Raman

A Espectroscopia de Espalhamento Raman foi utilizada para a caracterização das estruturas obtidas das amostras de ZnO puro e dopada com os diferentes íons terras-raras Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} , para a identificação dos tipos de ligações e obtenção de informações sobre o grau de desordem da rede cristalina à curto alcance. Por Raman podem ser observados modos vibracionais e as bandas características do sistema analisado e, ainda, o ordenamento a curta distância das ligações. Neste trabalho, as medidas foram realizadas à temperatura ambiente com um espectrômetro portátil Ocean Optics equipado com laser de $\lambda = 785$ nm, operando em 499 mW. As medidas foram realizadas no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores - LNMIS do Departamento de Física da Universidade Federal de Uberlândia.

3.4.3. Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG) e análise de raios X por dispersão em energia (EDX)

A caracterização morfológica e distribuição do tamanho das partículas foram determinadas diretamente por medidas de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG).

As morfologias das amostras de óxido de zinco puro e dopado foram obtidas com o auxílio de dois equipamentos:

Um microscópio eletrônico de varredura com canhão de elétrons por emissão de campo modelo Supra 35-VP (Carl Zeiss, Alemanha) operando com feixe de elétrons incidentes 6 kV, medidas foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC) do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. E, também foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura modelo EVO MA 10 da Zeiss da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (FEQ-UFU).

A contagem do tamanho das nanoestruturas foi obtida por meio da contagem das partículas pelas imagens de microscopia eletrônica utilizando o programa ImageJ.

A análise elementar qualitativa das amostras foi realizada utilizando a espectroscopia de fluorescência de raios X por dispersão em energia (EDX), sistema OXFORD *Instruments*, no Laboratório Multiusuário (LMIQ – UFU) do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

3.4.4. Espectroscopia de reflectância difusa na região do Ultravioleta e visível (UV-vis)

Para as análises do comportamento óptico e eletrônico dos materiais foi utilizada a técnica de caracterização: espectroscopia óptica nas regiões do ultravioleta-visível, com auxílio de um equipamento modelo UVPC 2501 Shimadzu com esfera de reflectância difusa em um comprimento de onda na extensão de 200-800 nm. Foi utilizado como material de referência durante as análises o sulfato de bário (BaSO_4).

A partir dos espectros de reflectância difusa determinados à temperatura ambiente foi possível estabelecer a energia de *gap* dos óxidos obtidos.

As medidas foram realizadas no Laboratório de Fotoquímica e Química de Lignocelulósicos (LFQL) do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

3.4.5. Fotoluminescência

A fotoluminescência associada às outras técnicas de caracterização permite uma avaliação do grau de ordem e desordem estrutural das amostras. O comprimento de onda de excitação ($\lambda = 350,7$ nm) é fornecido por meio de um *laser* com íons de kriptônio (Coherent Innova). Uma potência de saída é ajustada de 200 a 800 mW utilizando-se filtros e prismas adequados para eliminação de plasma carregado pelo feixe. A largura da fenda empregada no monocromador é de 200 nm. O monocromador (Thermal Jarrel–Ash Monospec 27) e uma fotomultiplicadora (Hamatsu R446) acoplados a um sistema de aquisição composto de um *lock-in* SR–530 são controlados através de um microcomputador. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente. As medidas foram realizadas no Instituto de Física da Universidade de São Paulo – campus de São Carlos.

A decomposição das bandas de emissão fotoluminescente foi realizada pelo programa PeakFit (versão 4.05) que permite identificar e quantificar os picos, a função Gaussiana foi utilizada para ajuste de cada componente da banda larga de FL que foi determinada a área e sua porcentagem de área.

3.5. Área superficial específica

A caracterização da área superficial específica é determinada através das medidas em um ciclo completo das isotermas de adsorção pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller) (BRUNAUER *et al.*, 1938).

A adsorção de N₂ e as isotermas de dessorção a 77,35 K foram medidas num analisador automático de superfície Quantachrome TouchWin versão 1.1. Antes da análise, as amostras foram degaseificadas em vácuo a 90 ° C durante 3 h. A área superficial foi calculada de acordo com o método BET. Nos ensaios utilizaram-se aproximadamente 0,01 g dos materiais. As medidas foram realizadas no Laboratório de Química Inorgânica do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

3.6. Ensaios Fotocatalíticos

Os ensaios de fotocatalíticos foram realizados em parceria com o professor Dr. Antonio Otavio T. Patrocínio no Laboratório de Fotoquímica – Ciência dos Materiais (LAFOT-CM).

A atividade fotocatalítica das nanoestruturas de ZnO pura e dopada com os diferentes íons terras-raras Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} foi avaliada contra a degradação do corante comercial azul de metileno (*Colour Index* (C.I.) 52015, Vetec), sob irradiação UV-Vis.

Em cada experimento foram utilizados 1,6 mg de fotocatalisador e solução do corante azul de metileno na concentração $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$. No reator de vidro com capacidade de 16 mL foi utilizada uma suspensão contendo o corante e o fotocatalisador sob agitação constante.

O sistema fotoquímico foi projetado para que o reator fosse exposto o máximo possível à radiação proveniente de um simulador solar modular padrão (Newport) equipado com lâmpada de xenônio de 300 W (Figura 13). Foi utilizado um filtro óptico KG1 para remover a radiação com comprimento de onda menor que 300 nm.

Inicialmente, as suspensões foram agitadas por 1 hora no escuro, as amostras coletadas em alíquotas de 0,50 mL em intervalo de 20 min, posteriormente foi ligada a lâmpada UV-A. O tempo de reação total foi de 150 minutos, em que alíquotas de 0,50 mL foram retiradas em intervalos de 20 e 30 minutos de reação. As alíquotas coletadas foram centrifugadas e posteriormente submetidas a análises de espectrofotometria na região do UV-vis (espectrofotômetro SHIMADZU, modelo 1650PC com cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,1 cm). As curvas de descoloração foram traçadas a partir dos valores de absorbância no comprimento de onda máximo de 663 nm para soluções aquosas de azul de metileno em pH próximo à neutralidade.

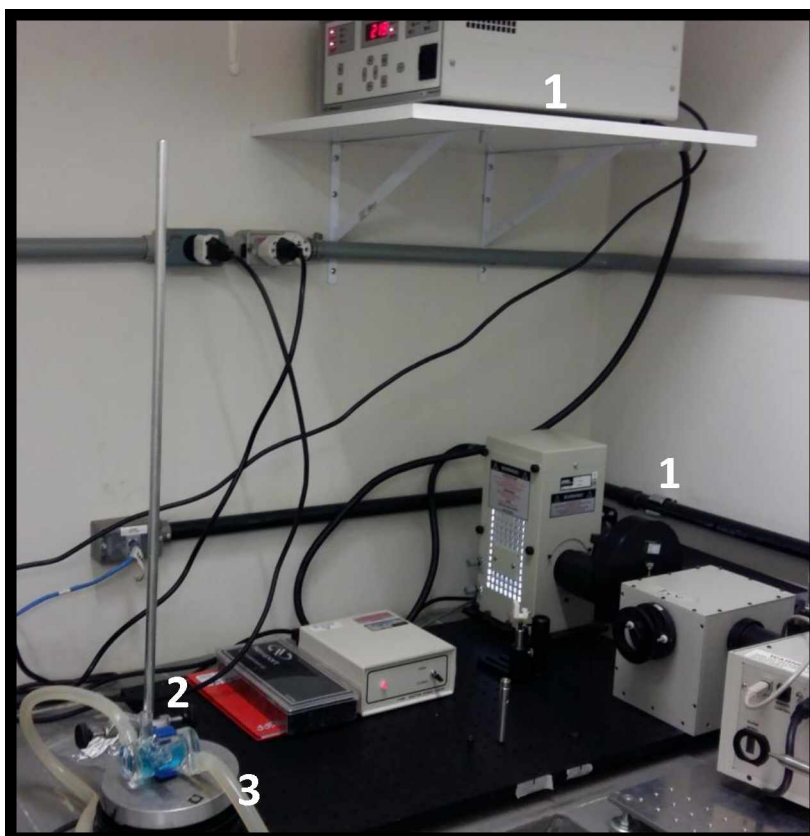
A porcentagem de descoloração foi calculada usando a equação 9:

$$\% \text{ Descoloração} = (1 - (A_f/A_i)) \times 100 \quad (9)$$

Em que A_f é a absorbância da solução em um tempo $t > 0$, e A_i é a absorbância inicial da solução.

O mesmo procedimento experimental foi realizado também na ausência do catalisador (experimento branco), para verificar a possível fotodescoloração do corante.

Figura 13. Foto do sistema fotoquímico empregado em escala de laboratório (1) Fonte de radiação com uma lâmpada de xenônio de 300 W, (2) Reator fotocatalítico, (3) Sistema de resfriamento (mangueiras com entrada de água).



Fonte: o Autor (2017).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção do trabalho são apresentados e analisados os resultados de difração de raios X (DRX) e método de refinamento Rietveld, espectroscopia Raman, espectroscopia de reflectância difusa na região do Ultravioleta-visível (UV-vis), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG), análise de raios X por dispersão em energia (EDX), fotoluminescência para ZnO dopado com Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} nas quantidades de 1 e 2% em mol e as medidas de área superficial específica (BET). Ao final, serão discutidos os resultados dos ensaios de fotodescoloração do corante azul de metileno.

4.1. Difração de raios X (DRX)

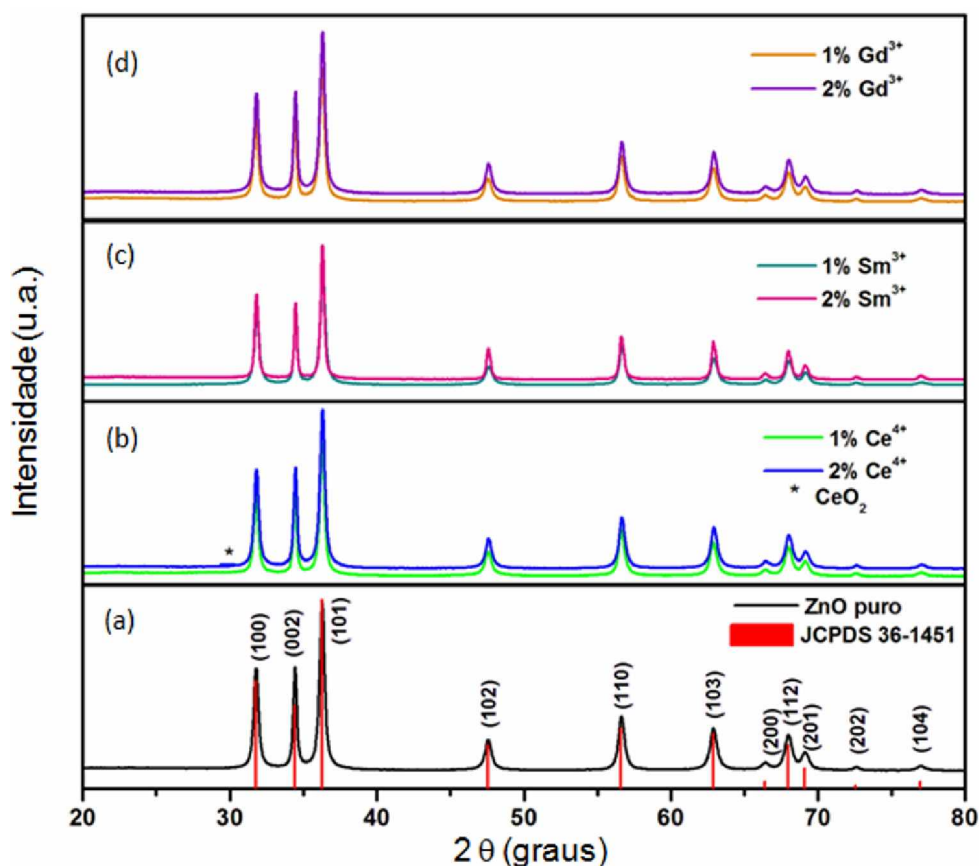
Com o objetivo de investigar a estrutura cristalina, os parâmetros de rede e o volume de cela unitária das amostras, foi utilizada como técnica de caracterização estrutural a difração de raios X.

Na Figura 14 apresenta os difratogramas de raios X para as amostras de ZnO puro e dopado com diferentes concentrações de íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} obtidas à 90 °C durante 2 minutos sob condições hidrotérmicas.

Foram observados, para todas as amostras, picos de difração definidos e estreitos característicos da estrutura do hexagonal do tipo wurtzita do ZnO, indexados de acordo com a ficha cristalográfica JCPDS nº 36-1451 e grupo espacial $P6_3mc$, o que indica um bom ordenamento cristalino a longo alcance.

Para as amostras dopadas com os íons Ce^{4+} , na concentração de 2,0 mol% de Ce^{4+} , observa-se a presença de uma segunda fase com um pico de baixa intensidade em 29° , atribuída ao plano (111), o pico 100% da estrutura cristalina cúbica do óxido de cério (CeO_2) de acordo com a ficha cristalográfica JCPDS 34-3940 (RICCARDI *et al.*, 2009). Picos correspondentes a outras possíveis impurezas não foram observados.

Figura 14. Difratomogramas de raios X para o ZnO puro (a), dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (b), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (c) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} obtidos no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

Ao analisar a Figura 14 (b), nota-se, portanto, que a medida que aumentou-se a concentração de íons Ce^{4+} observa-se a formação da fase secundária correspondente ao óxido cério. Esse fenômeno se relaciona com o tamanho do raio iônico do íon TR inserido na rede cristalina do ZnO, o íon Ce^{4+} ($r = 1,01 \text{ \AA}$) possui um valor de raio iônico maior do que o íon a ser substituído, Zn^{2+} ($r = 0,74 \text{ \AA}$) (SHIRSATH *et al.*, 2011), levando a uma distorção da cela unitária do ZnO. Essa grande diferença de tamanho entre os íons dificulta a acomodação dos íons da rede cristalina do ZnO, o que favorece a formação da fase secundária.

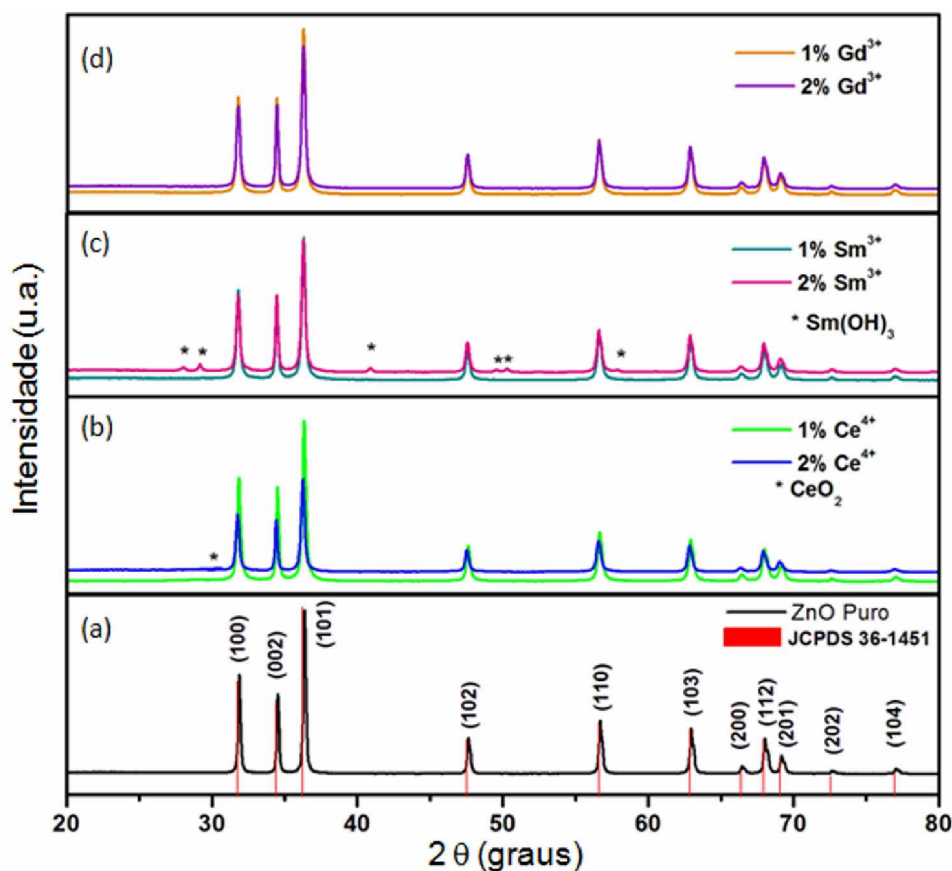
Esses resultados seguem as observações do autor F. Wang *et al.* (2010), o qual, em seu trabalho relatou que os íons lantanídeos de grande raio iônico exibem uma tendência maior à distorção da nuvem eletrônica, devido a maior polarizabilidade, favorecendo assim a formação de estruturas hexagonais. As propriedades dos

nanocristais de NaYF_4 foram controlados em tamanho, em fase e em cor de emissão (verde para azul) através do uso de íons dopantes lantanídeos.

Os difratogramas de raios X para as amostras de ZnO puro e dopado com diferentes concentrações de íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} obtidas à 90° C durante 16 minutos sob condições hidrotérmicas são apresentados na Figura 15. Os picos de difração referentes à estrutura hexagonal do tipo wurtzita do ZnO (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201) (202) e (104), muito bem definidos e estreitos, todos foram indexados de acordo com a ficha cristalográfica de número JCPDS nº 36-1451.

Para as amostras dopadas com os íons Sm^{3+} , na concentração de 2,0 mol% de Sm^{3+} , observa-se a presença de uma segunda fase com picos correspondes a estrutura hexagonal do hidróxido de samário ($\text{Sm}(\text{OH})_3$) de acordo com a ficha cristalográfica JCPDS nº 83-2036 (DAN *et al.*, 2014; LIXIONG *et al.*, 2015). As amostras dopadas com os íons Ce^{4+} , na concentração de 2,0 mol% de Ce^{4+} , observa-se a presença de uma segunda fase com um pico de baixa intensidade em 29°, atribuída à estrutura cristalina cúbica do óxido de cério (CeO_2) de acordo com a ficha cristalográfica JCPDS 34-3940.

Figura 15. Difratomogramas de raios X para o ZnO puro (a), dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (b), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (c) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} obtidos no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

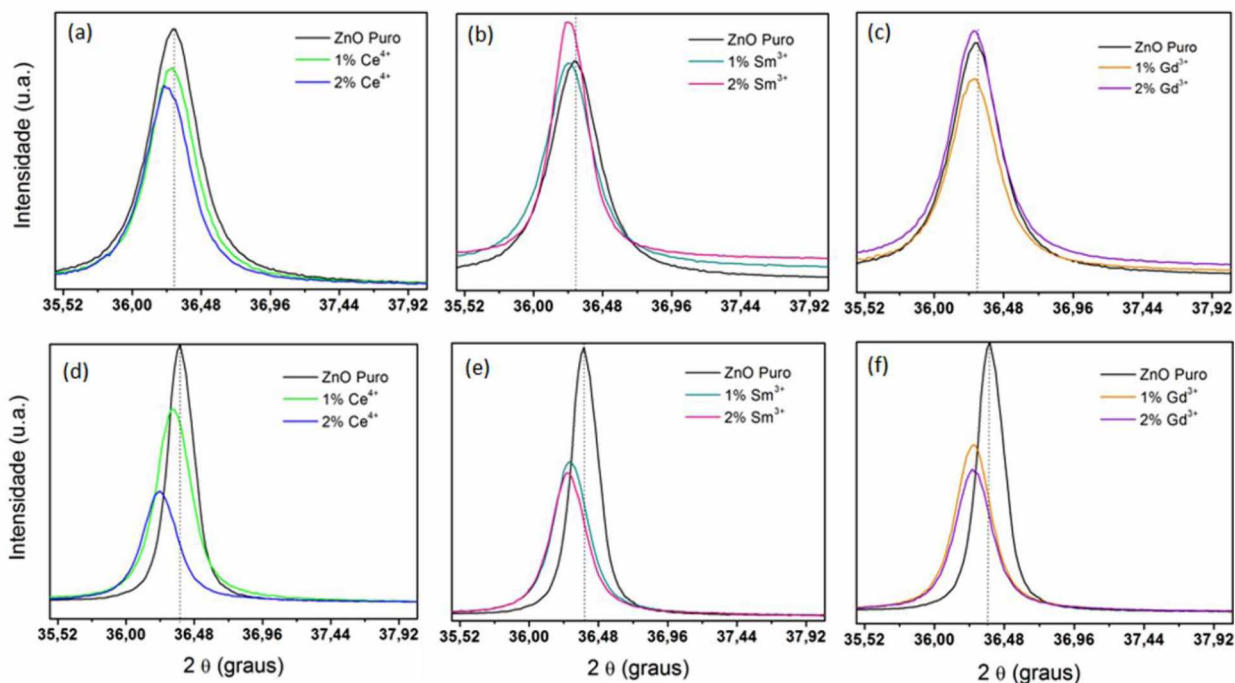


Fonte: o Autor (2017).

A Figura 16 mostra a região ampliada do pico (101) nos difratogramas de raios X, indicando o efeito da presença do íon dopante na rede cristalina do ZnO.

A tensão em um material como o ZnO, após adição dos íons terras raras pode causar dois efeitos distintos sobre o difratograma. Se a tensão corresponder a um esforço uniforme, compressivo ou distensivo, também chamado de macrotensão, as distâncias de cada cela unitária dos cristais vão respectivamente, diminuir ou aumentar ocasionando um deslocamento na posição dos picos difratados (CULLITY e WEYMOUTH 1957). No presente estudo o esforço é distensivo, ou seja, a inserção dos íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} levou a um deslocamento para menores ângulos, a menores valores de 2θ .

Figura 16. Região ampliada do pico (101) nos difratogramas de raios X para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} obtidos no tempo de 2 minutos (a) – (c) e (d) - (f) obtidos no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

O deslocamento do pico (101) nos difratogramas está relacionado com alterações causadas aos parâmetros da célula de unitária devido à inserção de dopantes na rede cristalina do ZnO. Os íons TR, Ce^{4+} ($r = 1,01 \text{ \AA}$), Sm^{3+} ($r = 0,96 \text{ \AA}$) e Gd^{3+} ($r = 0,94 \text{ \AA}$) possuem um valor de raio iônico maior que o íon a ser substituído, Zn^{2+} ($r = 0,74 \text{ \AA}$), sendo que o íon Ce^{4+} é ligeiramente maior que os demais, o que leva a um deslocamento relativamente maior para menores ângulos (Figura 16 (a) e (d)).

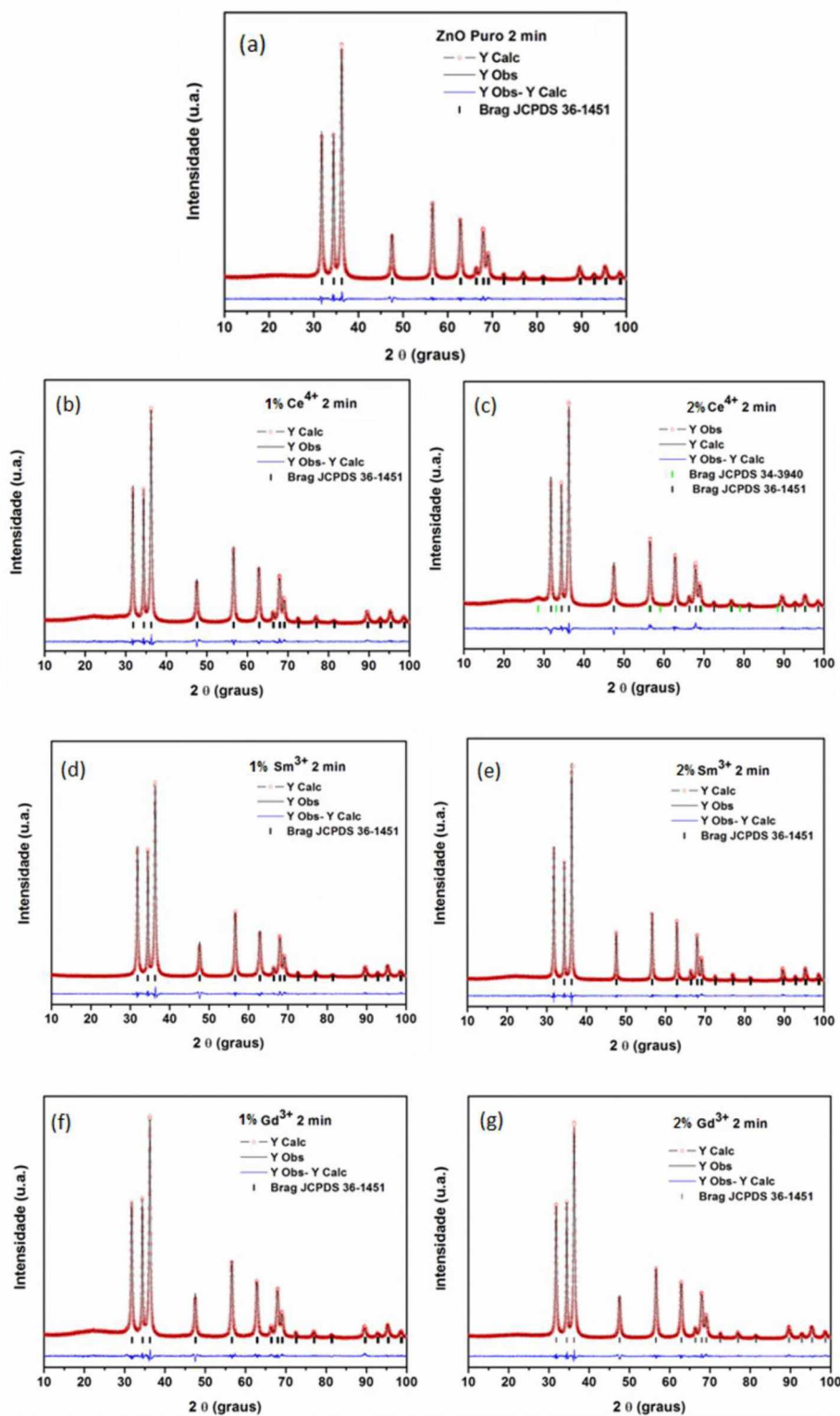
De acordo com a literatura, é observado que a dopagem com íons TR promovesse o deslocamento do pico (101) para ângulos menores, devido a uma expansão da célula unitária (ASSADI *et al.*, 2011; FAISAL *et al.*, 2013; SUWANBOON *et al.*, 2013; AGGARWAL *et al.*, 2016). Esse deslocamento observado no presente trabalho está relacionado com o tamanho do íon dopante inserido na matriz do ZnO, por serem maiores, com a dopagem levam à menores ângulos. Pode-se afirmar que em razão da dificuldade de serem acomodados na rede cristalina, os íons TR podem ocupar as posições intersticiais, considerando que os valores de constante de rede e

volume da célula tendem a um aumento com a maior concentração do dopante (WANG *et al.*, 2010; YOUSEFI *et al.*, 2011; SUWANBOON *et al.*, 2013; CHANG, LIN, CHEN, *et al.*, 2014; DOS REIS, P. M. *et al.*, 2015).

Os parâmetros de rede, bem como a quantificação das fases cristalinas presentes nos materiais foi determinado por meio do refinamento da estrutura pelo método de Rietveld (RIETVELD, 1969; SAKATA e COOPER, 1979; VON, 1997; SRDIĆ e WINTERER, 2003), no qual foi utilizado o programa General Structure Analysis System (GSAS) com a interface gráfica EXPGUI (TOBY, 2001). Neste método, a estrutura cristalina é refinada com a finalidade de que o difratograma calculado se assemelhe ao máximo ao difratograma observado experimentalmente, representando assim a melhor resolução para o refinamento cristalino e para a estrutura real. Os gráficos ilustram o perfil de difração calculado, o perfil obtido experimentalmente, a curva residual (diferença entre o perfil calculado e o perfil de difração observado) e as posições cristalográficas de cada fase presente nos materiais.

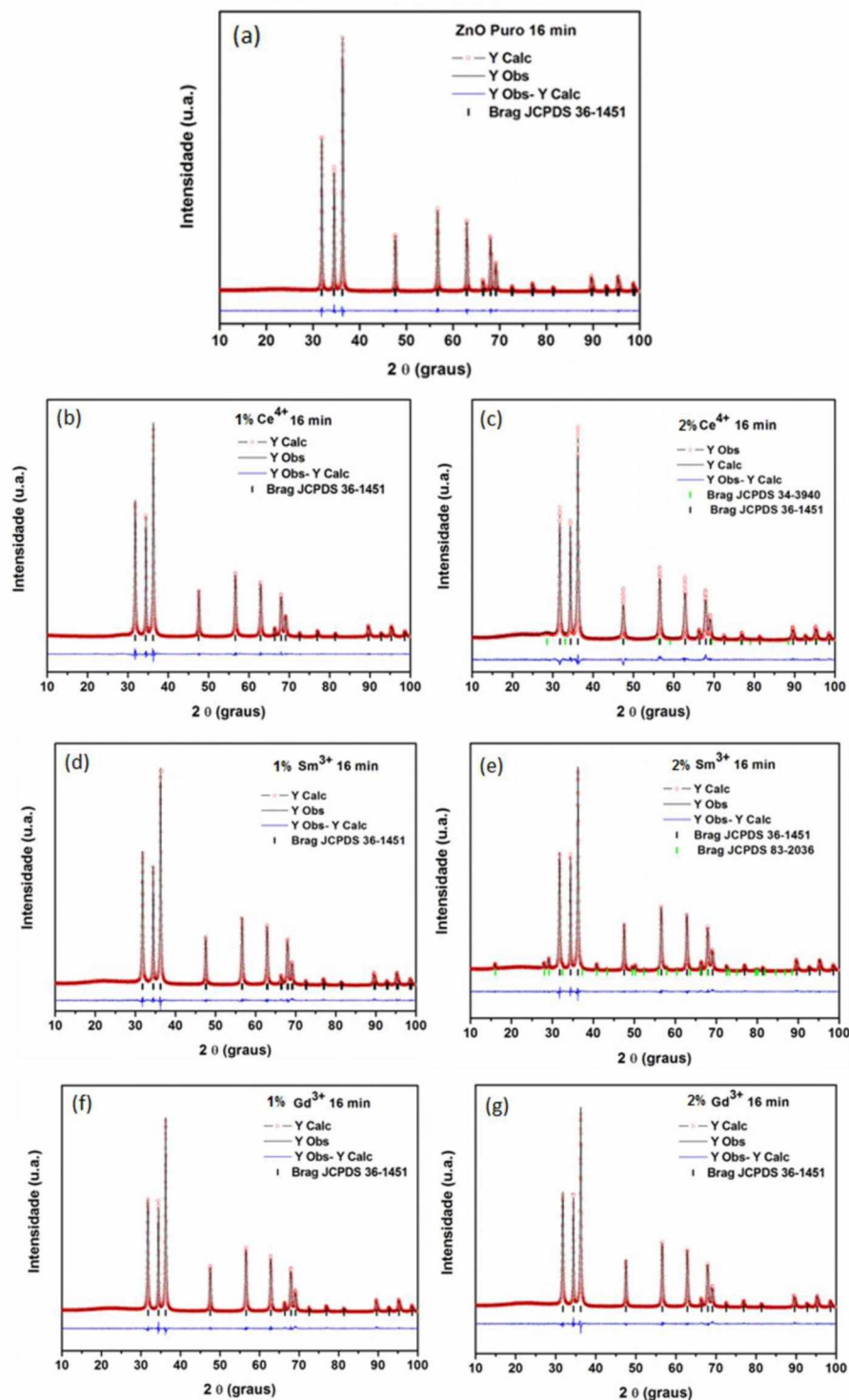
Os gráficos obtidos a partir do método de refinamento Rietveld para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons TR nos tempos de síntese de 2 e 16 minutos seguem ilustrados nas Figuras 17 e 18. Os dados de confiabilidade obtidos para as amostras R_{wp} , R_p , R_{Bragg} e χ^2 são listados nas Tabelas 3 a 7.

Figura 17. Resultados obtidos por refinamento Rietveld para as amostras ZnO puro (a), dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (b) – (c), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (d) – (e) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} (f) – (g) obtidas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

Figura 18. Resultados obtidos por refinamento Rietveld para as amostras ZnO puro (a), dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (b) – (c), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (d) – (e) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} (f) – (g) obtidas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

Ao analisar os gráficos de refinamento de Rietveld apresentados nas Figuras 17 e 18, é possível notar uma boa correlação entre os padrões de difração observados e calculados, assim como, entre as intensidades e as posições de cada um dos picos de Bragg. Nos refinamentos, os padrões difratométricos teóricos foram extraídos da fichas padrões cristalográficas JCPDS 36-1451 (ZnO), JCPDS 34-3940 (CeO₂) e JCPDS 83-2036 (Sm(OH)₃) do banco de dados ICSD (*Inorganic Crystal Structure Database*) (Bases de estruturas cristalinas - Portal Periodicos CAPES).

Os valores dos coeficientes de confiabilidade (R_{wp} , R_p , R_{Bragg} e χ^2) apresentados nas Tabelas 3 e 4 encontram-se dentro dos parâmetros aceitáveis para um bom refinamento (menores que 10%), indicando que o refinamento a partir do método de Rietveld é de boa qualidade.

Tabela 3. Coeficientes de confiabilidade obtidos para cada amostra sintetizada no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

ZnO	R_{wp} (%)	R_p (%)	R_{Bragg} (%)	χ^2
Puro	4,87	3,61	1,24	1,58
1% Ce ⁴⁺	5,22	3,97	1,32	1,73
2% Ce ⁴⁺	5,67	4,44	2,16	1,98
1% Sm ³⁺	5,81	4,21	1,33	1,98
2% Sm ³⁺	5,19	3,89	1,73	1,64
1% Gd ³⁺	5,12	3,87	1,03	1,69
2% Gd ³⁺	4,86	3,63	1,19	1,61

Fonte: o Autor (2017).

Tabela 4. Coeficientes de confiabilidade obtidos para cada amostra sintetizada no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

ZnO	R _{wp} (%)	R _p (%)	R _{Bragg} (%)	χ^2
Puro	4,86	3,68	1,59	1,65
1% Ce ⁴⁺	5,58	4,07	1,10	2,28
2% Ce ⁴⁺	5,67	5,06	2,44	2,26
1% Sm ³⁺	4,86	3,59	1,15	1,47
2% Sm ³⁺	5,11	3,81	1,61	1,70
1% Gd ³⁺	5,24	3,97	1,56	1,83
2% Gd ³⁺	4,94	3,74	1,82	1,63

Fonte: o Autor (2017).

As Tabelas 5 e 6 mostram os valores calculados para os parâmetros de rede a partir do método de refinamento Rietveld, para as amostras de ZnO puro e dopado 1 e 2% em mol de Ce⁴⁺, de Sm³⁺ e de Gd³⁺ sintetizadas no presente trabalho em tempos de 2 e 16 minutos.

Tabela 5. Valores dos parâmetros de rede para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons Ce⁴⁺, Sm³⁺ e Gd³⁺ obtidos no tempo de 2 minutos pelo método de Rietveld.

ZnO	a = b (Å)	c (Å)	V(Å ³)
Puro	3,2508(1)	5,2094(1)	47,677(5)
1% Ce ⁴⁺	3,2511(0)	5,2110(1)	47,700(1)
2% Ce ⁴⁺	3,2511(2)	5,2111(3)	47,717(8)
1% Sm ³⁺	3,2511(3)	5,2108(6)	47,696(1)
2% Sm ³⁺	3,2516(1)	5,2095(0)	47,699(1)
1% Gd ³⁺	3,2508(1)	5,2097(0)	47,677(2)
2% Gd ³⁺	3,2509(0)	5,2097(1)	47,682(1)

Fonte: o Autor (2017).

Tabela 6. Valores dos parâmetros de rede para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} obtidos no tempo de 16 minutos pelo método de Rietveld.

ZnO	a = b (Å)	c (Å)	V(Å ³)
Puro	3,2501(0)	5,2071(0)	47,636(2)
1% Ce^{4+}	3,2502(1)	5,2071(1)	47,677(2)
2% Ce^{4+}	3,2514(1)	5,2084(1)	47,698(1)
1% Sm^{3+}	3,2507(0)	5,2091(1)	47,687(3)
2% Sm^{3+}	3,2515(1)	5,2081(1)	47,699(4)
1% Gd^{3+}	3,2512(1)	5,2080(1)	47,677(3)
2% Gd^{3+}	3,2513(1)	5,2087(1)	47,676(2)

Fonte: o Autor (2017).

Dos resultados obtidos pelo método de refinamento Rietveld, observa-se um discreto aumento no volume da célula unitária que deve ser atribuído à dopagem com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} (Tabelas 5 e 6). Esse comportamento observado está relacionado a uma preferência dos íons terras raras em ocupar sítios intersticiais, isso ocorre devido à grande diferença de raio iônico entre Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} e o Zn^{2+} , que desfavorece a ocupação substitucional (YANG, J. H. *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2011; SUWANBOON *et al.*, 2013; DOS REIS, P. M. *et al.*, 2015).

Os valores apresentados nas Tabelas 5 e 6 indicam que a dopagem com os íons terras raras gera distorções na rede cristalina do ZnO e aumenta a quantidade de defeitos estruturais, como vacâncias de oxigênio e oxigênio intersticial (PANDIYARAJAN *et al.*, 2015; KAUR *et al.*, 2016), visto que foi observado um ligeiro aumento nos valores dos parâmetros de rede e consequentemente, em uma discreta expansão da célula unitária quando comparados com a amostra pura. Esse efeito é coerente, pois os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} coordenam em posições octaédricas preferencialmente na rede cristalina, ocupando os sítios intersticiais (YANG, J. *et al.*, 2008; AHMAD *et al.*, 2015; AGGARWAL *et al.*, 2016).

O deslocamento dos picos principais (1 0 0), (0 0 2) e (1 0 1) para os menores ângulos, ocasionam um discreto aumento dos parâmetros de rede, confirmando assim a adição dos íons terras raras. Resultado esse também descrito na literatura (MISHRA e RAO, 2006; YANG, J. *et al.*, 2008; SUWANBOON e AMORNPITOKSUK, 2011; YOUSEFI *et al.*, 2011; CHAWL *et al.*, 2014).

O método de refinamento Rietveld é uma ferramenta fundamental e precisa para também estimar a porcentagem de fase adicional existente nas amostras. Neste trabalho observou a presença de fase secundária nas amostras dopadas com 2% em mol de Ce^{4+} , sintetizadas em 2 e 16 minutos, referente ao CeO_2 e para a amostra dopada com 2% em mol de Sm^{3+} sintetizada a 16 minutos, referente ao $\text{Sm}(\text{OH})_3$ (Tabela 7).

Tabela 7. Fração de cada fase obtida pelo método de Rietveld para as amostras dopadas com 2% em mol de TR (TR = Ce^{4+} , Sm^{3+}).

Amostras	Fração da fase 1 (%)	Fração da fase 2 (%)
2% Ce^{4+} 2 min	93%	7%
2% Ce^{4+} 16 min	91%	9%
2% Sm^{3+} 16 min	96%	4%

Fonte: o Autor (2017).

Ao analisar as amostras dopadas com íons Ce^{4+} , em relação à concentração do dopante, nota-se que a medida que aumenta a quantidade do íon Ce^{4+} na rede tem-se a formação da segunda fase cristalina cúbica do óxido de cério, à uma pequena quantidade de 7% e 9% referente aos tempos de 2 e 16 minutos, respectivamente (Tabela 7). Esse efeito também é frequentemente observado na literatura (YOUSEFI *et al.*, 2011; REZAEI e HABIBI-YANGJEH, 2013; KANNADASAN *et al.*, 2015), que pode ser explicado pela dificuldade de acomodar o íon Ce^{4+} na matriz do ZnO , devido a grande diferença de tamanho do raio iônico do Ce^{4+} ($r = 1,01 \text{ \AA}$) e do Zn^{2+} ($r = 0,74 \text{ \AA}$).

A formação de fase secundária também é observada para a amostra dopada com Sm^{3+} , a medida que aumenta a concentração do dopante na rede cristalina do ZnO e com um aumento no tempo de síntese para 16 minutos, tem-se a formação de apenas 4% de $\text{Sm}(\text{OH})_3$ como segunda fase (Tabela 7).

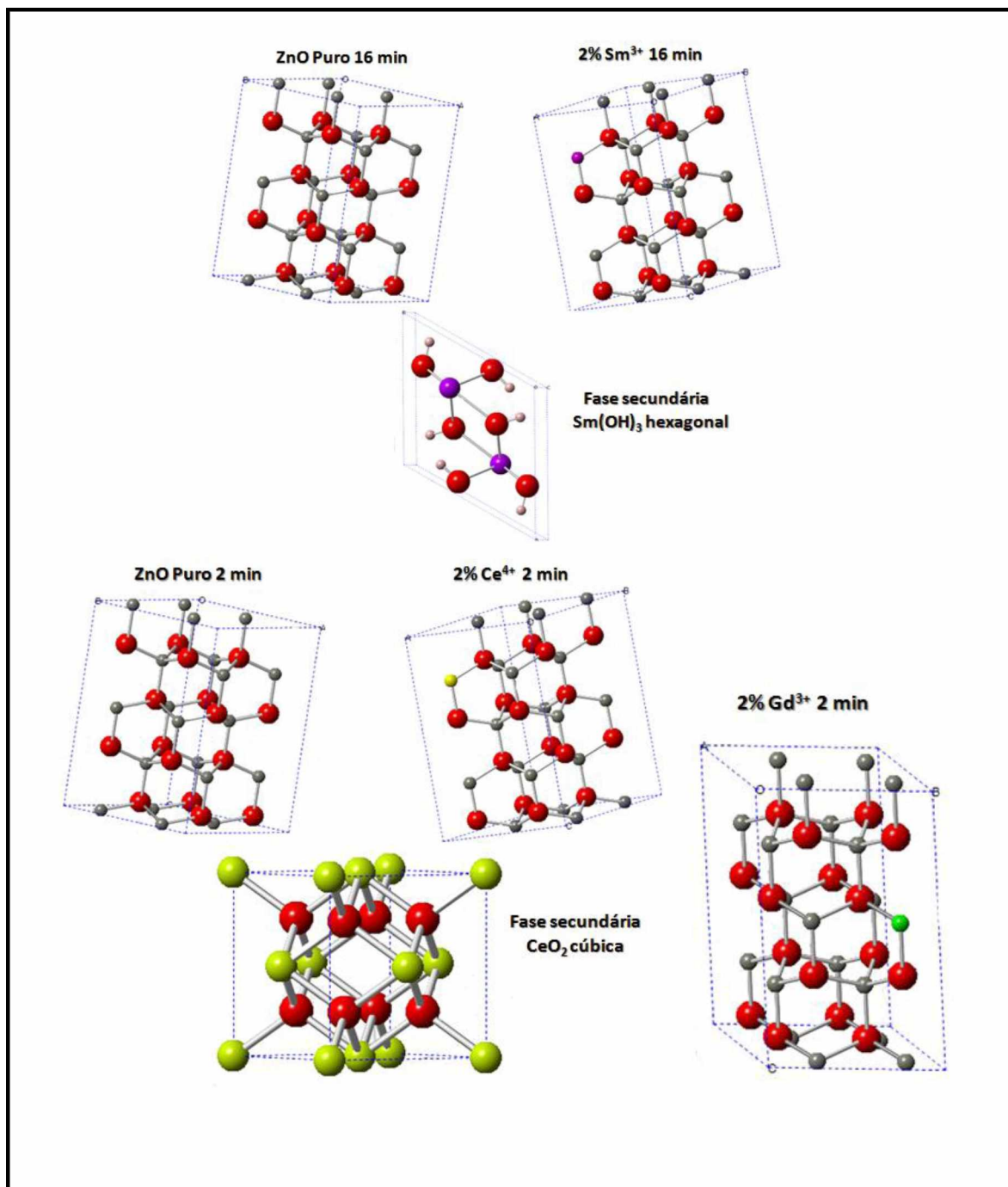
M. Runowski e S. Lis (2016) sintetizaram CeF_3 codopado com os íons Gd^{3+} e Sm^{3+} nas quantidades de 15% e 1% em mol, respectivamente, para o estudo das propriedades fotoluminescentes do material. Reportaram em seu trabalho que a matriz conseguia suportar melhor uma quantidade maior do íon Gd^{3+} na rede cristalina e,

quando aumentava a quantidade de Sm^{3+} (2% - 10% em mol) observou a formação de impurezas ou fases secundárias. Foi atribuído a isto, o fato do íon Gd^{3+} apresentar menor raio iônico que o Sm^{3+} , conseguindo portanto, uma substituição mais homogênea.

A característica do íon dopante inserido também foi avaliada pelo refinamento, constatando-se que todos os íons dopantes afetaram a estrutura da matriz. Além disso o efeito do íon é melhor observado para as amostras dopadas com 2% em mol de Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} , em que a medida que aumentou a concentração do íon dopante na matriz do ZnO observou um aumento maior no volume de cela unitária em relação a amostra pura.

A partir dos dados de refinamento Rietveld foram geradas as estruturas cristalinas das amostras, como por exemplo, a estrutura wurtzita hexagonal do óxido de zinco puro, a hexagonal da fase secundária $\text{Sm}(\text{OH})_3$ e cúbica da fase secundária CeO_2 , utilizando o programa CrystalMaker (Versão 9.2.7) para Windows, que estão representadas na Figura 19.

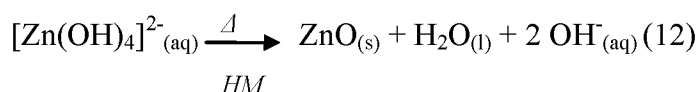
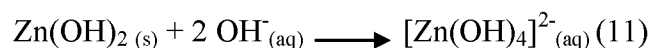
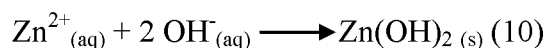
Figura 19. Representação das estruturas hexagonal do óxido de zinco puro e dopado (2% em mol de Ce^{4+} , Gd^{3+} e Sm^{3+}) e as estruturas das fases secundárias (hexagonal $\text{Sm}(\text{OH})_3$ e cúbica CeO_2) obtidas por meio do Refinamento Rietveld. As esferas vermelhas representam o átomo de oxigênio, esferas cinza o zinco, esferas rosa claro o hidrogênio, roxa o samário, verde o gadolínio e amarelo o cério.



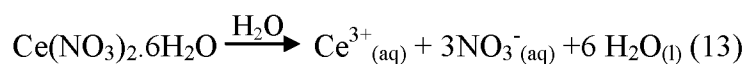
Fonte: o Autor (2017).

No processo de obtenção dos materiais são formadas inicialmente as espécies Zn^{2+} e CH_3COO^- pela dissolução de acetato de zinco em água. Na presença de meio básico, pela adição de KOH (pH 12), os íons Zn^{2+} reagem com os grupos hidroxilas formando precipitados de $\text{Zn}(\text{OH})_2$. Os íons OH^- em excesso levam à uma dissolução do precipitado formado para obter o íon complexo $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ estável em soluções alcalinas. A partir do aquecimento em micro-ondas ocorre a desidratação do $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ iniciando o processo de formação de ZnO e crescimento dos cristais (WANG *et al.*, 2011; AKIR *et al.*, 2016).

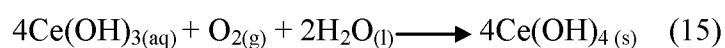
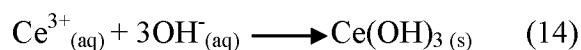
As reações que ocorrem no reator durante o tratamento hidrotérmico de micro-ondas são apresentadas nas equações (10) a (12):



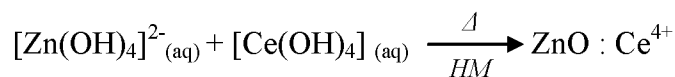
Para as amostras dopadas com Ce^{4+} as reações a partir do precursor $\text{Ce}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ envolve as seguintes reações adicionais nas equações (13) a (15), iniciando pela dissolução do sal de cério:



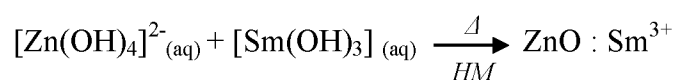
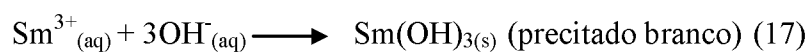
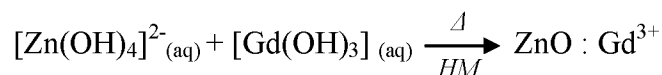
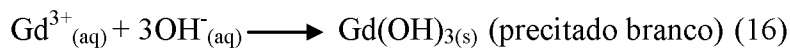
Em um meio alcalino (pH 12) tem-se a precipitação do hidróxido de cério (III), em solução ele é muito instável podendo ser oxidado na presença do ar atmosférico ao correspondente hidróxido de cério (IV), mais estável e menos solúvel em água (precipitado em tons de lilás) (ABI-AAD *et al.*, 1993; ABRÃO, 1994):



A partir do aquecimento por micro-ondas, os hidróxidos levam a formação de compostos de ZnO dopados com cério. Durante o aquecimento por micro-ondas, os hidróxidos se decompõem para formar as amostras de ZnO dopado com os íons Ce^{4+} :



Para as amostras dopadas com Gd^{3+} e Sm^{3+} o esquema de reações envolve as seguintes reações adicionais nas equações (16) e (17):



4.2. Espectroscopia Raman

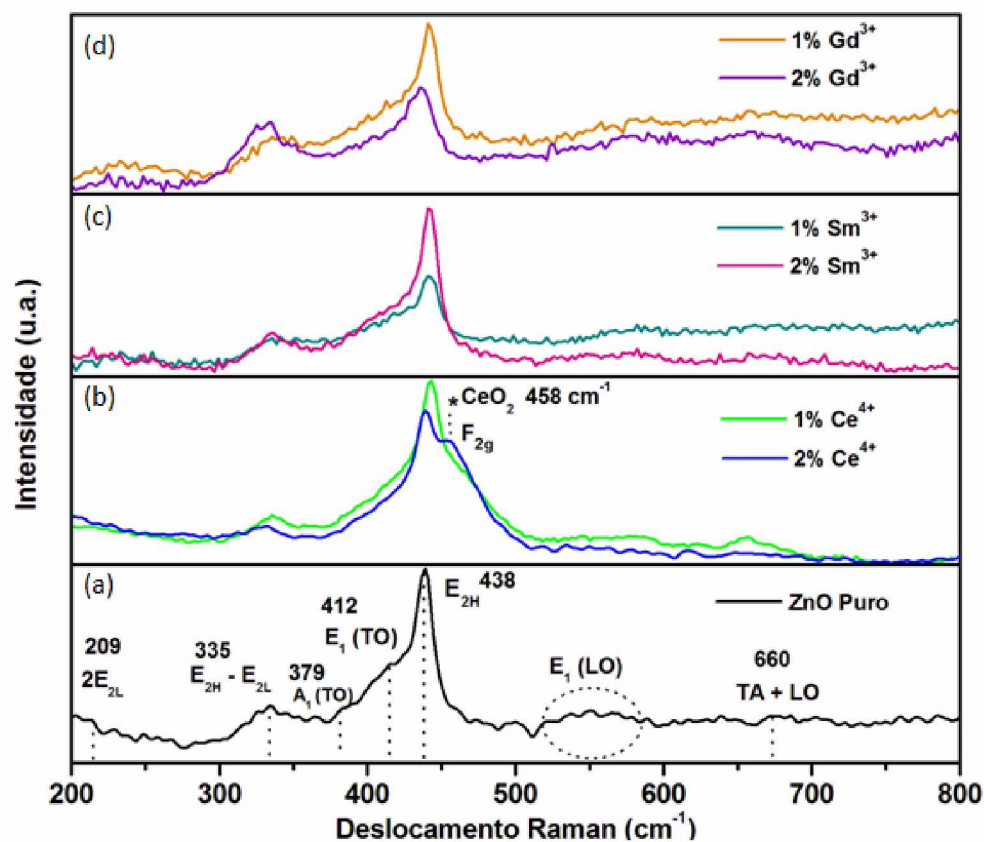
Os espectros de Raman das amostras de ZnO puro e dopado com os íons TR sintetizadas nos tempos de 2 e 16 minutos, são mostrados nas Figuras 20 e 21.

As bandas características do óxido de zinco são observadas em todas as amostras, em que são atribuídas aos modos Raman ativos do monocrystal de ZnO wurtzita, o qual pertence ao grupo espacial P6₃mc, com duas unidades de fórmula por célula primitiva. Baseado nos dados de célula unitária (grupo espacial C_{6v}⁴) e na teoria de grupo, o óxido de zinco apresenta oito conjuntos de modo Raman óticos (modos fônons) no ponto Γ da zona de Brillouin no monocrystal de ZnO, sendo descrito da seguinte forma pela equação 18:

$$\Gamma = A_1 + A_2 + B_1 + B_2 + 2 E_1 + 2 E_2 \text{ (18)}$$

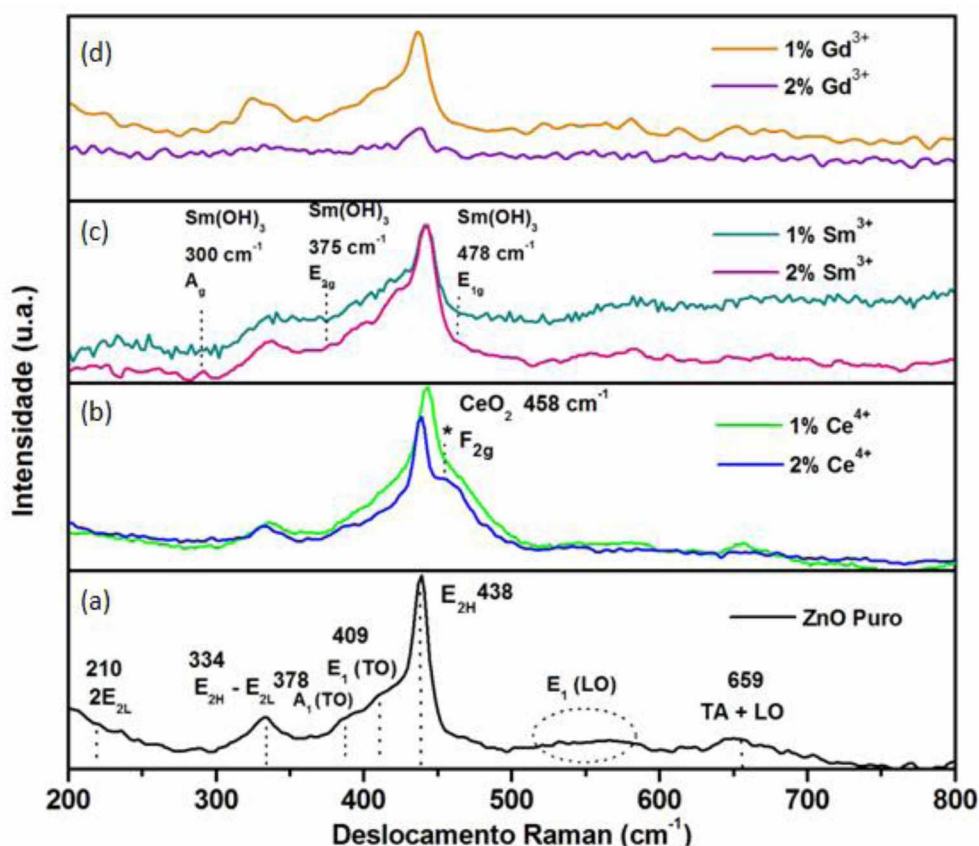
Em que os modos B_1 são silenciosos, A_1 e E_1 são modos polares, ativo tanto no Raman quanto no infravermelho, enquanto modos E_2 são apolares ativos somente no Raman e estão associados aos modos vibracionais da sub-rede de oxigênio e do zinco respectivamente (SHARMA *et al.*, 2011; OJHA *et al.*, 2014).

Figura 20. Espectros Raman das amostras de ZnO puro (a), dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (b), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (c) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

Figura 21. Espectros Raman das amostras de ZnO puro (a), dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (b), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (c) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

Para as amostras de ZnO, o modo mais intenso nos espectros Raman é o $\text{E}_{2\text{H}}$ em 438 cm^{-1} , característico da fase wurtzita do ZnO, atribuído a vibração de zinco - oxigênio na rede cristalina. As ligeiras assimetrias observadas entre as amostras são atribuídas a desordem à curto alcance da estrutura, bem como para as interações fônon-fônon não harmônicas (ŠĆEPANOVIĆ *et al.*, 2010). Um deslocamento maior do modo $\text{E}_{2\text{H}}$ para menores frequências é observado para as amostras dopadas com 2% em mol de Ce^{4+} , esse deslocamento é provavelmente atribuído às distorções da rede geradas a partir da substituição dos íons Zn^{2+} por Ce^{4+} , sendo que o raio iônico do Ce^{4+} é maior que o íon do Zn^{2+} (KUMAR, R. *et al.*, 2015). A banda localizada na região de 209-210 cm^{-1} se refere ao modo $2\text{E}_{2\text{L}}$ dos fônons de segunda ordem (DAMEN *et al.*, 1966; ŠĆEPANOVIĆ *et al.*, 2010).

As bandas de baixa frequência em torno de 334-335 cm^{-1} podem ser atribuídas ao espectro Raman de segunda ordem resultante dos fônons $E_{2H} - E_{2L}$. Os fônons polares A_1 e E_1 , em oposto aos fônons E_2 , são ambos divididos em fônons TO e LO. O modo vibracional E_1 (LO) localizado na região compreendida em torno de 580 cm^{-1} , está associado aos defeitos estruturais formados por vacâncias de oxigênio. Essa intensidade depende da cristalinidade, do método de preparação, das condições de síntese e da orientação preferencial do cristal. A banda de baixa intensidade atribuída ao grau de ordem-desordem estrutural do ZnO A_1 (TO) em torno de 378-379 cm^{-1} foi observada nas amostras puras nos dois tempos de síntese de 2 e 16 minutos. A banda em 409-412 cm^{-1} referente ao modo E_1 (TO) é observada como um “ombro” da banda em 438 cm^{-1} (E_{2H}) e com a inserção dos dopantes na rede cristalina do ZnO ela está encoberta pelo modo E_{2H} . Em torno de 660 cm^{-1} foi observada uma banda pouco intensa que se refere ao modo TA+LO intrínseco do ZnO (LIMA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009; ŠĆEPANOVIĆ *et al.*, 2010).

Os espectros Raman das amostras dopadas com íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} apresentaram o modo E_{2H} em 438 cm^{-1} indicando a formação da estrutura hexagonal do tipo wurtzita do ZnO, o que está consistente com os resultados de DRX. As amostras dopadas com íons Ce^{4+} na concentração de 2% em mol, nos dois tempos de síntese (2 e 16 minutos), apresentam formação de segunda fase com o aparecimento de uma banda em 458 cm^{-1} referente ao modo F_{2g} do CeO_2 cúbico (PALARD *et al.*, 2010; KUMAR, R. *et al.*, 2015). A formação de fase secundária $\text{Sm}(\text{OH})_3$ é observada para a amostra dopada com 2% em mol de Sm^{3+} no tempo de 16 minutos, pela presença dos modos vibracionais característicos da fase em torno de 300, 375 e 478 cm^{-1} , modo A_g , E_{2g} e E_{1g} respectivamente (KANG *et al.*, 2015). Os resultados obtidos a partir dos espectros Raman estão de acordo com os resultados de DRX e refinamento Rietveld, apresentados anteriormente.

Os valores de largura à meia altura expressam o grau de desordem estrutural a curto alcance. A partir desses valores, que estão apresentados na Tabela 8, é possível analisar o efeito da inserção dos íons TR na estrutura do ZnO.

Tabela 8. Valores de largura à meia altura em relação ao modo E_{2H} em 438 cm^{-1} nos espectros Raman.

Amostras	Largura à meia altura (2 min)	Largura à meia altura (16 min)
ZnO Puro	15,5	15,3
1% Ce^{4+}	34,5	34,6
2% Ce^{4+}	53,6	44,1
1% Sm^{3+}	15,3	19,4
2% Sm^{3+}	15,2	21,3
1% Gd^{3+}	18,1	17,1
2% Gd^{3+}	18,3	16,6

Fonte: o Autor (2017).

Os valores de largura à meia altura mostram que a adição de impurezas promovem perturbações na rede cristalina, sendo que as maiores modificações relativas estão apresentados para a dopagem com íons Ce^{4+} , o que indica um maior grau de desordem estrutural a curto alcance.

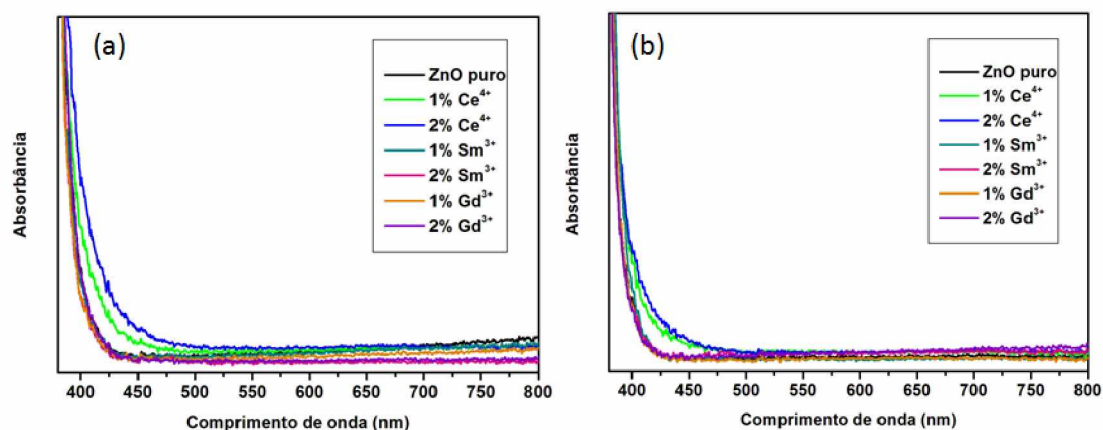
Na literatura, foi observada uma tendência similar, confirmando que a influência dos íons TR na estrutura do cristal surge da forte dependência do tamanho e da polarizabilidade do íon dopante (WANG *et al.*, 2010). A incorporação dos íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} promove uma tendência à distorção da nuvem eletrônica devido ao aumento da intensidade de polarização. O íon Ce^{4+} por apresentar um raio iônico ligeiramente maior dentre os demais íons, possui a capacidade de promover uma maior distorção da nuvem eletrônica, e consequentemente das ligações.

4.3. Espectroscopia no Ultravioleta-visível (UV-vis)

Os espectros no UV-visível das amostras de óxido de zinco puro e dopados com os íons terras raras, sintetizadas nos tempos de 2 e 16 minutos, estão apresentados na Figura 22. As amostras de ZnO puro e dopado com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} exibiram um espectro de absorção característico para o óxido de zinco na fase

wurtzita como observado na literatura (CHAUHAN *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2014; KUMAR, R. *et al.*, 2015).

Figura 22. Espectros no UV-vis das amostras de ZnO puro, dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} , dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} sintetizadas no tempo de (a) 2 minutos e (b) 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

Não foi observada banda de absorção na região visível do espectro referente às transições dos íons terras-raras, especialmente para as amostras que apresentam fase secundária (CeO_2 e $\text{Sm}(\text{OH})_3$).

O íon Ce^{4+} possui a configuração eletrônica $[\text{Kr}] 4d^{10} 5s^2 5p^6$ com os orbitais f vazios (f^0) e grande estabilidade eletrônica devido aos orbitais de valência completamente preenchidos, portanto, não apresenta nenhuma banda de absorção na região do UV-vis.

As transições das transições eletrônicas $4f-5d$ do Ce^{3+} de acordo com a literatura, encontram-se na região do ultravioleta do espectro (KIM e YUN, 2016), portanto não se observa presença do íon Ce^{3+} . O íon Gd^{3+} com configuração $4f^7$ é muito estável, suas transições eletrônicas são difíceis de serem detectadas, comumente observadas na região do ultravioleta de vácuo (10-200 nm) (TSUBOI, 1998). As bandas de absorção referente às transições eletrônicas $f-f$ de Sm^{3+} são observadas, de acordo com a literatura, na região do infravermelho (JOHNSON e SANDOE, 1968; KIM e YUN, 2016).

Para determinação dos valores de energia de *gap* (E_{gap}) dos materiais sintetizados foi utilizado o método de Kubelka-Munk (KUBELKA e MUNK, 1931) por

meio de um ajuste linear e extrapolação da parte linear da curva das medidas de espectroscopia no UV-vis no modo esfera de reflectância difusa (PATTERSON *et al.*, 1977; YANG e KRUSE, 2004). Os valores de gap calculados são apresentados na Tabela 9.

A inserção de um dopante na estrutura do semicondutor óxido de zinco não promoveu mudanças significativas nos valores de E_{gap} dos materiais, o que possivelmente é devido as baixas concentrações dos íons dopantes Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} inseridos na rede cristalina do ZnO, não influenciando assim nos valores experimentais de E_{gap} . Os valores experimentais de E_{gap} calculados foram próximos ao valor encontrado do E_{gap} teórico do ZnO (3,37 eV) (OZGUR *et al.*, 2005; JANOTTI e VAN DE WALLE, 2007; HAFFAD *et al.*, 2011).

Os semicondutores possuem portadores de cargas negativas, conhecidos como elétrons livres, assim também como as cargas positivas, os buracos. Estes portadores de carga associam-se formando o éxciton. Além disso, podem apresentar defeitos e impurezas que tem a possibilidade de capturar os portadores de carga. Desta forma, a densidade destes defeitos e impurezas interfere na formação de novos níveis de energia entre as bandas de valência e condução. Os valores de E_{gap} dos materiais estão associados com a presença de defeitos estruturais, tais como os defeitos nativos vacâncias de Zn e O e também há a criação de novos estados intermediários de energia, com a adição dos dopantes, logo abaixo da banda de condução (CHAWL *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2014; KUMAR, RAJESH *et al.*, 2015; AGGARWAL *et al.*, 2016).

Tabela 9. Valores de E_{gap} para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} .

Amostras	E_{gap} eV (2 min)	E_{gap} eV (16 min)
ZnO Puro	3,26	3,28
1% Ce^{4+}	3,27	3,25
2% Ce^{4+}	3,28	3,24
1% Sm^{3+}	3,26	3,26
2% Sm^{3+}	3,27	3,24
1% Gd^{3+}	3,26	3,25
2% Gd^{3+}	3,25	3,26

Fonte: o Autor (2017).

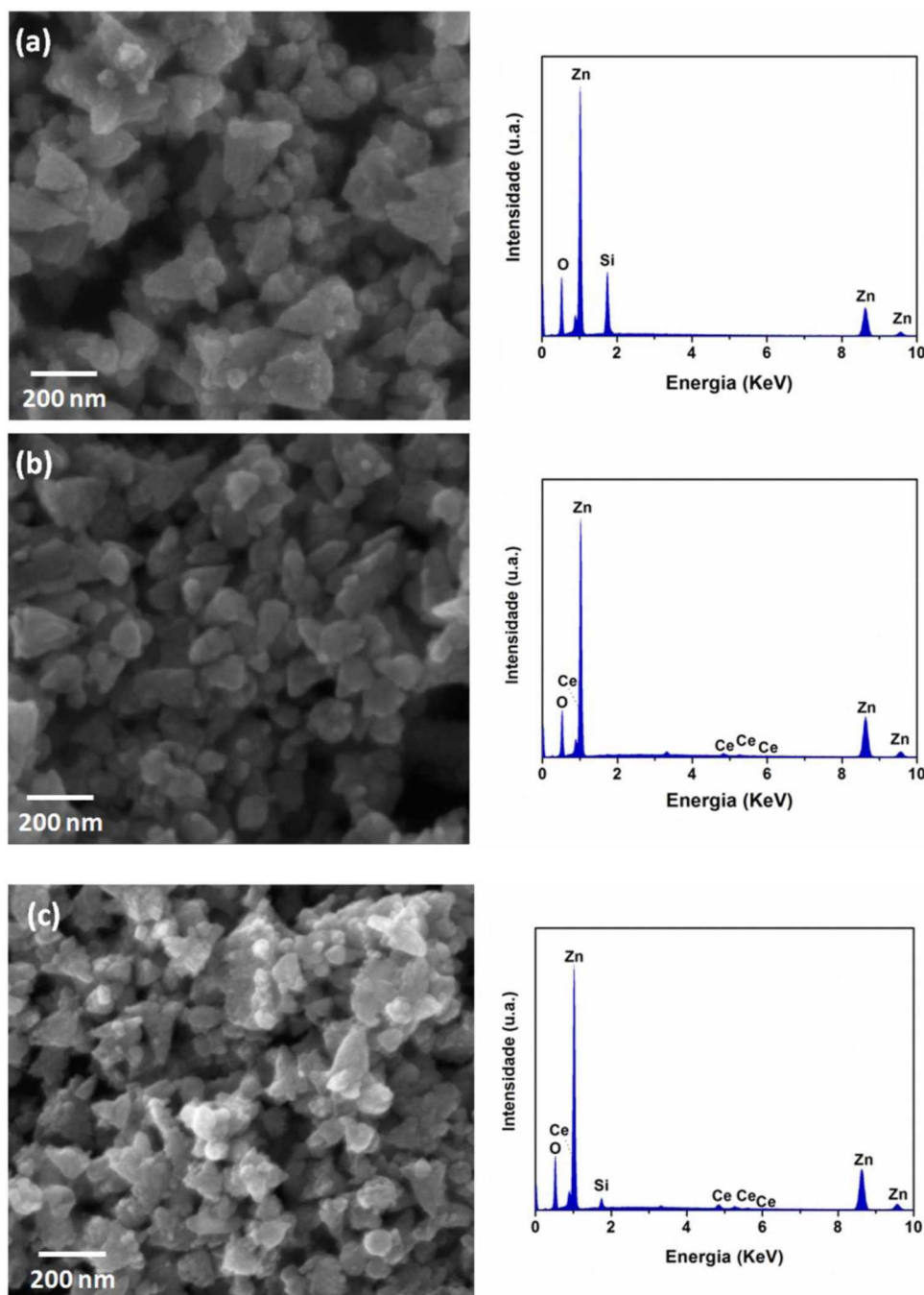
4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG) e análise de raios X por dispersão em energia (EDX)

As imagens, das amostras de ZnO puro e dopada com os íons TR sintetizadas nos tempos de 2 e 16 minutos, obtidas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV), são mostrados nas Figuras 23, 23.1, 24 e 24.1.

Na contagem do tamanho médio das partículas foram consideradas aproximadamente 100 partículas a partir das imagens. Estão apresentados conjuntamente com as imagens os espectros EDX das amostras, representando a composição das mesmas.

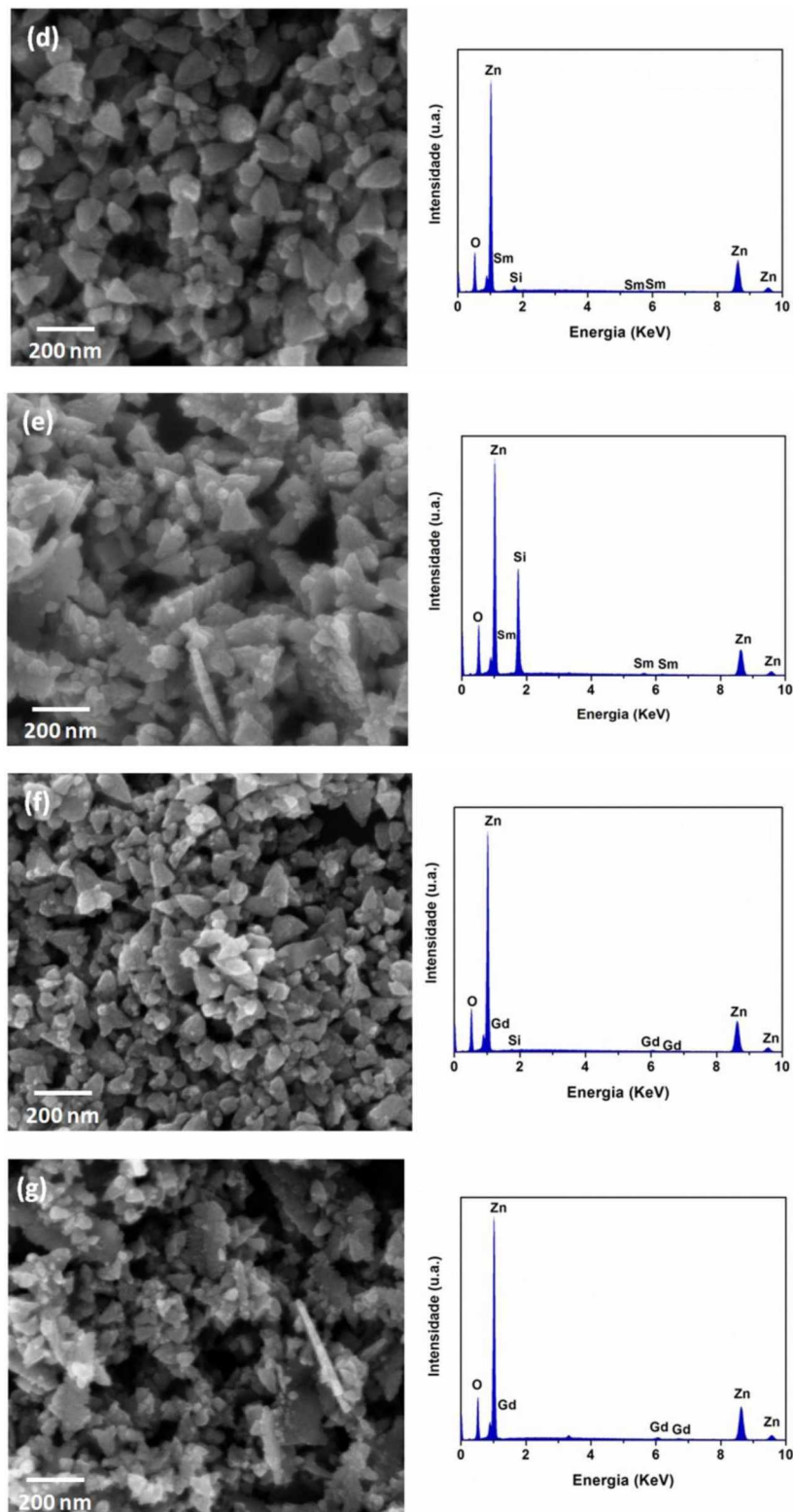
A adição dos íons terras raras Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} na estrutura do ZnO e a variação dos tempos de síntese (2 e 16 minutos) podem influenciar no crescimento e na morfologia das partículas.

Figura 23. Imagens obtidas por MEV-FEG e espectros EDX das amostras de ZnO puro (a), dopado com 1% em mol de Ce^{4+} (b) e 2% em mol de Ce^{4+} (c) sintetizadas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

Figura 23.1. Imagens obtidas por MEV-FEG e espectros EDX das amostras de ZnO dopado com 1% em mol de Sm^{3+} (d), 2% em mol de Sm^{3+} (e), 1% em mol de Gd^{3+} (f) e 2% em mol de Gd^{3+} (g), sintetizadas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

De acordo com as Figuras 23 e 23.1, observa-se que as partículas não apresentam uma morfologia muito regular e definida e que a incorporação dos íons terras-raras influencia na forma dos materiais. Além disso, a incorporação do dopante na estrutura e as condições de síntese empregadas influenciam no tamanho das partículas. É possível visualizar a partir dessas micrografias a forma e a aglomeração das partículas as quais se unem na formação da solução sólida.

Para a amostra de ZnO puro obtido após 2 minutos foram observadas partículas com formas regulares e aglomeradas, apresentando um tamanho médio de partículas em torno de 85 nm e pequenas partículas agregadas de tamanho em torno de 30 nm. A amostra dopada com 1% em mol de Ce^{4+} apresentou partículas com tamanho médio em torno de 75 nm, não apresentando mudanças significativas na morfologia em comparação à amostra pura. Com o aumento da concentração dos íons Ce^{4+} , observou-se uma diminuição no tamanho das partículas com tamanho médio em torno de 68 nm e formação de agregados aglomerados (Figuras 23 (a) – (c)).

Para as amostras dopadas com íons Sm^{3+} (Figuras 23.1 (d) – (e)), a adição de apenas 1% em mol de Sm^{3+} não promoveu alterações significativas sob a morfologia do ZnO, porém a adição de 2% em mol levou a formação de um agregado com morfologia lamelar e com partículas em sua superfície de tamanho em torno de 20 nm, diferente do observado nas imagens de ZnO puro e com 1% em mol de Sm^{3+} .

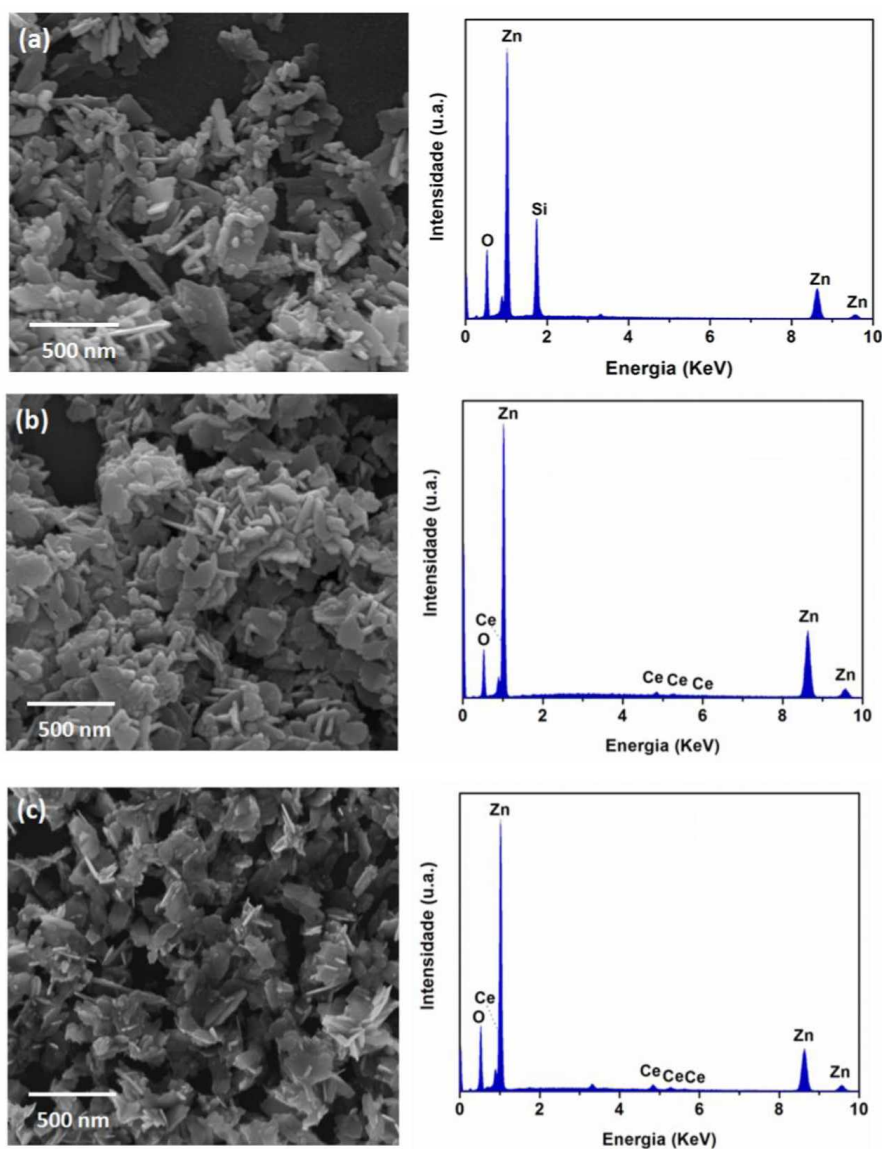
Para as amostras dopadas com íons Gd^{3+} (Figuras 23.1 (f) – (g)), na concentração de 1% em mol, tem-se a formação de partículas ligeiramente alongadas e mais homogêneas com partículas menores que 20 nm sobre a superfície e aumentando a concentração do dopante (2% em mol), houve uma maior irregularidade na morfologia das amostras, com agregados de partículas menores, formando regiões mais aglomeradas com morfologia bem alongadas.

Os espectros de EDX são mostrados também nas Figuras 23 e 23.1, indicando a composição das amostras pura e dopada com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} . Verificou-se a presença dos elementos dopantes terras-raras. O pico do silício (Si) observado em algumas amostras é o sinal referente ao substrato, no qual as amostras são depositadas.

As imagens de MEV para as amostras de ZnO puro e dopados com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} , sintetizadas no tempo de 16 minutos são apresentadas nas Figuras 24 e 24.1.

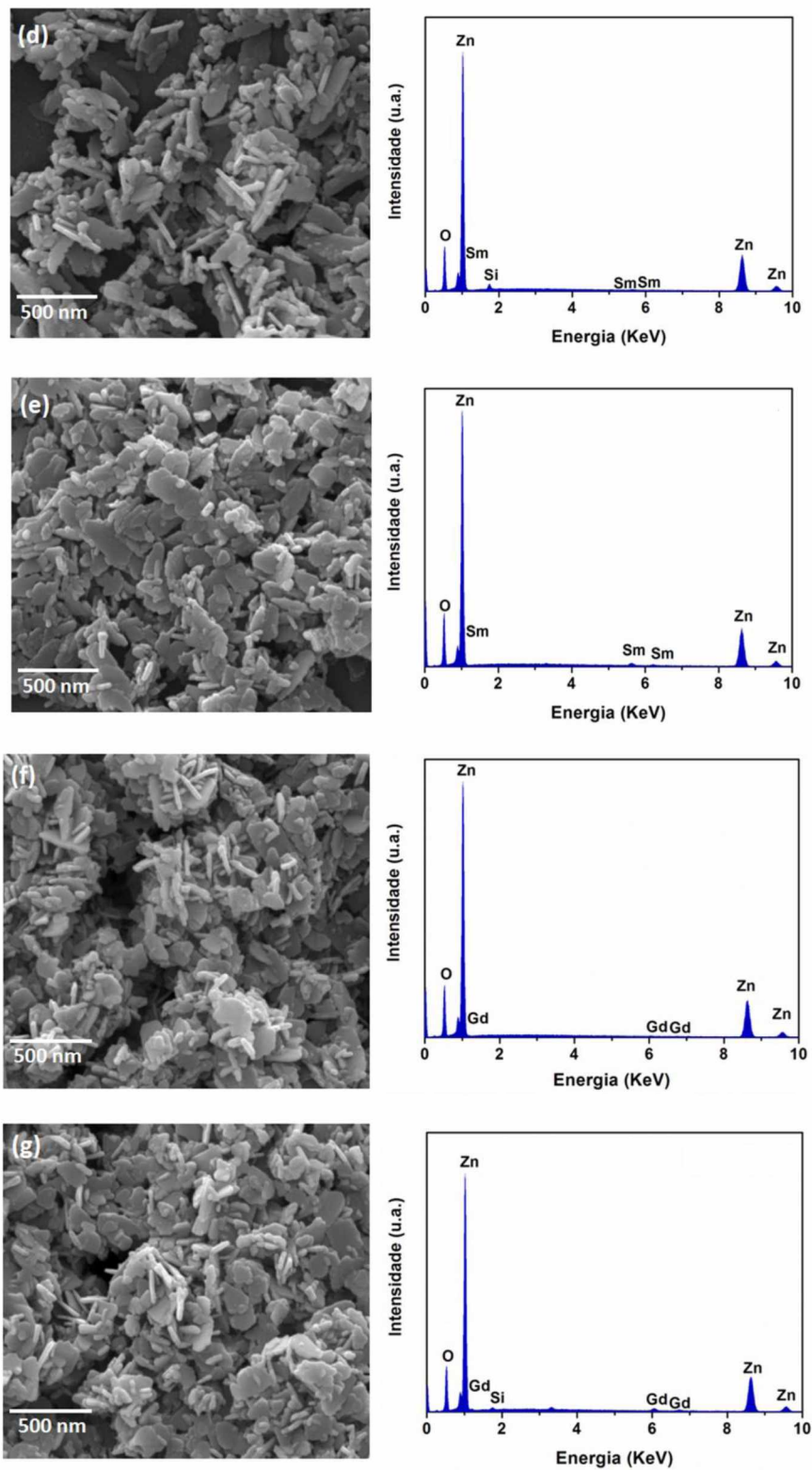
A variação no tempo de síntese hidrotérmica de micro-ondas para 16 minutos gerou mudanças significativas na morfologia das partículas quando comparado com as amostras obtidas no tempo curto de 2 minutos de síntese.

Figura 24. Imagens obtidas por MEV e espectros EDX das amostras de ZnO puro (a), dopado com 1% em mol de Ce^{4+} (b) e 2% em mol de Ce^{4+} (c) sintetizadas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

Figura 24.1. Imagens obtidas por MEV e espectros EDX das amostras de ZnO dopado com 1% em mol de Sm^{3+} (d), 2% em mol de Sm^{3+} (e), 1% em mol de Gd^{3+} (f) e 2% em mol de Gd^{3+} (g), sintetizadas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

De acordo com as Figuras 24 e 24.1, observa-se que as partículas apresentam uma morfologia do tipo placa ligeiramente aglomeradas. As condições de síntese empregadas colaboram significativamente para as variações na morfologia das partículas.

Para a amostra pura houve formação de placas irregulares, aglomeradas com agregados de partículas menores na ordem de 30 nm sobre a superfície e espessura média de 45 nm. A amostra dopada com 1% em mol de Ce^{4+} apresentou uma morfologia ligeiramente mais regular e homogênea, com placas de espessura média de aproximadamente de 40 nm. Com o aumento da concentração do íon dopante (2% em mol de Ce^{4+}) tem-se uma diminuição da espessura das placas, uma espessura média de 28 nm (Figuras 24 (a) – (c)). A inserção de Ce^{4+} reduz o tamanho das partículas com a formação de agregados e com aumento da concentração, formação de placas mais finas.

Para as amostras dopadas com íons Sm^{3+} (Figuras 24.1 (d) – (e)) à medida que se aumentou a concentração do íon dopante (2% em mol) houve a formação de placas um pouco mais alongadas e não uniformes, com uma espessura média de 30 nm. Nas amostras dopadas com 1% em mol de Sm^{3+} houve a formação de placas com espessura de aproximadamente 40 nm. No caso das amostras dopadas com íons Gd^{3+} (Figuras 24.1 (f) – (g)), ambas apresentaram formação de placas aglomeradas com partículas menores sobre a superfície e uma espessura média em torno de 35 nm.

Os espectros EDX mostrados nas Figuras 24 e 24.1 ilustram a composição das amostras pura e dopada com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} , confirmando a presença dos elementos terras raras nas amostras, com nenhum traço de impureza, ou seja formação de uma solução sólida. O pico de silício (Si) observado nos espectros é o sinal referente ao substrato.

A variação no tempo de síntese hidrotérmica de micro-ondas influenciou consideravelmente o crescimento das partículas de ZnO, enfatizando novamente que o efeito do tempo de síntese é um papel muito importante para a formação das amostras.

De acordo com a literatura, em condições de equilíbrio termodinâmico, a taxa de crescimento mais rápido de ZnO é ao longo da direção [0001] devido à sua energia superficial mais elevada. Sob condições externas, tais como, pH da solução, temperatura, tempo de síntese, dentre outros, o crescimento a longo desta direção pode ser parcialmente suprimido (DAKHLAOU *et al.*, 2009).

A variação do tempo de síntese de 2 minutos para 16 minutos e o valor de pH 12 na síntese neste trabalho, foram considerados fatores importantes no mecanismo de

crescimento das partículas. A adição de íons OH^- em concentrações consideráveis, associado a um tempo curto de síntese leva a uma cinética de reação mais rápida. As unidades de crescimento $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ começam a ser incorporadas no ZnO ao longo do eixo-c [0001] sob diferentes sítios, devido principalmente ao meio fortemente alcalino, em que OH^- é facilmente adsorvido na superfície polar de (0001) (WANG *et al.*, 2011; AKIR *et al.*, 2016), e ao rápido tempo de síntese de 2 minutos, fazendo com que a direção de crescimento [0001] seja favorecida. Isto é observado pelas partículas das amostras obtidas em 2 minutos, com morfologias ligeiramente alongadas (Figuras 23 e 23.1).

A formação de nanoplacas ou nanofolhas de ZnO pode estar associada ao excesso de OH^- no meio reacional aliado principalmente a um prolongamento do tempo de síntese (16 min) (Figuras 24 e 24.1). Estes fatores externos possivelmente retardam o crescimento na direção [0001], favorecendo a direção $[01\bar{1}0]$ na formação e crescimento das nanoplacas. S. Akir *et. al* (2016) relataram a formação de nanofolhas de ZnO obtido por condições hidrotérmicas e, como sendo o principal mecanismo de crescimento das nanofolhas ao longo da direção preferencial $[01\bar{1}0]$.

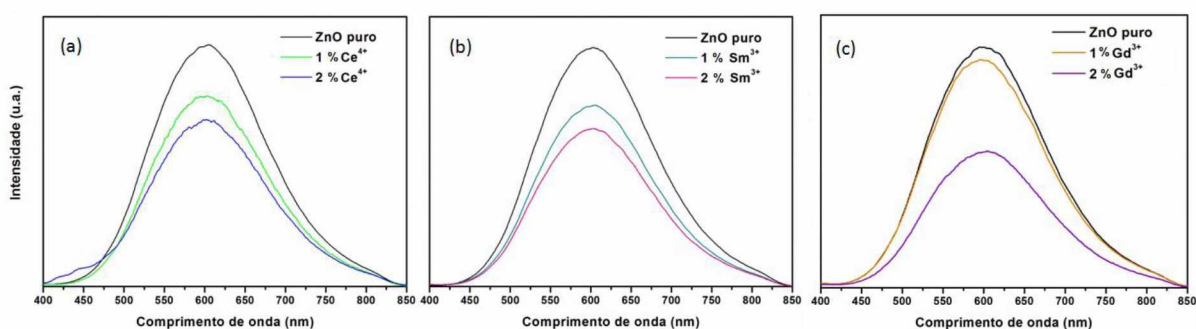
4.5. Estudo das propriedades Fotoluminescentes

Foram realizadas medidas de fotoluminescência para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons TR sintetizadas nos tempos de 2 e 16 minutos à temperatura ambiente. As amostras apresentaram uma ampla faixa de emissão fotoluminescente com as contribuições da região visível do espectro eletromagnético. A banda larga de emissão origina-se da soma das diferentes emissões na região do visível devido da soma radiativa do par electrón-buraco nos níveis existentes na região do *gap*, no qual estão associados a defeitos estruturais na rede cristalina do ZnO.

Os picos na região do visível são atribuídos aos defeitos estruturais presentes no ZnO, tais como, vacâncias de oxigênio (V_{O}), oxigênio intersticial (O_i), zinco intersticial (Zn_i) e vacâncias de zinco (V_{Zn}), sendo fortemente dependentes das condições experimentais empregadas na obtenção dos materiais, e podendo ser muito influenciadas pela presença de impurezas extrínsecas (íons dopantes inseridos na rede cristalina). A origem e as posições destas bandas ainda são um pouco controversas, várias hipóteses têm sido reportadas na literatura para explicar estas emissões no visível

(VANHEUSDEN *et al.*, 1996; STUDENIKIN *et al.*, 1998; LIMA, R. C. *et al.*, 2007; DE MOURA *et al.*, 2010; MAHMOUD, 2010; MARINHO *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2014; QIN *et al.*, 2014; DOS REIS, P. M. *et al.*, 2015; LIANG *et al.*, 2015; PANDEY *et al.*, 2015; THANGARAJ *et al.*, 2015). Os espectros de fotoluminescência obtidos à temperatura ambiente para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons com Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} sintetizados no tempo de 2 minutos, são apresentados na Figura 25.

Figura 25. Espectros de emissão fotoluminescente ($\lambda_{\text{exc}} = 350,7 \text{ nm}$) para as amostras dopadas com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (a), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (b) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} (c) sintetizadas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



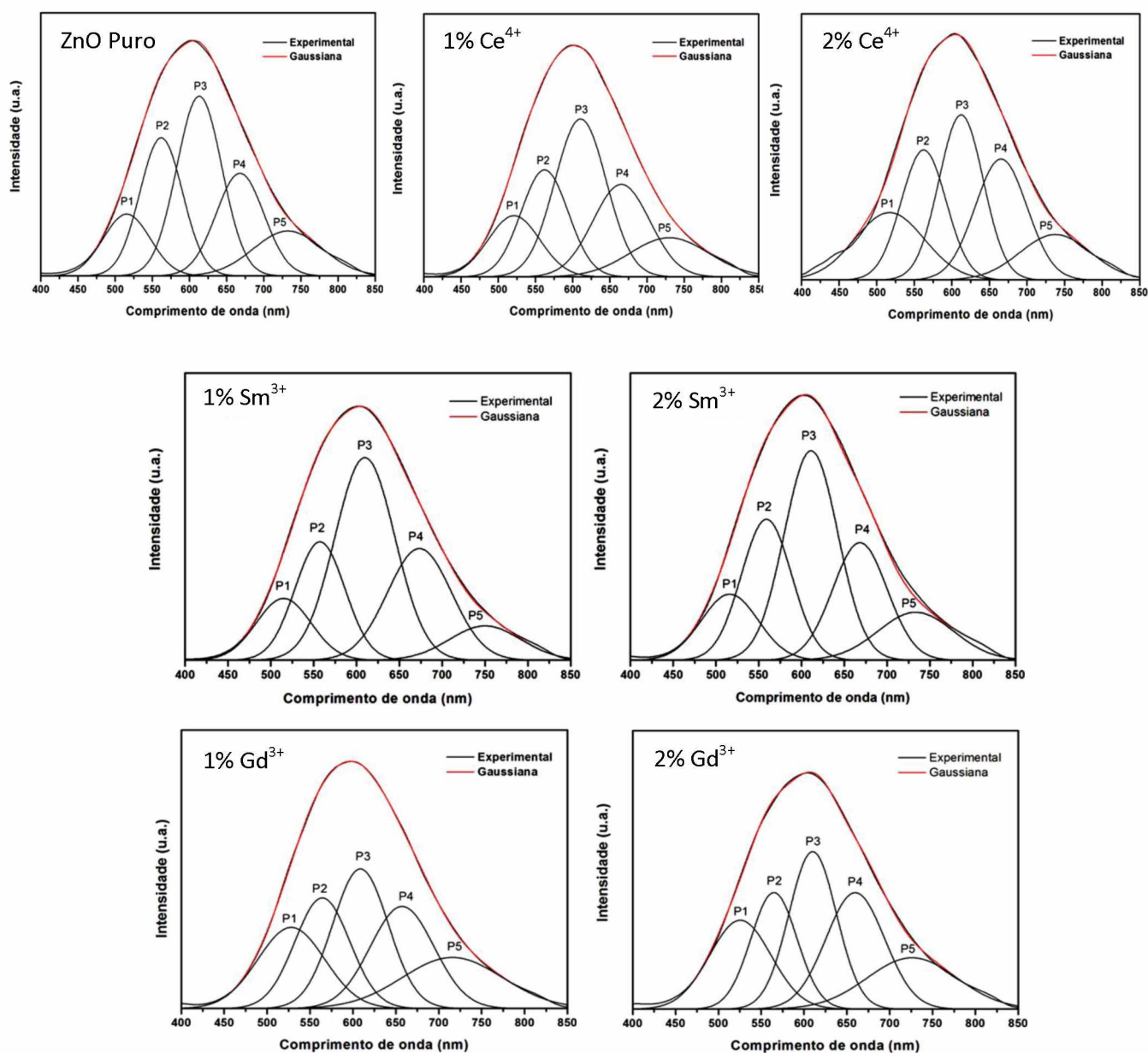
Fonte: o Autor (2017).

Todas as amostras apresentam o máximo da banda larga em torno de 613 nm que corresponde às contribuições de emissões no verde e no laranja. Emissões no verde estão associadas principalmente a vacâncias de oxigênio, zinco intersticiais e defeitos intrínsecos do ZnO; as emissões no amarelo/laranja são associadas com a presença de oxigênio nas posições intersticiais da rede (O_i) (STUDENIKIN *et al.*, 1998; AKIR *et al.*, 2016).

A intensidade de fotoluminescência diminui com a inserção dos dopantes na rede cristalina do ZnO. A dopagem é acompanhada pela formação de novos defeitos, causando uma ligeira distorção na rede e levando a uma maior desordem estrutural à médio e curto alcances, o que é observado pela diminuição na intensidade relativa de fotoluminescência com o aumento da concentração do íon dopante (PANDEY *et al.*, 2015). Na amostra dopada com 2% em mol de Ce^{4+} pôde ser observado um ombro suave na região da emissão do violeta/azul do espectro, possivelmente associado à presença de Ce ocupando posição intersticial na rede do ZnO (JUNG *et al.*, 2012; SHI

et al., 2014). A Figura 26 apresenta as curvas de decomposições para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons com Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} sintetizados no tempo de 2 minutos.

Figura 26. Decomposição das bandas de emissão fotoluminescente para as amostras de ZnO puro, dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} , dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

As bandas de emissão fotoluminescente foram decompostas em cinco componentes empregando uma função gaussiana para o ajuste da banda larga: são dois

componentes na região do verde (515 e 562 nm), uma componente na região do laranja (613 nm) e dois componentes na região do vermelho (665 e 736 nm).

As bandas de emissão na região do verde podem ser atribuídas à recombinação de elétrons da banda de condução (BC) com os buracos na vacância de oxigênio (V_O), associado também com a presença de vacâncias de zinco V_{Zn} , devido à incorporação dos íons TR na rede do óxido com formação de solução sólida. As bandas de emissão vermelha podem ser atribuídas à recombinação de elétrons livres e podem ser associadas com o excesso de oxigênio ocupando sítios intersticiais O_i (AKIR *et al.*, 2016; OTHMAN *et al.*, 2016).

Nas Tabelas 10-13 são apresentados os valores máximos do pico para cada componente de emissão e a sua porcentagem de área correspondente. De acordo com os resultados, observou-se que a emissão máxima para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons TR encontram-se na região do verde/laranja.

Tabela 10. Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para a amostras de ZnO puro obtida em 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

Emissões	Centro (nm)	Área (%)
Pico P1 (verde)	515	10,6
Pico P2 (verde)	562	23,6
Pico P3 (laranja)	613	32,6
Pico P4 (vermelho)	665	19,7
Pico P5 (vermelho)	736	13,5

Fonte: o Autor (2017)

Tabela 11. Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para a amostras de ZnO dopadas com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} obtidas em 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

Emissões	Centro (nm)	1% Ce^{4+} Área (%)	2% Ce^{4+} Área (%)
Pico P1 (verde)	515	13,3	17,2
Pico P2 (verde)	562	20,4	23,1
Pico P3 (laranja)	613	32,9	26
Pico P4 (vermelho)	665	21,3	22
Pico P5 (vermelho)	736	12,1	11,7

Fonte: o Autor (2017).

Tabela 12. Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para a amostras de ZnO dopadas com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} obtidas em 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

Emissões	Centro (nm)	1% Sm^{3+} Área (%)	2% Sm^{3+} Área (%)
Pico P1 (verde)	515	10,8	11,7
Pico P2 (verde)	562	19	23,1
Pico P3 (laranja)	613	39,2	35
Pico P4 (vermelho)	665	23,1	20
Pico P5 (vermelho)	736	7,9	10,2

Fonte: o Autor (2017).

Tabela 13. Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para as amostras de ZnO dopadas com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} obtidas em 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

Emissões	Centro (nm)	1% Gd^{3+} Área (%)	2% Gd^{3+} Área (%)
Pico P1 (verde)	515	17,6	18,3
Pico P2 (verde)	562	19,7	19
Pico P3 (laranja)	613	25,1	25,1
Pico P4 (vermelho)	665	21,1	23
Pico P5 (vermelho)	736	16,5	14,6

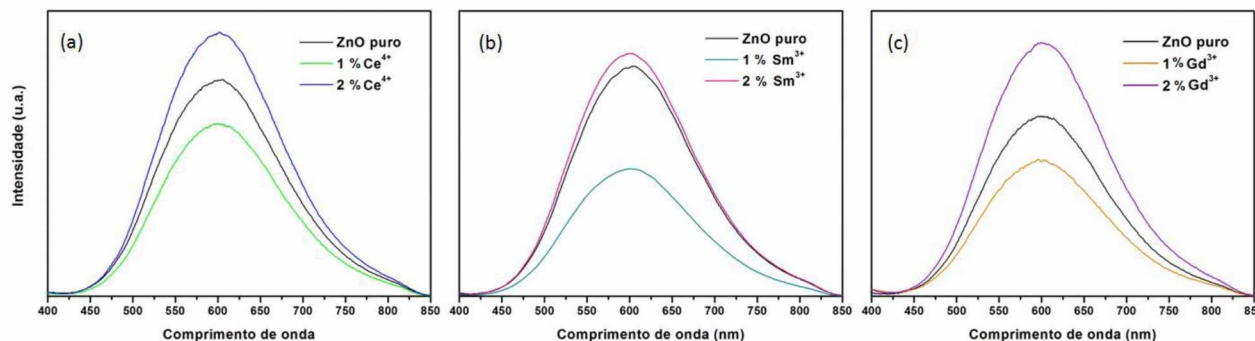
Fonte: o Autor (2017).

À medida que se aumentou a concentração de dopante na rede do ZnO (2% em mol de íons TR) observou-se que uma maior porcentagem de área está relacionada com a emissão no verde, por meio da soma das contribuições dos dois picos P1 e P2.

A maior porcentagem de área na região do verde, correlacionando com o aumento da quantidade do dopante na estrutura está associada à presença de defeitos estruturais e eletrônicos que resultam em diferentes processos de recombinação na região da energia de *band gap* do ZnO.

Os espectros de fotoluminescência obtidos à temperatura ambiente para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons com Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} sintetizados no tempo de 16 minutos, são apresentados na Figura 27.

Figura 27. Espectros de emissão fotoluminescente ($\lambda_{exc} = 350,7 \text{ nm}$) para as amostras dopadas com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} (a), dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} (b) e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} (c) sintetizadas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



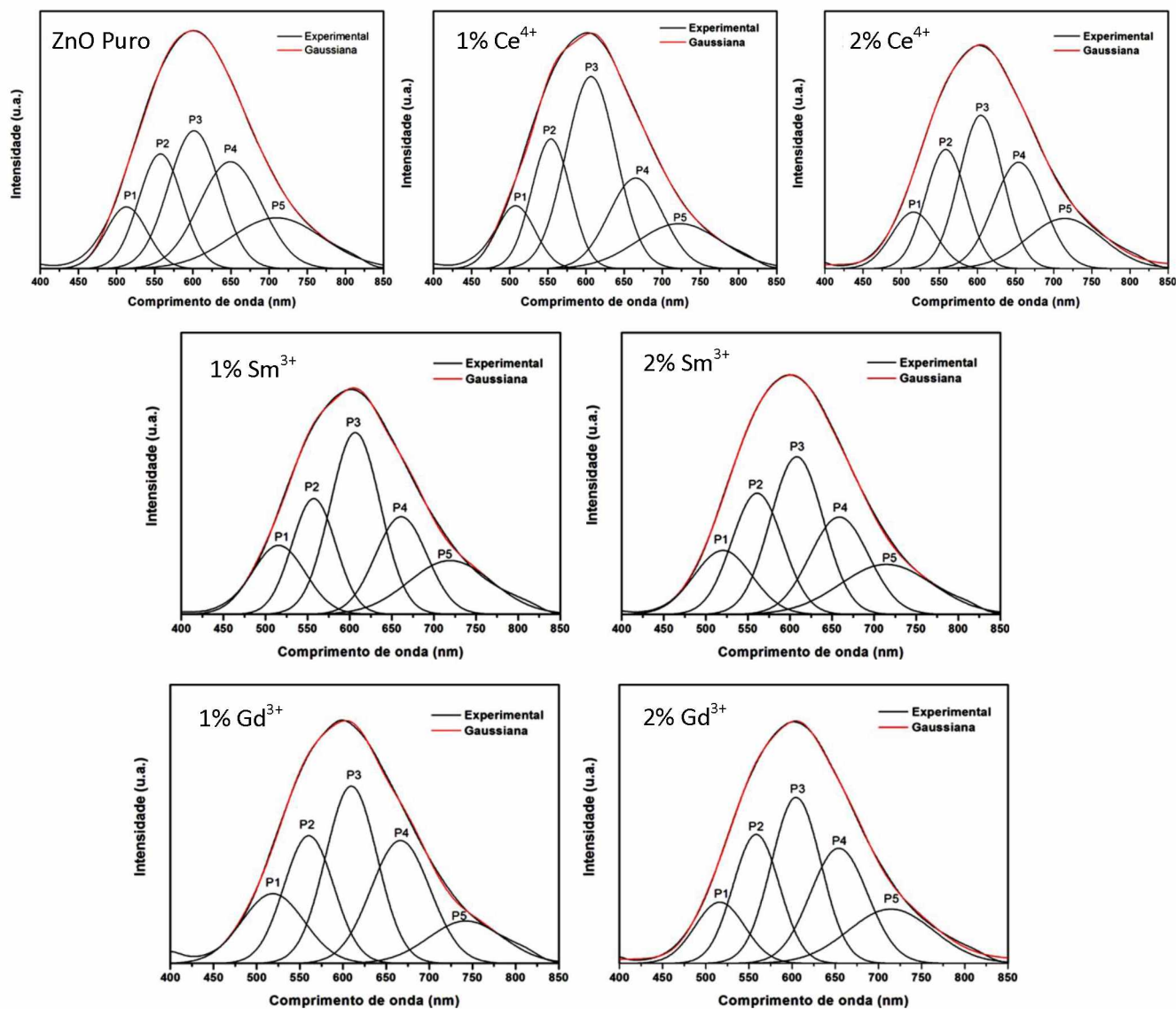
Fonte: o Autor (2017).

Todas as amostras também apresentam o máximo da banda larga em torno de 613 nm que corresponde às contribuições de emissões no verde e no laranja. A variação do tempo de síntese (2 e 16 minutos) influenciou as propriedades fotoluminescentes das amostras.

A uma concentração de 2% em mol do íon TR, a intensidade de fotoluminescência aumentou em comparação com ZnO puro, o que não foi observado para as amostras sintetizadas a 2 minutos, sugerindo que a recombinação dos elétrons e buracos aumentam. Esse aumento pode ser atribuído aos defeitos superficiais de vacâncias criados por um aumento da concentração do dopante na rede cristalina, que agem como centros de recombinação radiativa. (LIANG *et al.*, 2015; FAROOQI e SRIVASTAVA, 2016).

A Figura 28 apresenta as curvas de decomposições para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons com Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} sintetizados no tempo de 16 minutos. A partir dos resultados foi possível atribuir o quanto cada cor contribuiu para a emissão fotoluminescente. As bandas foram decompostas em cinco componentes, sendo dois componentes na região do verde (515 e 562 nm), uma componente na região do laranja (613 nm) e dois componentes na região do vermelho (665 e 736 nm).

Figura 28. Decomposição das bandas de emissão fotoluminescente para as amostras de ZnO puro, dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} , dopado com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} e dopado com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

Nas Tabelas 14-17 são apresentados os valores máximos do pico para cada componente de emissão e a sua porcentagem de área. Verificam-se que as bandas de emissão englobam a região do espectro visível, assim como as amostras sintetizadas a 2 minutos. De acordo com os resultados, observou-se que a emissão máxima para as amostras encontram-se na região do verde/laranja.

Tabela 14. Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para a amostras de ZnO puro obtida em 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

Emissões	Centro (nm)	Área (%)
Pico P1 (verde)	515	9,8
Pico P2 (verde)	562	19,2
Pico P3 (laranja)	613	27,1
Pico P4 (vermelho)	665	25,7
Pico P5 (vermelho)	736	18,2

Fonte: o Autor (2017)

Tabela 15. Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para a amostras de ZnO dopadas com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} obtidas em 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

Emissões	Centro (nm)	1% Ce^{4+}	2% Ce^{4+}
		Área (%)	Área (%)
Pico P1 (verde)	515	9,5	11,3
Pico P2 (verde)	562	22,5	25
Pico P3 (laranja)	613	35	23,6
Pico P4 (vermelho)	665	19	21
Pico P5 (vermelho)	736	14	19,1

Fonte: o Autor (2017).

Tabela 16. Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para as amostras de ZnO dopadas com 1 e 2% em mol de Sm^{3+} obtidas em 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

Emissões	Centro (nm)	1% Sm^{3+} Área (%)	2% Sm^{3+} Área (%)
Pico P1 (verde)	515	14	13
Pico P2 (verde)	562	18,5	22
Pico P3 (laranja)	613	33	29,2
Pico P4 (vermelho)	665	19	20
Pico P5 (vermelho)	736	15,5	15,8

Fonte: o Autor (2017).

Tabela 17. Valores de porcentagem de área para as bandas largas de fotoluminescência decompostas para as amostras de ZnO dopadas com 1 e 2% em mol de Gd^{3+} obtidas em 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

Emissões	Centro (nm)	1% Gd^{3+} Área (%)	2% Gd^{3+} Área (%)
Pico P1 (verde)	515	14,4	11
Pico P2 (verde)	562	21	23
Pico P3 (laranja)	613	30,1	29
Pico P4 (vermelho)	665	24	23,2
Pico P5 (vermelho)	736	10,5	13,8

Fonte: o Autor (2017).

A dopagem podem gerar defeitos, que resultam em diferentes processos de recombinação influenciando as emissões na região do visível. À medida que se aumentou a concentração de dopante na rede do ZnO, pode-se observar uma maior porcentagem de área relacionada a emissão no verde, por meio da soma das contribuições dos dois picos P1 e P2. A maior porcentagem de área na região do verde,

correlacionando com o aumento da quantidade do dopante na estrutura está atribuída ao aumento na densidade de defeitos estruturais criados, tais como vacâncias de oxigênio e zinco intersticiais, bem como os defeitos eletrônicos. Além disso, a valência do íon Zn é +2 em ZnO, e os íons Gd e Sm estando com a valência +3 e Ce na valência 4+, alguns defeitos estruturais e eletrônicos podem existir para compensar a diferença de carga.

O ligeiro aumento da emissão nas regiões laranja/vermelho a partir da dopagem, pode ser associado diretamente com as transições de níveis de impureza induzidas pela presença dos íons terras-raras e/ou alteração de níveis de impurezas associadas aos defeitos nativos em ZnO (FAROOQI e SRIVASTAVA, 2016; FLEMBAN *et al.*, 2016; LANG *et al.*, 2016; VIJAYAPRASATH *et al.*, 2016). Nenhum novo centro de emissão foi criado pela dopagem substitucional com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} , confirmando a formação de solução sólida.

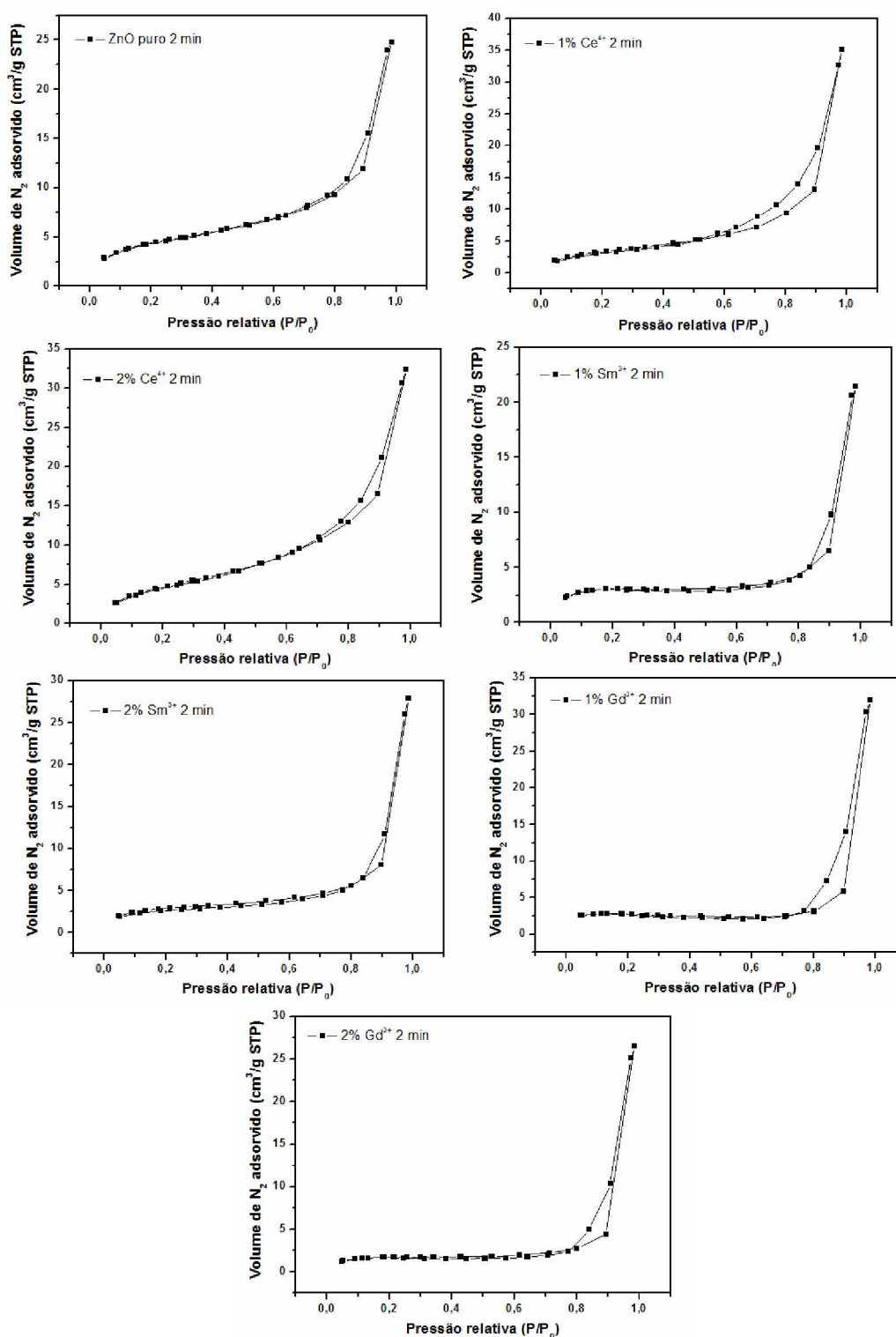
4.6. Área superficial específica

A área superficial específica, ou área da superfície total do sólido por unidade de massa, é um parâmetro importante a ser determinado, pois é na superfície do semiconductor que as reações se processam. Para um catalisador, quanto maior for a superfície disponível para os reagentes, maior será a conversão dos produtos e mais eficientemente se processarão as reações (BLIN *et al.*, 2012).

A área superficial das amostras de ZnO foi estimada utilizando isotermas de adsorção e dessorção de $\text{N}_2(\text{g})$ pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller) (BRUNAUER *et al.*, 1938), como apresentado nas Figuras 29 e 30.

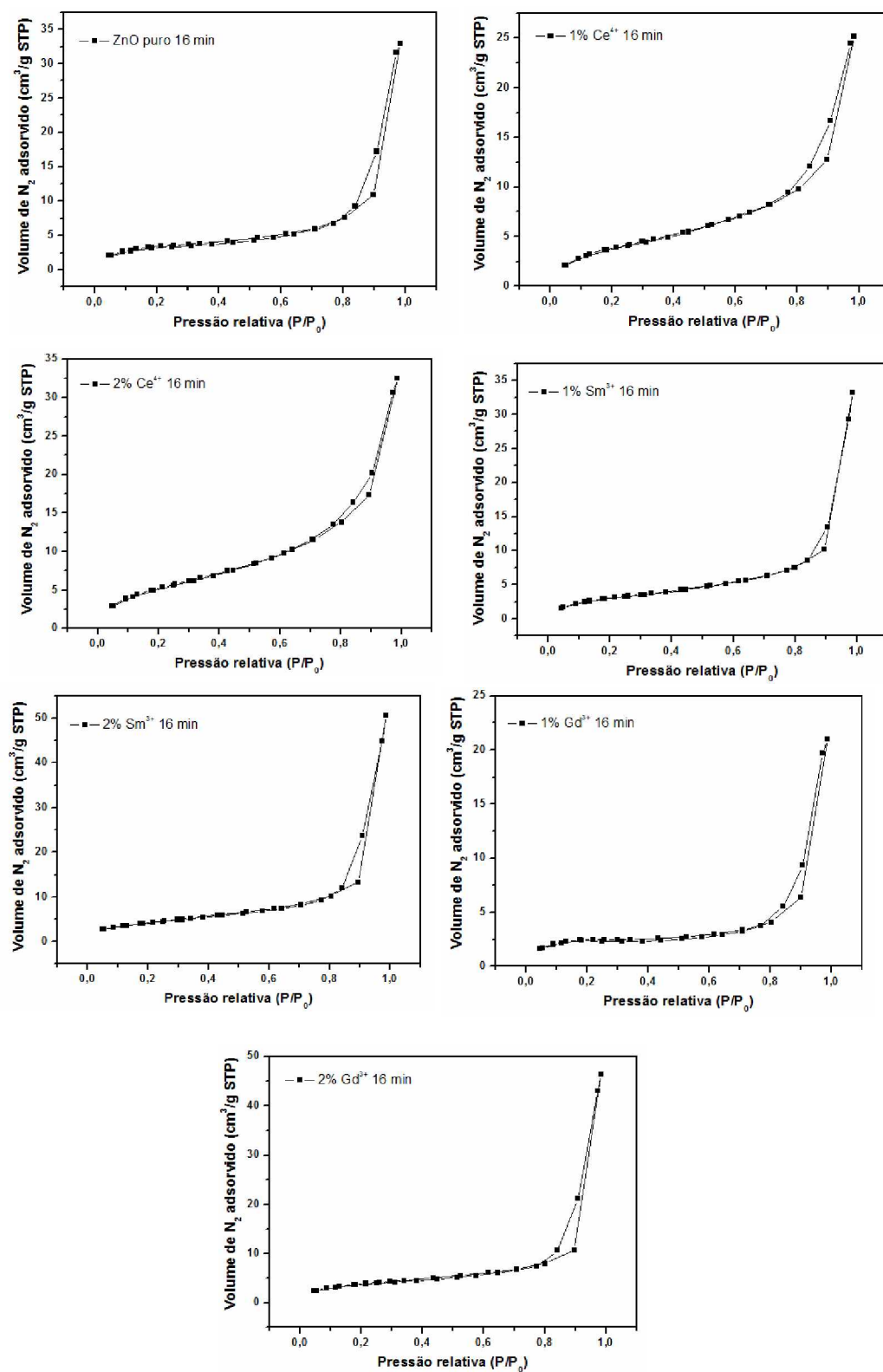
As isotermas apresentadas são do tipo IV com curva de histerese do tipo H3, característica de materiais mesoporosos, de acordo com a classificação IUPAC (KRUK e JARONIEC, 2001; YINGYING *et al.*, 2012). A porosidade das amostras foi estimada também com o auxílio das isotermas de adsorção e dessorção de acordo com a distribuição de poros segundo o método de BJH (Barret-Joyner-Halenda) (BRUNAUER *et al.*, 1938; TAN *et al.*, 2012). As isotermas são divididas em três partes, monocamada, multicamada e condensação capilar. Observa-se que, quanto menor a inclinação da multicamada, mais homogênea é a distribuição de tamanho dos poros (TEIXEIRA *et al.*, 2001; AMGARTEN, 2006; WALTON e SNURR, 2007).

Figura 29. Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio pelas amostras de ZnO puro e dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

Figura 30. Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio pelas amostras de ZnO puro e dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.



Fonte: o Autor (2017).

Todas as amostras sintetizadas, nos dois tempos de 2 e 16 minutos, apresentaram uma boa homogeneidade na distribuição dos poros. A área superficial, o tamanho médio dos poros e volume total dos poros das amostras de ZnO puro e dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} , nos tempos de 2 e 16 minutos, são apresentados nas Tabelas 18 e 19.

Tabela 18. Área superficial específica e porosidade estimada para as amostras de ZnO puro e dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

Amostras	Área superficial específica (m^2/g)	Volume total do poro (cm^3/g)	Diâmetro médio de poro (nm)
ZnO	15,78	0,038	9,74
1% Ce^{4+}	12,61	0,054	17,30
2% Ce^{4+}	18,04	0,050	11,32
1% Sm^{3+}	9,41	0,032	14,14
2% Sm^{3+}	9,91	0,043	17,40
1% Gd^{3+}	7,69	0,050	2,58
2% Gd^{3+}	5,30	0,041	3,10

Fonte: o Autor (2017).

Tabela 19. Área superficial específica e porosidade estimada para as amostras de ZnO puro e dopado com 1 e 2% em mol de Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} sintetizadas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

Amostras	Área superficial específica (m^2/g)	Volume total do poro (cm^3/g)	Diâmetro médio de poro (nm)
ZnO	11,89	0,051	17,18
1% Ce^{4+}	14,76	0,039	10,52
2% Ce^{4+}	20,50	0,050	11,32
1% Sm^{3+}	11,85	0,051	17,34
2% Sm^{3+}	15,80	0,078	19,86
1% Gd^{3+}	13,94	0,072	16,60
2% Gd^{3+}	7,84	0,033	2,06

Fonte: o Autor (2017).

De acordo com as Tabelas 18 e 19, observa-se que o diâmetro médio dos poros encontra-se distribuídos em uma faixa de aproximadamente 2 – 20 nm. As diferenças encontradas no tamanho dos poros podem estar relacionadas com o tamanho da partícula, que por sua vez, é influenciado pelas condições de síntese empregadas durante a obtenção dos materiais e pela inserção de íons dopantes, que criam defeitos superficiais e assim, podem gerar um crescimento desordenado das partículas (LIANG *et al.*, 2015). O volume total dos poros das amostras também foi estimado e está em uma faixa de 0,030 – 0,080 cm^3/g , os valores encontrados são esperados para o óxido de zinco nanoestruturado (KAJBAFVALA *et al.*, 2012; AHMED *et al.*, 2014).

O tempo de síntese hidrotérmica de micro-ondas, 2 e 16 minutos, causou mudanças nos valores de área superficial específica, bem como na morfologia das amostras de ZnO puro e dopado com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} , evidenciando ser um fator importante nas propriedades das amostras.

As amostras de ZnO puro e dopado com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} , sintetizadas no tempo de 2 minutos apresentaram uma morfologia muito irregular e com regiões aglomeradas (Figuras 23 e 23.1). De acordo com Z. Xing *et. al* (2011), as

nanoestruturas de ZnO com menores valores de área superficial específica serão menos estáveis contra a agregação das partículas. Nesse contexto, foi observado para a amostra dopada com 2% em mol de Gd^{3+} obtida a 2 minutos uma morfologia mais irregular e aglomerada, com agregados de partículas menores e com formas alongadas (Figura 23.1 (g)), apresentando assim um menor valor de área superficial ($5,30 \text{ m}^2/\text{g}$).

As amostras sintetizadas no tempo de 16 minutos apresentaram uma morfologia homogênea do tipo placas com espessuras entre 28-45 nm. As amostras dopadas com 1% e 2% em mol de TR obtidas no tempo de 16 minutos apresentaram um maior valor de área superficial quando comparadas com as mesmas sintetizadas no tempo de 2 minutos. As morfologias do tipo placa ou folhas possivelmente tendem a exibir valores maiores de área superficial devido a sua forma mais aberta, e os poros de menor tamanho observados, são intrínsecos dentro das nanoplacas de ZnO (poros de poros), enquanto que os poros de maior tamanho são principalmente devido aos interstícios entre as nanoplacas (QIU *et al.*, 2010; LIANG *et al.*, 2015). Nanoestruturas de ZnO puro e dopado com os íons terras raras na forma de placas podem apresentar aplicações em fotocatalise heterogênea. Um estudo a respeito da atividade fotocatalítica será apresentado a seguir.

Na literatura, encontram-se estudos correlacionando área superficial e morfologia, em que são encontradas diferenças nos valores de área superficial específica com as diferentes morfologias de ZnO.

A. Kajbafvala *et. al* (2012) sintetizaram ZnO por irradiação de micro-ondas com diferentes morfologias do tipo nanoesferas e nanoflores aglomeradas, em que, as nanoesferas apresentaram maior valor de área superficial que as nanoflores com 98 e $22,9 \text{ m}^2/\text{g}$, respectivamente.

F. Ahmed *et. al* (2014) obtiveram ZnO com diferentes morfologias, tais como nanobastões, nanoflores, nanoprimas e nanopirâmides. Essas diferenças resultaram em diferentes valores de área superficial, 28,2, 19,4, 9,6 e $6,1 \text{ m}^2/\text{g}$, respectivamente. Além disso, estudaram o efeito da morfologia nas propriedades fotoluminescentes e fotocatalíticas do ZnO.

A. N. Okte (2014) sintetizaram ZnO puro e dopado com 1% em mol de Ln (Ln = La, Eu, Gd, Dy e Ho). Com a inserção dos íons dopantes, as morfologias mudaram em relação à amostra pura, passando de nanoesferas para nanoplacas aglomeradas. Este efeito foi observado na área superficial, em que as amostras dopadas apresentaram

maior valor de área superficial que a amostra de ZnO puro (ZnO 7,6 m²/g; 1% La 35 m²/g; 1% Eu 32 m²/g; 1% Gd 35 m²/g, 1% Dy 37 m²/g e 1% Ho 32 m²/g).

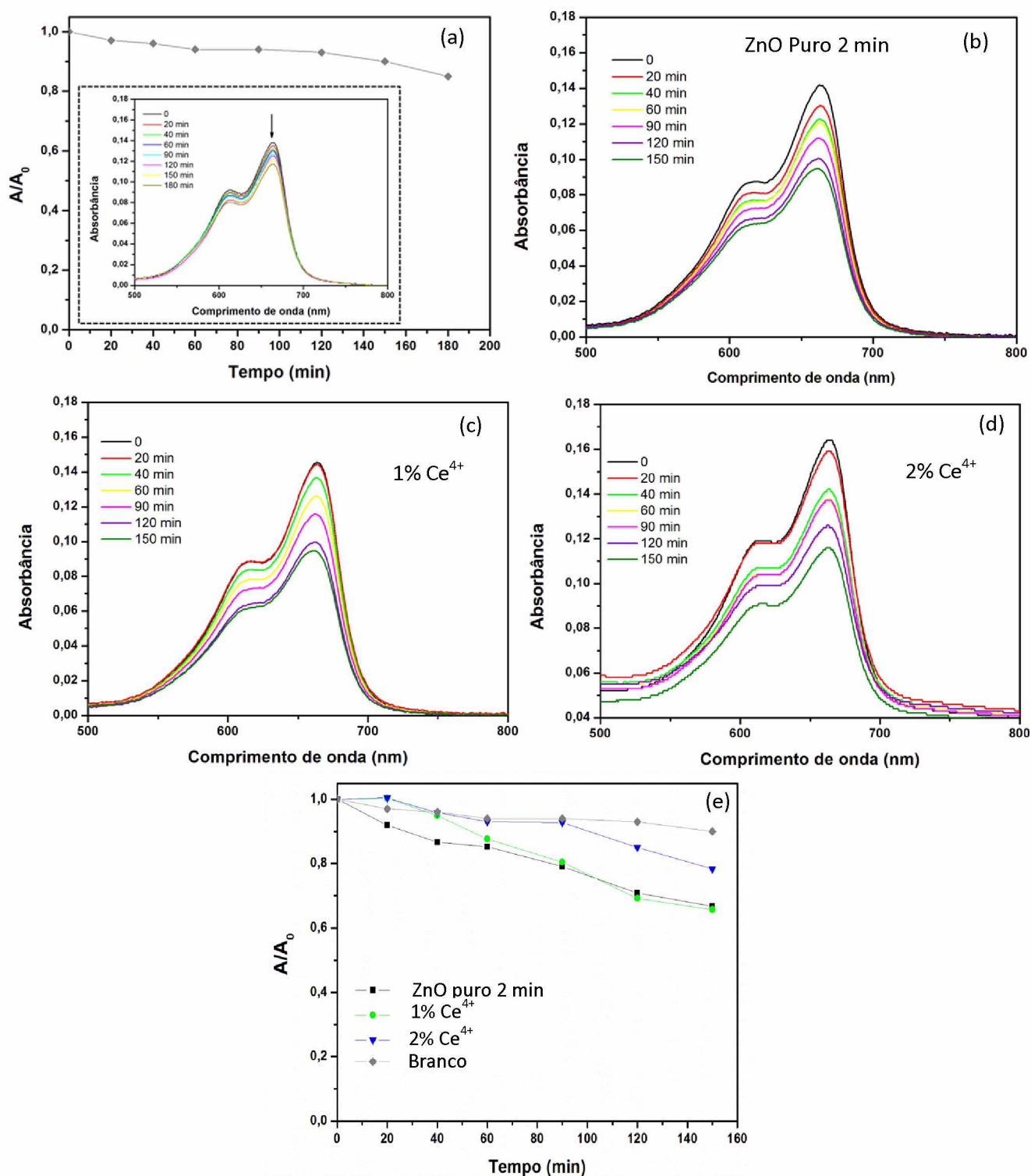
4.7. Estudo da atividade fotocatalítica

A atividade fotocatalítica das amostras de ZnO puro e dopado com os íons Ce⁴⁺, Sm³⁺ e Gd³⁺ sintetizadas nos tempos de 2 e 16 minutos foram avaliadas frente a degradação da solução aquosa do corante azul de metileno sob radiação UV-Vis.

A variação de absorbância na presença e na ausência das amostras preparadas a 2 minutos está apresentada nas Figuras 31-33. Podem ser observadas duas bandas de absorção característica do corante na região visível em 615 e 663 nm, sendo que a absorção máxima é em 663 nm. Por se tratar de um composto orgânico aromático, essas bandas de absorção podem ser atribuídas a transições do tipo $\pi - \pi^*$ para a banda de maior intensidade em 663 nm e para a banda de menor intensidade em 615 nm a transições $n - \pi^*$ (ROHATGI-MUKHERJEE, 1978; MELLO, 2006; PAVIA *et al.*, 2008). Observa-se um decréscimo gradual em função do tempo de irradiação UV-Vis. Esse decréscimo da absorbância é provavelmente devido à destruição do grupo cromóforo do corante, o que confirma a fotodescoloração do azul de metileno (FARBOD e JAFARPOOR, 2014; SONG *et al.*, 2014).

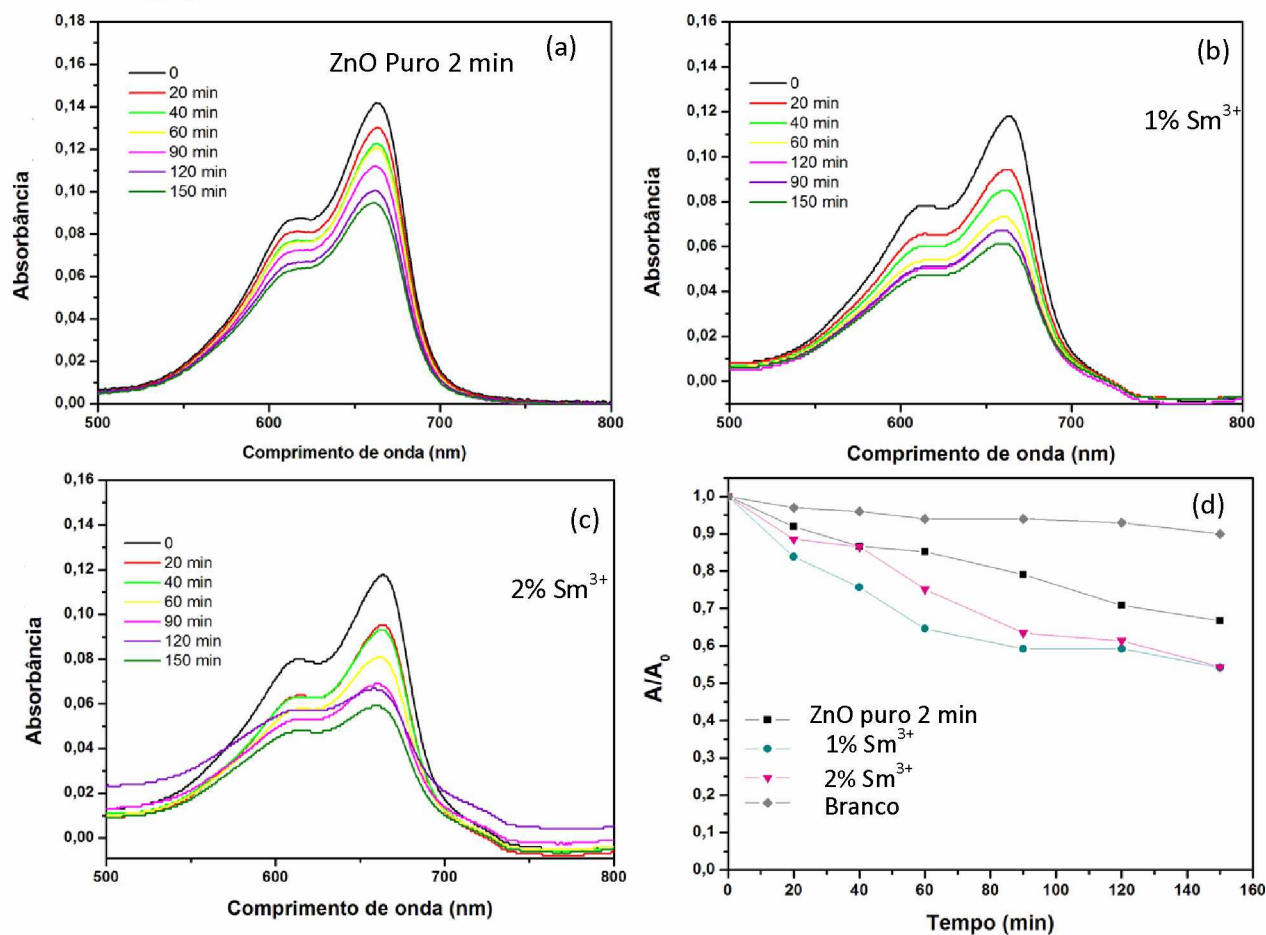
Como apresentado na Figura 31 (a), há um pequeno decréscimo na absorbância do azul de metileno no experimento com a ausência do catalisador (branco) após 180 minutos de irradiação, indicando que a fotodescoloração da solução de azul de metileno resultou em uma pequena degradação de 12%.

Figura 31. Fotodegradação do azul de metileno na ausência do catalisador (a). Tempo total de 180 min. Espectro de absorbância no UV-vis do azul de metileno na presença de ZnO puro (b), (c) 1% em mol de Ce^{4+} e (d) 2% em mol de Ce^{4+} . (e) Curso temporal de degradação fotocatalítica de azul de metileno. Para as amostras obtidas no tempo de 2 minutos.



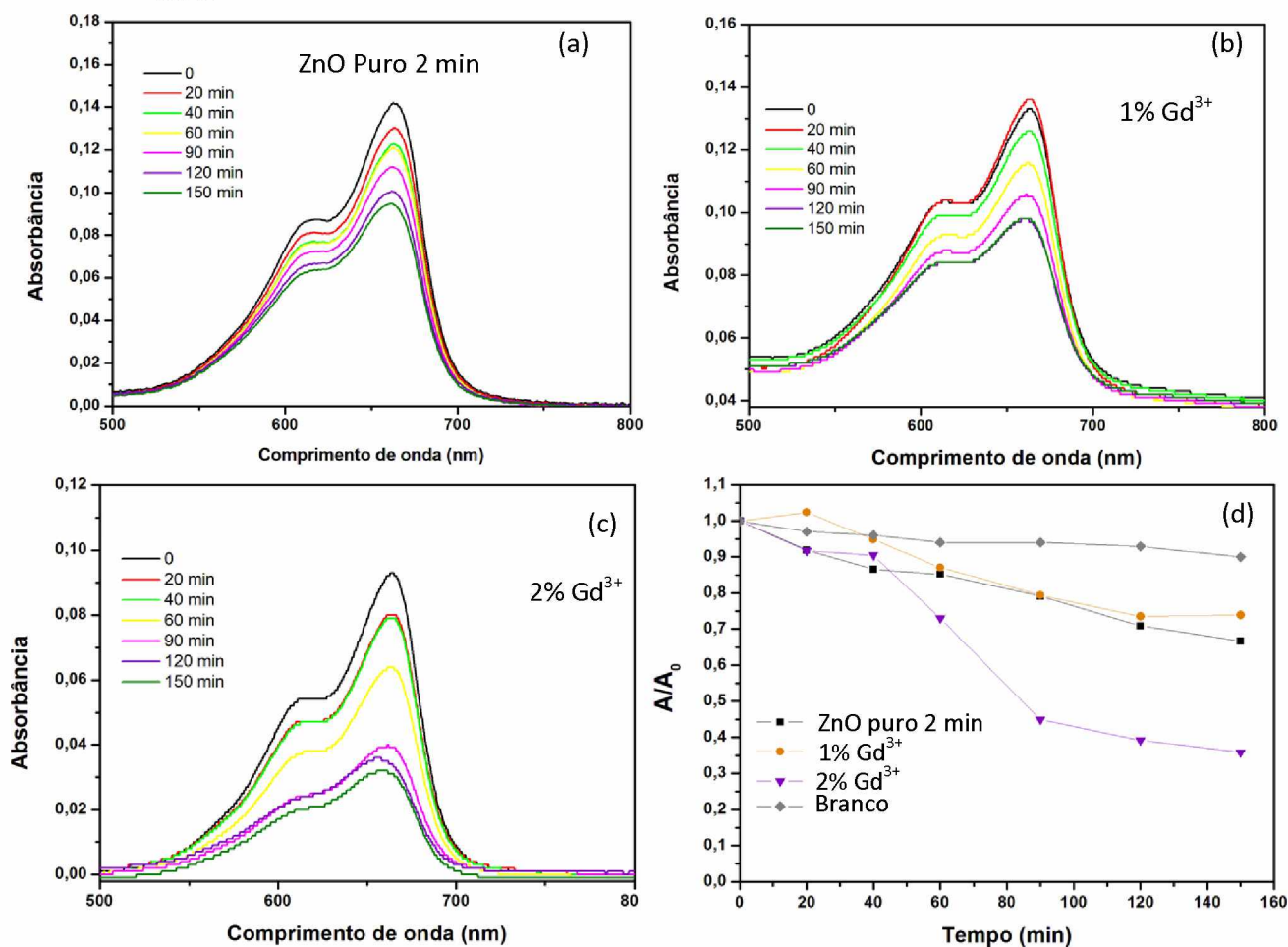
Fonte: o Autor (2017).

Figura 32. Espectros de absorbância no UV-vis do azul de metileno na presença de ZnO puro (a), (b) 1% em mol de Sm^{3+} e (c) 2% em mol de Sm^{3+} . Curso temporal de degradação fotocatalítica de azul de metileno (d). Para as amostras obtidas no tempo de 2 minutos.



Fonte: o Autor (2017).

Figura 33. Espectros de absorbância no UV-vis do azul de metileno na presença de ZnO puro (a), (b) 1% em mol de Gd^{3+} e (c) 2% em mol de Gd^{3+} . Curso temporal de degradação fotocatalítica de azul de metileno (d). Para as amostras obtidas no tempo de 2 minutos.



Fonte: o Autor (2017).

A eficiência fotocatalítica variou com a concentração dos íons dopantes na rede cristalina do ZnO. As eficiências fotodescoloração são apresentadas na Tabela 20.

A amostra que apresentou maior atividade fotocatalítica foi a amostra dopada com 2 mol% de Gd^{3+} (65% de fotodescoloração), mesmo apresentando um menor valor de área superficial ($5,30 \text{ m}^2/\text{g}$) que a amostra de ZnO puro ($15,78 \text{ m}^2/\text{g}$).

Tabela 20. Eficiência de fotodescoloração para as diferentes amostras obtidas no tempo de 2 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

Amostras	(%) Fotodescoloração
ZnO Puro	33
1% Ce ⁴⁺	34
2% Ce ⁴⁺	22
1% Sm ³⁺	45
2% Sm ³⁺	46
1% Gd ³⁺	26
2% Gd ³⁺	65

Fonte: o Autor (2017).

É conhecido que a eficiência do processo fotocatalítico é determinada pela separação dos pares de elétrons-buracos na superfície do catalisador e a separação desses portadores de carga fotogerados pode ser devido à estrutura cristalina do óxido, assim como, os defeitos estruturais e a presença dos íons dopantes incorporados na rede (HERRMANN, 2005b; CHANG e WACLAWIK, 2012; AHMED *et al.*, 2014; KHATAEE *et al.*, 2015). Entre esses fatores, os defeitos de superfície devem ser considerados na maioria dos casos, exceto para monocristais perfeitos.

A partir do aumento da quantidade de íons Gd³⁺ incorporados na rede do ZnO, há mais íons Gd³⁺ disponíveis para capturar os elétrons na superfície da banda de condução do ZnO, impedindo assim, a recombinação do par elétron-buraco e aumentando a separação de cargas e consequentemente, tem-se uma maior eficiência fotocatalítica quando comparada com a amostra de ZnO puro. Os íons Gd³⁺ podem ser encontrados preferencialmente nos interstícios da rede cristalina há então, uma modificação na densidade de cargas superficiais, melhorando a atividade fotocatalítica. Este comportamento também foi observado para as amostras dopadas com íons Sm³⁺, porém de forma menos significativa. O aumento na quantidade dos íons faz com eles atuem como aprisionadores de elétrons, consequentemente, há um maior número de elétrons e buracos nos sítios ativos da superfície do ZnO, melhorando a eficiência da

fotocatálise e resultando numa maior atividade (OPREA *et al.*, 2012; KHATAEE *et al.*, 2015; THANGARAJ *et al.*, 2015).

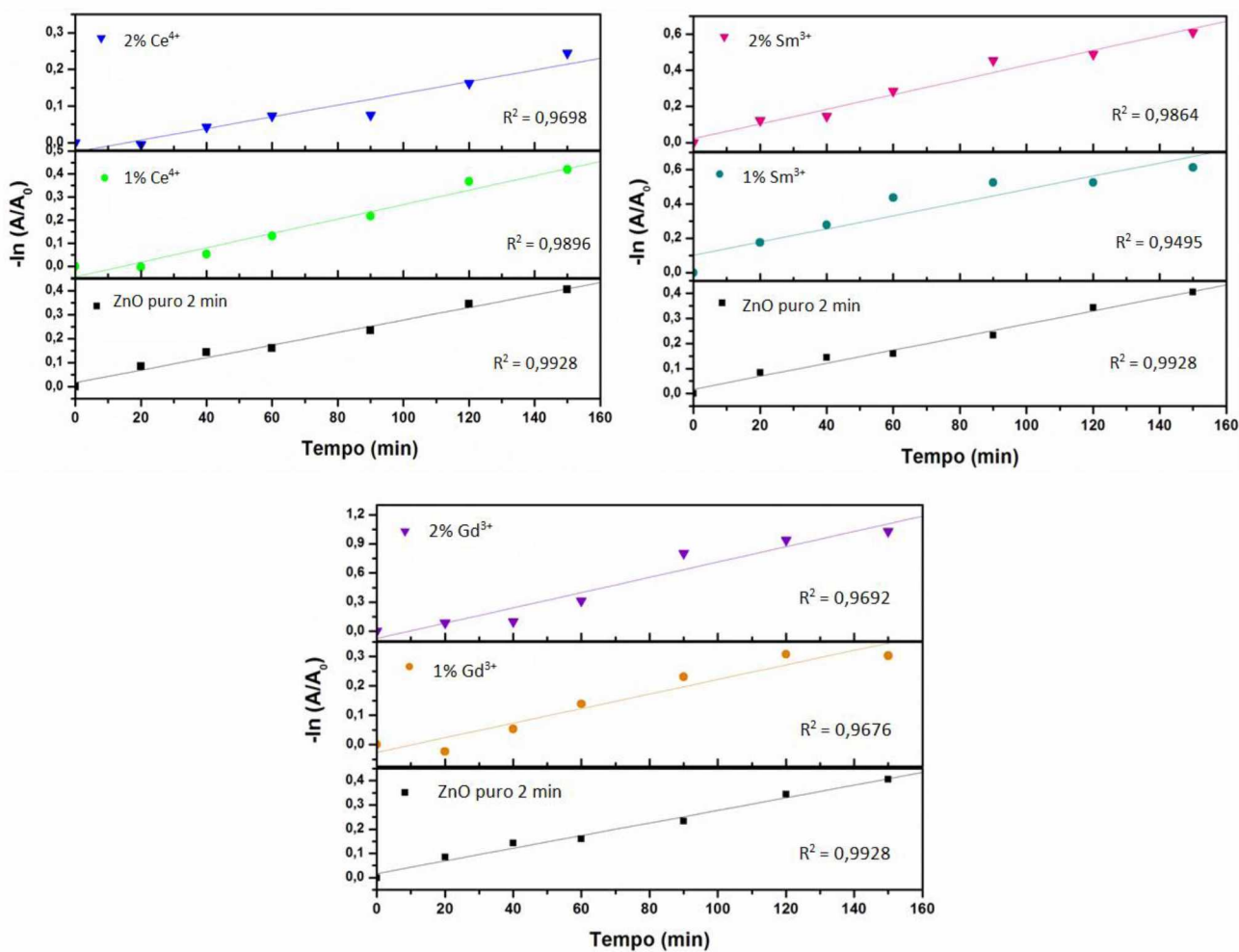
A amostra dopada com 1% em mol de Ce^{4+} apresentou maior eficiência fotocatalítica quando comparada com a amostra dopada com 2% em mol. Esse aumento na concentração levou a um excesso dos íons Ce^{4+} na superfície do ZnO, que levaram a uma redução da quantidade de O_2 adsorvido e consequentemente, diminui a fotoatividade do catalisador (LIANG *et al.*, 2015). As amostras dopadas com Ce^{4+} apresentaram uma menor eficiência fotocatalítica em comparação as demais, mesmo apresentando valores maiores de área superficial (Tabela 18). Estes íons, portanto, não atuaram significativamente como aprisionadores de elétrons na superfície do ZnO, especialmente a amostra com 2% de Ce^{4+} que apresentou uma fase secundária (7% de CeO_2) que pode ser interferente na fotodegradação.

A fotodescoloração do azul de metileno sob irradiação UV-vis obedece ao modelo de Langmuir-Hinschelwood bem estabelecido na literatura (CHAKRABARTI e DUTTA, 2004; YANG *et al.*, 2010; OLIVEIRA, D. F. M. *et al.*, 2012), de acordo com a equação (19):

$$\ln(A/A_0) = -kt \quad (19)$$

Em que, A é a absorbância da solução em um tempo $t > 0$, e A_0 é a absorbância inicial da solução e k é constante aparente de velocidade (min^{-1}). As relações lineares entre $\ln(A/A_0)$ e o tempo de irradiação são mostrados na Figura 34 e as constantes aparentes k calculadas são apresentadas na Tabela 21.

Figura 34. A descoloração de AM mediada pelos catalisadores ZnO puro, 1% em mol e 2% em mol de Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} preparados pelo método hidrotérmico de micro-ondas durante 2 minutos, ajustados de acordo com uma cinética de pseudo-primeira ordem.



Fonte: o Autor (2017).

Tabela 21. Constante aparente de velocidade k calculada para os diferentes catalisadores preparados pelo método hidrotérmico de micro-ondas durante 2 minutos.

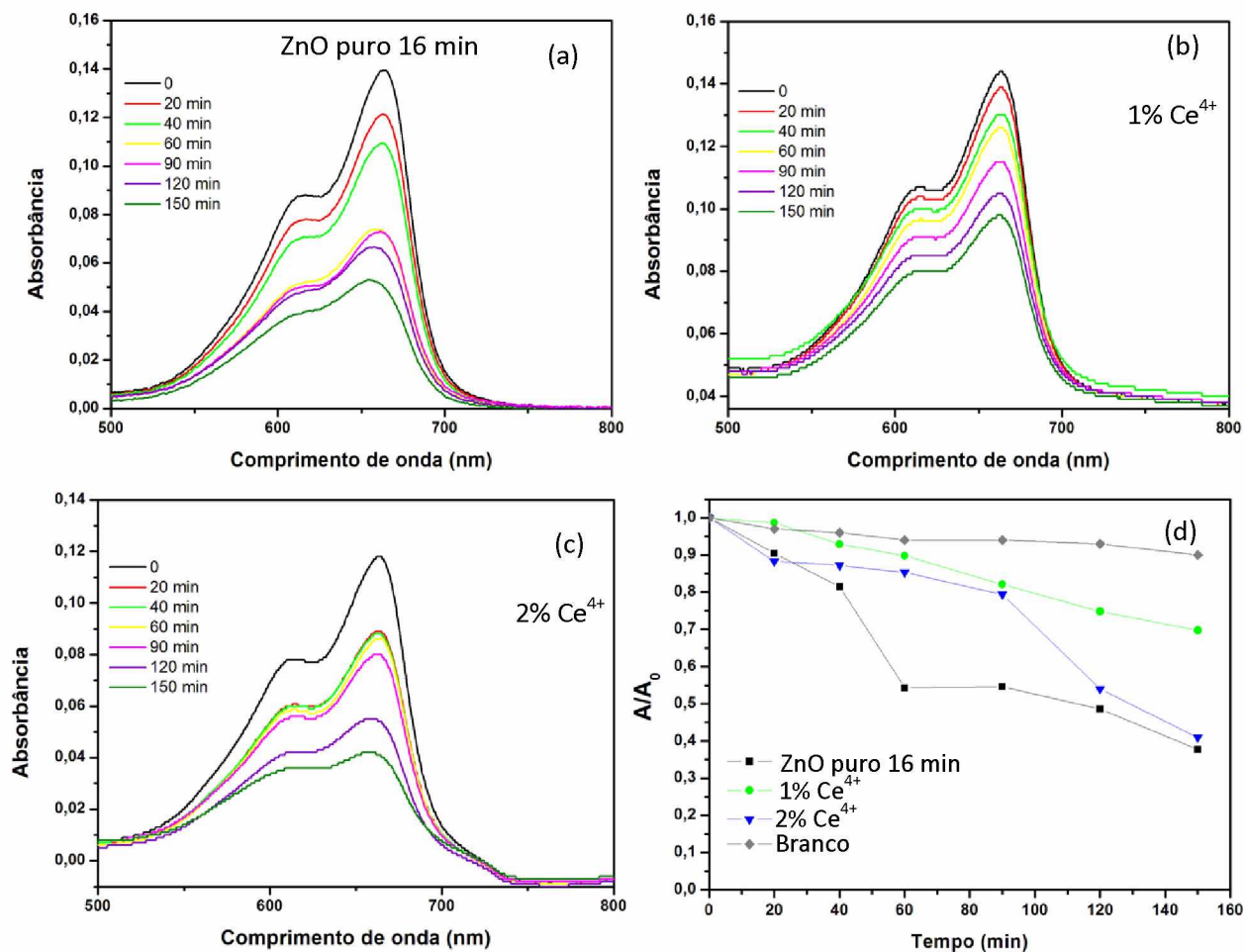
Amostras	k (min^{-1})
ZnO Puro	0,0027
1% Ce^{4+}	0,0028
2% Ce^{4+}	0,0016
1% Sm^{3+}	0,0038
2% Sm^{3+}	0,0041
1% Gd^{3+}	0,0025
2% Gd^{3+}	0,0079

Fonte: o Autor (2017).

Os resultados confirmam a melhor atividade fotocatalítica da amostra dopada com 2% em mol de Gd^{3+} com valor de constante de velocidade de $0,0079 \text{ min}^{-1}$, quase três vezes maior quando comparado à amostra pura.

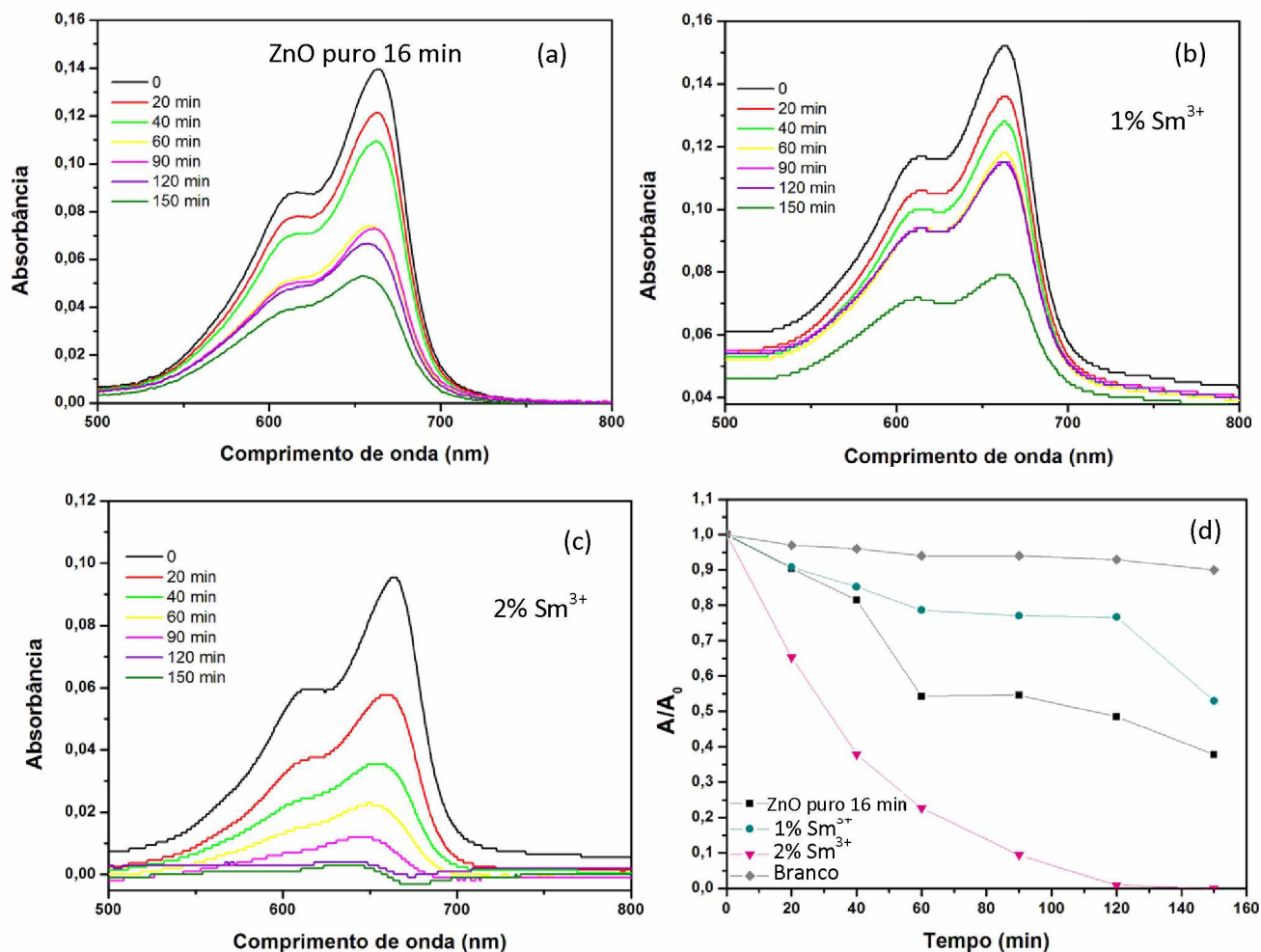
A variação de absorbância na presença das amostras de ZnO puro e dopado com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} sintetizadas no tempo de síntese hidrotérmica de 16 minutos seguem nas Figuras 35 - 37.

Figura 35. Espectro de absorbância no UV-vis do azul de metileno na presença de ZnO puro (a), (b) 1% em mol de Ce^{4+} e (c) 2% em mol de Ce^{4+} . Curso temporal de degradação fotocatalítica de azul de metileno (d). Para as amostras obtidas no tempo de 16 minutos.



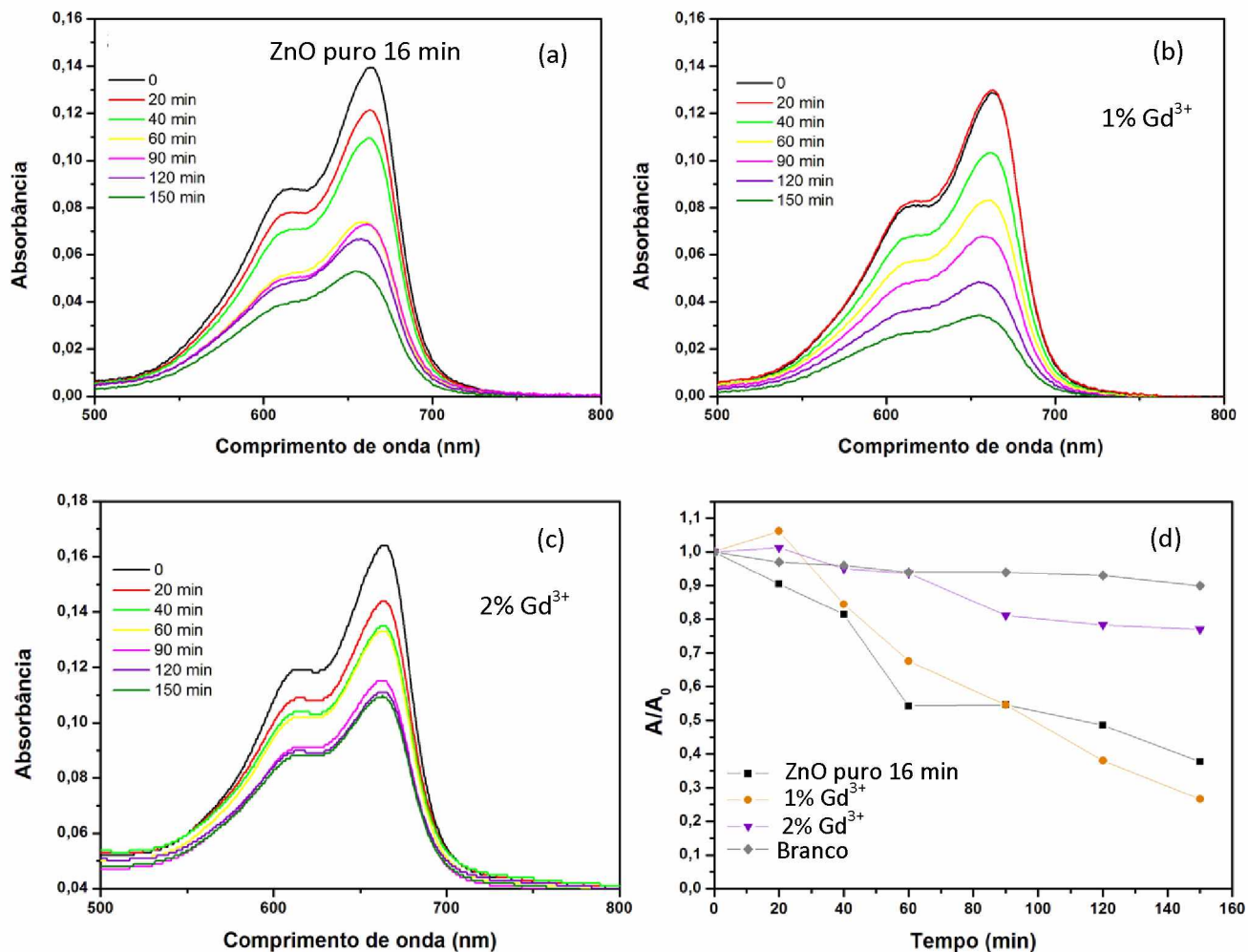
Fonte: o Autor (2017).

Figura 36. Espectro de absorbância no UV-vis do azul de metileno na presença de ZnO puro (a), (b) 1% em mol de Sm^{3+} e (c) 2% em mol de Sm^{3+} . Curso temporal de degradação fotocatalítica de azul de metileno (d). Para as amostras obtidas no tempo de 16 minutos.



Fonte: o Autor (2017).

Figura 37. Espectro de absorbância no UV-vis do azul de metileno na presença de ZnO puro (a), (b) 1% em mol de Gd^{3+} e (c) 2% em mol de Gd^{3+} . Curso temporal de degradação fotocatalítica de azul de metileno (d). Para as amostras obtidas no tempo de 16 minutos.



Fonte: o Autor (2016).

A eficiência fotocatalítica da descoloração do corante variou com os íons dopantes inseridos na rede cristalina do ZnO e também com a variação do tempo de síntese hidrotérmica de micro-ondas. As eficiências de fotodescoloração são apresentadas na Tabela 22.

Tabela 22. Eficiência de fotodescoloração para as diferentes amostras obtidas no tempo de 16 minutos pelo método hidrotérmico de micro-ondas.

Amostras	(%) Fotodescoloração
ZnO Puro	63
1% Ce ⁴⁺	31
2% Ce ⁴⁺	59
1% Sm ³⁺	48
2% Sm ³⁺	100
1% Gd ³⁺	73
2% Gd ³⁺	23

Fonte: o Autor (2017).

A variação no tempo de síntese hidrotérmica de micro-ondas das nanoestruturas de ZnO puro e dopadas com os íons TR, gerou uma mudança na atividade fotocatalítica. Em geral, as amostras sintetizadas no tempo de 16 minutos apresentaram maior eficiência de descoloração do corante.

As morfologias destas nanoestruturas são do tipo placas com nanopartículas sobre sua superfície (Figuras 24 e 24.1), o que está influenciando também nas propriedades fotocatalíticas das amostras. O melhor desempenho das amostras na forma de placas pode ser explicado conjuntamente a um maior valor de área superficial em relação às amostras obtidas em apenas 2 minutos (Tabelas 18 e 19), já que essas apresentam uma morfologia irregular e aglomerada, com partículas variando de forma triangular e circular (Figuras 23 e 23.1). A relação do aspecto de nanoplacas ou nanofolhas pode aumentar a separação dos portadores de carga fotogerados. Assim, os centros de recombinação tendem a diminuir com um número menor de junções interparticulares, e a alta deslocalização de elétrons em maior proporção nas nanoplacas leva a maior eficiência. Os átomos da superfície são mais reativos que os átomos presentes no volume das nanoestruturas, estes possuem sítios com ligação pendentes fazendo com que as nanopartículas sejam mais ativas e forneçam estados eletrônicos adicionais, tendo, consequentemente, maior reatividade (RÓZ *et al.*, 2015). Com o aumento da área superficial, proporcionalmente tem-se um aumento da reatividade e da

atividade fotocatalítica. A boa atividade fotocatalítica de ZnO com morfologia do tipo placas ou folhas frente a degradação de corantes orgânicos também foi relatado na literatura.

M. Rezaei e A. Habibi-Yangjeh (2013) sintetizaram ZnO na forma de placas aglomeradas dopado com 5 - 10% em mol de Ce^{4+} e observaram uma melhora na atividade fotocatalítica à medida que as placas tornaram-se mais regulares, obtendo 70% de fotodescoloração do azul de metileno em 100 minutos de experimento para a amostra dopada com 10% em mol de Ce^{4+} .

A. Khataee *et. al* (2015) descreveram a formação de ZnO na forma de placas dopado com 5% em mol de Gd^{3+} por irradiação ultrassônica, as amostras apresentaram uma boa atividade fotocatalítica com 90% de fotodescoloração do corante *acid orange 7* em 90 minutos de experimento.

S. Akir *et. al* (2016) sintetizaram ZnO com diferentes morfologias, tais como, nanoesferas, nanobastões e nanofolhas, sendo que, as amostras na forma de folhas apresentaram melhor atividade fotocatalítica frente as demais. As nanofolhas apresentaram 70% de fotodescoloração da rodamin B em 120 minutos de experimento.

Para a amostra de ZnO puro, a melhora na atividade fotocatalítica pode ser explicada pela densidade de defeitos estruturais e eletrônicos presentes na amostra, principalmente os defeitos do tipo vacâncias de oxigênio e oxigênio intersticial. As vacâncias de oxigênio e oxigênio intersticial são capazes de melhorar a eficiência da separação de cargas, diminuindo a taxa de recombinação do par-elétron buraco. Estudos ainda revelam que os sítios de vacância de oxigênios suprimem de forma mais satisfatória a recombinação excitônica (ZHENG *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2012).

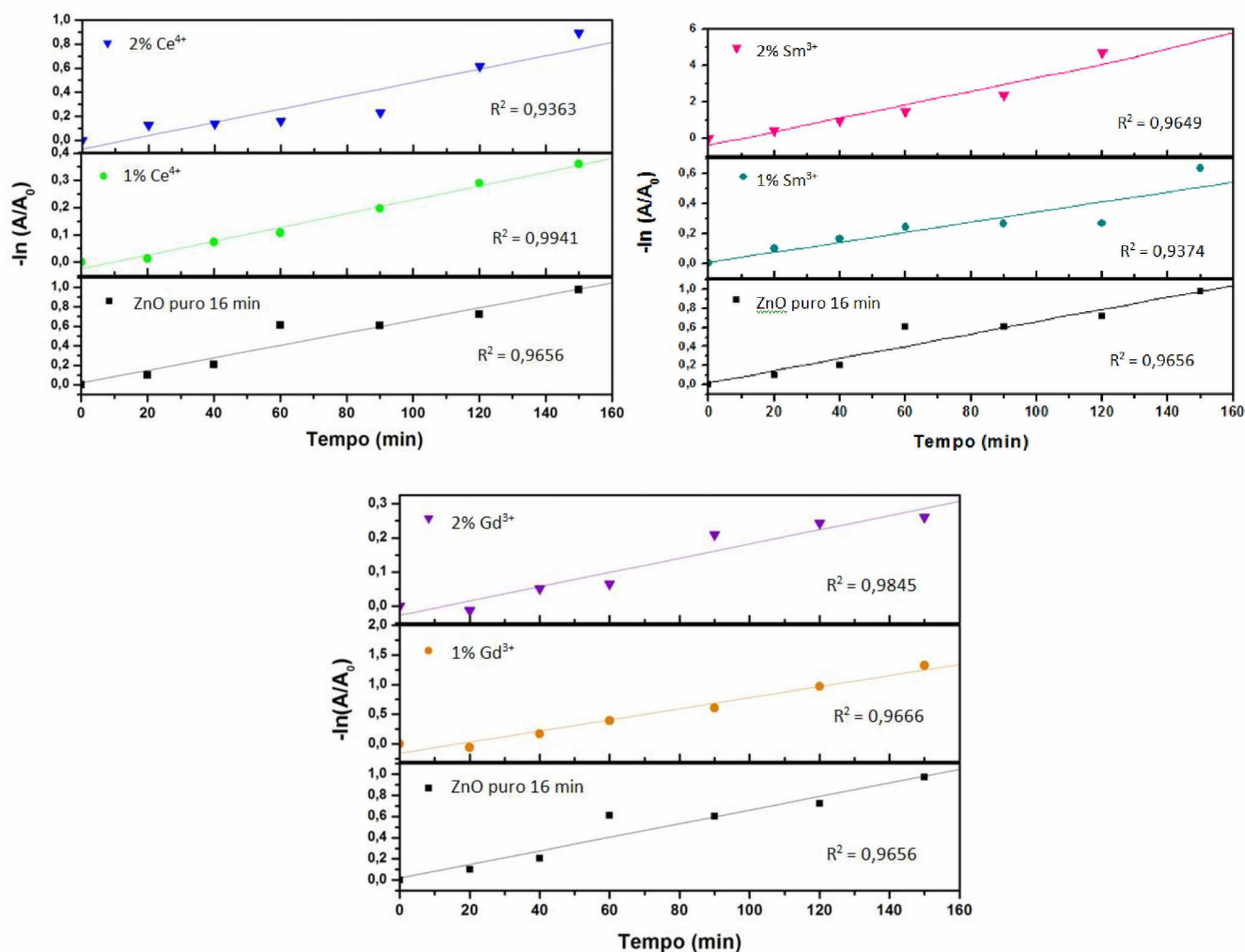
Quando aumenta a concentração de íons Sm^{3+} de 1% para 2% em mol, há uma quantidade maior de íons Sm^{3+} disponíveis para capturar os elétrons na superfície da banda de condução do ZnO, evitando assim, a rápida recombinação do par elétron-buraco. A presença da fase secundária $Sm(OH)_3$ na amostra dopada com 2% em mol de Sm^{3+} pode ter influenciado a excelente eficiência de fotodescoloração da amostra, como relatado na literatura. Y. Lixiong *et. al* (2015) descreveram a formação de compósitos $Sm(OH)_3$ -ZnO e em comparação com as amostras de ZnO e $Sm(OH)_3$ puras e observaram que os compósitos exibiram uma melhor atividade fotocatalítica, devido à formação dessas heterojunções eficientes.

Na dopagem com íons Gd^{3+} , na concentração de 1% em mol apresentou maior eficiência fotocatalítica quando comparada com a concentração de 2% em mol (73% de

descoloração). Nessa concentração, os íons Gd^{3+} capturam melhor os elétrons, suprimindo a recombinação do par elétron-buraco, aumentando a eficiência fotocatalítica. A dopagem com íons Ce^{4+} não melhorou significativamente a atividade fotocatalítica das amostras quando comparado ao ZnO puro; a separação de cargas não ocorreu de forma muito eficiente.

As relações lineares entre $\ln(A/A_0)$ e o tempo de irradiação são mostrados na Figura 38 e as constantes aparentes k calculadas são apresentadas na Tabela 23.

Figura 38. A descoloração de AM mediada pelos catalisadores ZnO puro, 1% em mol e 2% em mol de Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} preparados pelo método hidrotérmico de micro-ondas durante 16 min, ajustados de acordo com uma cinética de pseudo-primeira ordem.



Fonte: o Autor (2017).

Tabela 23. Constante aparente de velocidade k calculada para os diferentes catalisadores preparados pelo método hidrotérmico de micro-ondas durante 16 minutos.

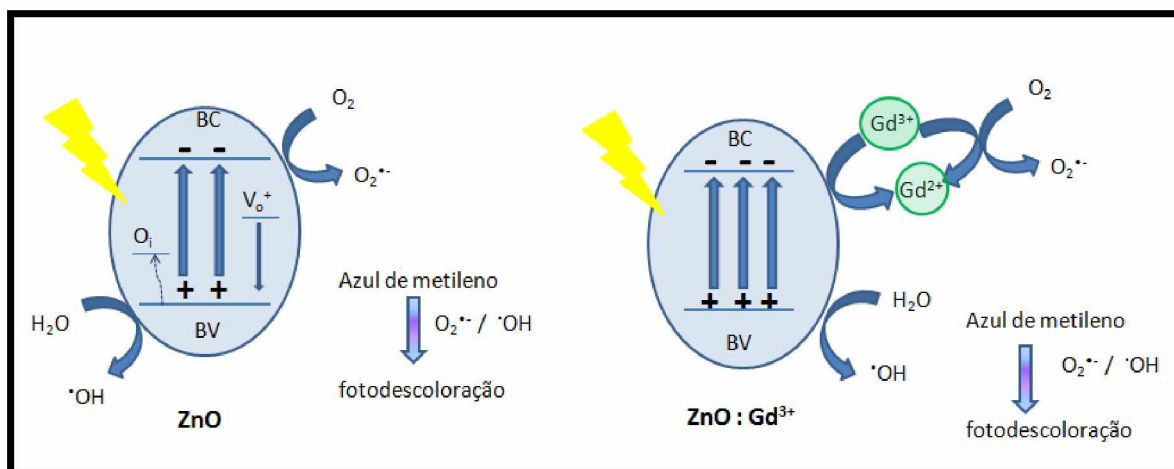
Amostras	k (min^{-1})
ZnO Puro	0,0065
1% Ce^{4+}	0,0024
2% Ce^{4+}	0,0059
1% Sm^{3+}	0,0034
2% Sm^{3+}	0,036
1% Gd^{3+}	0,0093
2% Gd^{3+}	0,0021

Fonte: o Autor (2017).

Os resultados confirmaram a melhora da atividade fotocatalítica com a dopagem de 1% em mol de Gd^{3+} e 2% em mol de Sm^{3+} quando comparados à amostra pura.

O possível mecanismo descritivo da fotodescoloração do azul de metileno na presença do catalisador ZnO puro e dopado com Gd^{3+} , por exemplo, é apresentado na Figura 39. Para a amostra pura, as vacâncias de oxigênio irão na atuar captura dos elétrons, retardando a recombinação do par elétron-buraco. Já as amostras dopadas, por exemplo, o íon Gd^{3+} é capaz de aprisionar os elétrons de forma mais eficiente, gerando espécies Gd^{2+} instáveis que reagem com O_2 gerando o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Por outro lado, os buracos fotoinduzidos reagem com a H_2O adsorvida na superfície do ZnO gerando os radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$). Ambas as espécies radicalares são responsáveis pela degradação dos contaminantes orgânicos (KHATAEE *et al.*, 2015; LIANG *et al.*, 2015; AKIR *et al.*, 2016).

Figura 39. Esquema proposto para a fotodegradação de azul de metileno utilizando ZnO puro e dopado com Gd^{3+} sob irradiação UV-Vis.



Fonte: o Autor (2017).

Vale a pena notar a eficácia do método hidrotérmico de micro-ondas utilizado neste trabalho em produzir nanoestruturas de ZnO puro e dopado com os íons: Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} em condições mais brandas de temperatura e em tempos de reação mais curtos, quando comparado com outros métodos encontrados na literatura, tais como o hidrotérmico convencional, método de decomposição térmica e sínteses por combustão (OPREA *et al.*, 2012; FAISAL *et al.*, 2013; CHANG, LIN e HSU, 2014; ÖKTE, 2014; AHMAD *et al.*, 2015; LIANG *et al.*, 2015; THANGARAJ *et al.*, 2015). Portanto, acredita-se que a presença de defeitos estruturais de superfície nos produtos finais influencia nas propriedades fotoluminescentes (resulta em emissões visíveis) e nas promissoras propriedades fotocatalíticas na fotodegradação do corante azul de metileno.

5. CONCLUSÕES

As nanoestruturas de ZnO puro e dopado com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} foram obtidas com sucesso pelo método hidrotérmico de micro-ondas sob baixa temperatura de síntese e em curto período de reação. O método hidrotérmico de micro-ondas é simples e fácil de ser operado, permite uma nucleação homogênea das partículas, sendo também ambientalmente correto para preparar rapidamente nanoestruturas de ZnO puro e dopado com os íons TR com forma e tamanho controláveis.

Os resultados de DRX e refinamento Rietveld indicaram alta cristalinidade e periodicidade a longo alcance das amostras obtidas. Pelo método de refinamento Rietveld foi possível determinar os parâmetros de rede das nanoestruturas e os coeficientes de confiabilidade, exibindo resultados confiáveis e com credibilidade para um bom refinamento. Com a inserção dos íons terras raras na rede cristalina do ZnO foi observado um aumento nos parâmetros de rede e uma expansão da cela unitária.

Por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo MEV-FEG verificou-se o papel fundamental do tempo de síntese na formação das nanoestruturas de ZnO puro e dopado com os íons TR. As amostras sintetizadas em 2 minutos apresentaram partículas com formas arredondadas a triangulares e com a mudança no tempo de síntese para 16 minutos, observou uma morfologia na forma de placas ligeiramente aglomeradas com espessura em torno de 35 nm. Os espectros EDX confirmaram a composição das amostras, verificando a presença dos elementos dopantes Ce, Sm e Gd.

As medidas de reflectância difusa possibilitou estimar a energia de *band gap* dos materiais, e não houve diferenças significativas nesses valores com a inserção dos íons dopantes na rede do ZnO.

Pela análise dos espectros Raman, as amostras de ZnO puro e dopados com íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} apresentaram o modo E_2^{high} em 438 cm^{-1} característico da estrutura hexagonal do tipo wurtzita do ZnO. As amostras dopadas com 2% em mol de Ce^{4+} apresentou a formação da segunda fase CeO_2 . A formação de fase secundária $\text{Sm}(\text{OH})_3$ foi observada para a amostra dopada com 2% em mol de Sm^{3+} no tempo de 16 minutos, consistente com os resultados de DRX. Os valores de largura à meia altura mostram que a dopagem origina perturbações na rede cristalina e os maiores valores são apresentados para a dopagem com íons Ce^{4+} , o que indica um maior grau de desordem estrutural a curto alcance.

Todas as amostras apresentaram promissoras propriedades fotoluminescentes com banda larga na região visível do espectro e emissão máxima na região verde-laranja do espectro visível. A variação no tempo de síntese (2 e 16 minutos) influenciou as propriedades fotoluminescentes dos materiais. Para as amostras obtidas em 16 minutos, na dopagem com 2% em mol de TR apresentaram uma melhor organização estrutural a curto-médio alcance, o que não foi observado para as amostras sintetizadas a 2 minutos.

A variação no tempo de síntese hidrotérmica de micro-ondas das nanoestruturas de ZnO puro e dopado com os íons TR, gerou mudanças na atividade fotocatalítica. Em geral, as amostras sintetizadas no tempo de 16 minutos apresentaram uma maior eficiência de descoloração do azul de metileno. O melhor desempenho das amostras na forma de placas pôde ser explicado, conjuntamente a um maior valor de área superficial em relação às amostras obtidas em 2 minutos, visto que essas amostras apresentam uma morfologia irregular e aglomerada.

As amostras que apresentaram melhor atividade fotocatalítica frente à degradação do corante azul de metileno foram as seguintes amostras: 1% em mol de Gd^{3+} 16 min, 2% em mol de Gd^{3+} 2 min e 2% em mol de Sm^{3+} 16 min, com 73%, 65% e 100% de fotodescoloração, respectivamente.

Em vista dos argumentos apresentados, constata-se a eficiência do método hidrotérmico de micro-ondas na obtenção dos nanomateriais, com propriedades fotoluminescentes e fotocatalíticas promissoras sob condições mais amenas de temperatura e tempo de reação, quando comparado principalmente com método hidrotérmico convencional.

Portanto, este trabalho mostra que a inserção dos íons cério, samário e gadolínio na estrutura cristalina do óxido de zinco, juntamente com a variação do tempo de síntese hidrotérmica, promovem modificações nas propriedades estruturais, eletrônicas, morfológicas, fotoluminescentes e fotocatalíticas do ZnO.

6. PERSPECTIVAS

Para as amostras de ZnO puro e dopado com os íons Ce^{4+} , Sm^{3+} e Gd^{3+} obtidas pelo método hidrotérmico de micro-ondas, pretende-se:

- Realizar novas sínteses para obtenção das amostras de ZnO co-dopado com Sm^{3+} e Gd^{3+} ; Fe^{3+} e Gd^{3+} ; Eu^{3+} e Gd^{3+} para os estudos das propriedades ópticas e fotocatalíticas.
- Sintetizar ZnO dopado com não-metais, como carbono (C), nitrogênio (N) e enxofre (S), de modo a otimizar a aplicação em fotocatalise solar e UV-vis.
- Simular os materiais dopados com a presença de defeitos estruturais intrínsecos do ZnO e o dopante no interstício para avaliar a influência deles nas propriedades ópticas e magnéticas do óxido.
- Avaliar a atividade fotocatalítica dos materiais frente à degradação de outros corantes orgânicos.

7. REFERÊNCIAS

ABI-AAD, E.; BECHARA, R.; GRIMBLOT, J.; ABOUKAIS, A. Preparation and characterization of ceria under an oxidizing atmosphere. Thermal analysis, XPS, and EPR study. **Chemistry of Materials**, v. 5, p. 793-797, 1993.

ABRÃO, A. **Química e tecnologia das terras-raras**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: CETEM - Centro de Tecnologia Mineral - CNPq, 1994. 212p.

ACHOURI, F.; CORBEL, S.; BALAN, L.; MOZET, K.; GIROT, E.; MEDJAHDI, G.; BEN SAID, M.; GHRABI, A.; SCHNEIDER, R. Porous Mn-doped ZnO nanoparticles for enhanced solar and visible light photocatalysis. **Materials & Design**, v. 101, p. 309-316, 2016.

AGGARWAL, N.; KAUR, K.; VASISHTH, A.; VERMA, N. K. Structural, optical and magnetic properties of Gadolinium-doped ZnO nanoparticles. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, p. 1-6, 2016.

AHMAD, M.; AHMED, E.; HONG, Z. L.; KHALID, N. R.; AHMED, W.; ELHISSI, A. Graphene-Ag/ZnO nanocomposites as high performance photocatalysts under visible light irradiation. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 577, p. 717-727, 2013.

AHMAD, M.; AHMED, E.; ZAFAR, F.; KHALID, N. R.; NIAZ, N. A.; HAFEEZ, A.; IKRAM, M.; KHAN, M. A.; HONG, Z. L. Enhanced photocatalytic activity of Ce-doped ZnO nanopowders synthesized by combustion method. **Journal of Rare Earths**, v. 33, p. 255-262, 2015.

AHMED, F.; ARSHI, N.; ANWAR, M. S.; DANISH, R.; KOO, B. H. Morphological evolution of ZnO nanostructures and their aspect ratio-induced enhancement in photocatalytic properties. **RSC Advances**, v. 4, p. 29249-29263, 2014.

AKHOON, S. A.; RUBAB, S.; SHAH, M. A. A benign hydrothermal synthesis of nanopencils-like zinc oxide nanoflowers. **International Nano Letters**, v. 5, p. 9-13, 2015.

AKIR, S.; BARRAS, A.; COFFINIER, Y.; BOUOUDINA, M.; BOUKHERROUB, R.; OMRANI, A. D. Eco-friendly synthesis of ZnO nanoparticles with different morphologies and their visible light photocatalytic performance for the degradation of Rhodamine B. **Ceramics International**, v. 42, p. 10259-10265, 2016.

ALVI, N. H.; WILLANDER, M.; NUR, O. The effect of the post-growth annealing on the electroluminescence properties of n-ZnO nanorods/p-GaN light emitting diodes. **Superlattices and Microstructures**, v. 47, p. 754-761, 2010.

AMGARTEN, D. R. **Determinação do volume específico de poros de sílicas cromatográficas por dessorção de líquidos em excesso**. 2006. 80 (Dissertação de mestrado). Instituto de Química, Universidade estadual de campinas - UNICAMP, Campinas, SP.

ANICETE-SANTOS, M.; ORHAN, E.; DE MAURERA, M. A. M. A.; SIMÕES, L. G. P.; SOUZA, A. G.; PIZANI, P. S.; LEITE, E. R.; VARELA, J. A.; ANDRÉS, J.; BELTRÁN, A.; LONGO, E. Contribution of structural order-disorder to the green photoluminescence of PbWO₄. **Physical Review B**, v. 75, p. 165105, 2007.

ASSADI, M. H. N.; ZHANG, Y.; ZHENG, R.-K.; RINGER, S. P.; LI, S. Structural and electronic properties of Eu- and Pd-doped ZnO. **Nanoscale Research Letters**, v. 6, 2011.

BARBOZA, A. C. R. N.; CRUZ, C. V. M. S.; GRAZIANI, M. B.; LORENZETTI, M. C. F.; SABADINI, E. Aquecimento em forno de microondas / desenvolvimento de alguns conceitos fundamentais. **Química Nova**, v. 24, p. 901-904, 2001.

BARUAH, S.; DUTTA, J. Hydrothermal growth of ZnO nanostructures. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 10, 2009.

Bases de estruturas cristalinas - Portal Periodicos CAPES.
<http://bdec.dotlib.com.br/cliente/login> , acessado no período de 2014-2016.

BERGER, D. **Efeito da pressão na obtenção e nas propriedades óticas e sensoras de filmes finos à base de SnO_2 com a adição de ZnO** . 2013. 105p (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade estadual paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP, Araraquara - SP.

BESSEKHOUD, Y.; ROBERT, D.; WEBER, J. V. Photocatalytic activity of $\text{Cu}_2\text{O}/\text{TiO}_2$, $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ and $\text{ZnMn}_2\text{O}_4/\text{TiO}_2$ heterojunctions. **Catalysis Today**, v. 101, p. 315-321, 2005.

BISH, D. L.; HOWARD, S. A. Quantitative phase analysis using the Rietveld method. **Journal of Applied Crystallography**, v. 21, p. 86-91, 1988.

BLASSE, G.; GRABMAIER, B. C. **Luminescent materials**. Berlin; New York: Springer-Verlag, 1994.

BLIN, J.-L.; STÉBÉ, M.-J.; ROQUES-CARMES, T. Use of ordered mesoporous titania with semi-crystalline framework as photocatalyst. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 407, p. 177-185, 2012.

BOUJNAH, M.; BOUMDIYAN, M.; NAJI, S.; BENYOUSSEF, A.; EL KENZ, A.; LOULIDI, M. High efficiency of transmittance and electrical conductivity of V doped ZnO used in solar cells applications. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 671, p. 560-565, 2016.

BRILLAS, E. A review on the degradation of organic pollutants in waters by UV photoelectro-Fenton and solar photoelectro-Fenton. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 393-417, 2014.

BRITO, H. F.; HÖLSÄ, J.; LAAMANEN, T.; LASTUSAARI, M.; MALKAMÄKI, M.; RODRIGUES, L. C. V. Persistent luminescence mechanisms: human imagination at work. **Optical Materials Express**, v. 2, p. 371-381, 2012.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, p. 309-319, 1938.

BURUNGALE, V. V.; SATALE, V. V.; MORE, A. J.; SHARMA, K. K. K.; KAMBLE, A. S.; KIM, J. H.; PATIL, P. S. Studies on effect of temperature on synthesis of hierarchical TiO₂ nanostructures by surfactant free single step hydrothermal route and its photoelectrochemical characterizations. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 470, p. 108-116, 2016.

CANHAM, L. T. Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution of wafers. **Applied Physics Letters**, v. 57, p. 1046-1048, 1990.

CAO, S.; ZENG, W.; LONG, H.; ZHANG, H. Hydrothermal synthesis of novel flower-needle NiO architectures: Structure, growth and gas response. **Materials Letters**, v. 159, p. 385-388, 2015.

CASALI, G. P.; MAZZO, T.; LONGO, E.; MUCCILLO, R. Síntese e propriedades fotoluminescentes do óxido de cério dopado com magnésio. **Cerâmica**, v. 60, p. 371-378, 2014.

CAVALCANTE, L. S.; GURGEL, M. F. C.; SIMÕES, A. Z.; LONGO, E.; VARELA, J. A.; JOYA, M. R.; PIZANI, P. S. Intense visible photoluminescence in Ba(Zr_{0.25}Ti_{0.75})O₃ thin films. **Applied Physics Letters**, v. 90, p. 011901, 2007.

CAVALCANTE, L. S.; SCZANCOSKI, J. C.; LI, M. S.; LONGO, E.; VARELA, J. A. beta-ZnMoO₄ microcrystals synthesized by the surfactant-assisted hydrothermal method: Growth process and photoluminescence properties. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 396, p. 346-351, 2012.

CAVALCANTE, L. S.; SIMÕES, A. Z.; ESPINOSA, J. W. M.; SANTOS, L. P. S.; LONGO, E.; VARELA, J. A.; PIZANI, P. S. Study of structural evolution and photoluminescent properties at room temperature of Ca(Zr,Ti)O₃ powders. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 464, p. 340-346, 2008.

CHAKRABARTI, S.; DUTTA, B. K. Photocatalytic degradation of model textile dyes in wastewater using ZnO as semiconductor catalyst. **Journal of Hazardous Materials**, v. 112, p. 269-278, 2004.

CHANG, C.-J.; LIN, C.-Y.; CHEN, J.-K.; HSU, M.-H. Ce-doped ZnO nanorods based low operation temperature NO₂ gas sensors. **Ceramics International**, v. 40, p. 10867-10875, 2014.

CHANG, C.-J.; LIN, C.-Y.; HSU, M.-H. Enhanced photocatalytic activity of Ce-doped ZnO nanorods under UV and visible light. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, p. 1954-1963, 2014.

CHANG, J.; WACLAWIK, E. R. Facet-controlled self-assembly of ZnO nanocrystals by non-hydrolytic aminolysis and their photodegradation activities. **CrystEngComm**, v. 14, p. 4041-4048, 2012.

CHANG, Y.-C. Temperature-dependence cathodoluminescence of ultra-sharp ZnO nanopagoda arrays. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 617, p. 16-20, 2014.

CHAUHAN, M.; KUMAR, R.; UMAR, A.; CHAUHAN, S.; KUMAR, G.; FAISAL, M.; HWANG, S.; AL-HAJRY, A. Utilization of ZnO nanocones for the photocatalytic degradation of acridine orange. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 11, p. 4061-4066, 2011.

CHAWL, S.; SAROHA, M.; KOTNALA, R. K. White light emitting magnetic ZnO:Sm nanoparticles prepared by inclusive Co-precipitation synthesis. **Electronic Materials Letters**, v. 10, p. 73-80, 2014.

CHEN, S.; HAO, X.; LIANG, X.; ZHANG, Q.; ZHANG, C.; ZHOU, G.; SHEN, S.; JIA, G.; ZHANG, J. Inorganic Nanomaterials as Carriers for Drug Delivery. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, p. 1-27, 2016.

CHEN, Y.-C.; LO, S.-L. Effects of operational conditions of microwave-assisted synthesis on morphology and photocatalytic capability of zinc oxide. **Chemical Engineering Journal**, v. 170, p. 411-418, 2011.

CHENG, H. M.; CHIU, W. H.; LEE, C. H.; TSAI, S. Y.; HSIEH, W. F. Formation of Branched ZnO Nanowires from Solvothermal Method and Dye-Sensitized Solar Cells Applications. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, p. 16359-16364, 2008.

CULLITY, B. D.; WEYMOUTH, J. W. Elements of X-ray Diffraction. **American Journal of Physics**, v. 25, p. 394-395, 1957.

DA SILVA, L. F.; AVANSI, W.; MOREIRA, M. L.; MESQUITA, A.; MAIA, L. J. Q.; ANDRES, J.; LONGO, E.; MASTELARO, V. R. Relationship between Crystal Shape, Photoluminescence, and Local Structure in SrTiO₃ Synthesized by Microwave-Assisted Hydrothermal Method. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

DA SILVA, L. F.; CATTO, A. C.; AVANSI JR, W.; CAVALCANTE, L. S.; MASTELARO, V. R.; ANDRÉS, J.; AGUIR, K.; LONGO, E. Acetone gas sensor based on α -Ag₂WO₄ nanorods obtained via a microwave-assisted hydrothermal route. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 683, p. 186-190, 2016.

DAKHLAOUI, A.; JENDOUBI, M.; SMIRI, L. S.; KANAIEV, A.; JOUINI, N. Synthesis, characterization and optical properties of ZnO nanoparticles with controlled size and morphology. **Journal of Crystal Growth**, v. 311, p. 3989-3996, 2009.

DAMEN, T. C.; PORTO, S. P. S.; TELL, B. Raman Effect in Zinc Oxide. **Physical Review**, v. 142, p. 570-574, 1966.

DAN, W.; JIANFENG, H.; LIXIONG, Y.; HAIBO, O.; JIAYIN, L.; JIANPENG, W. Facile synthesis and enhanced photocatalytic activity of Sm(OH)₃ nanorods. **RSC Advances**, v. 4, p. 44491-44494, 2014.

DE MOURA, A. P.; LIMA, R. C.; MOREIRA, M. L.; VOLANTI, D. P.; ESPINOSA, J. W. M.; ORLANDI, M. O.; PIZANI, P. S.; VARELA, J. A.; LONGO, E. ZnO architectures synthesized by a microwave-assisted hydrothermal method and their photoluminescence properties. **Solid State Ionics**, v. 181, p. 775-780, 2010.

DE MOURA, A. P.; LIMA, R. C.; PARIS, E. C.; LI, M. S.; VARELA, J. A.; LONGO, E. Formation of beta-nickel hydroxide plate-like structures under mild conditions and their optical properties. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 184, p. 2818-2823, 2011.

DING, K.; WANG, D.; YANG, P.; CHENG, X. Synthesis of anatase titanium dioxide nanocaps via hydrofluoric acid etching towards enhanced photocatalysis. **Materials Research Bulletin**, v. 74, p. 311-318, 2016.

DOS REIS, P. M.; DE OLIVEIRA, A. S.; PECORARO, E.; RIBEIRO, S. J. L.; GOES, M. S.; NASCIMENTO, C. S.; GONCALVES, R. R.; DOS SANTOS, D. P.; SCHIAVON, M. A.; FERRARI, J. L. Photoluminescent and structural properties of ZnO containing Eu^{3+} using PEG as precursor. **Journal of Luminescence**, v. 167, p. 197-203, 2015.

DOS SANTOS, M. L.; LIMA, R. C.; RICCARDI, C. S.; TRANQUILIN, R. L.; BUENO, P. R.; VARELA, J. A.; LONGO, E. Preparation and characterization of ceria nanospheres by microwave-hydrothermal method. **Materials Letters**, v. 62, p. 4509-4511, 2008.

DREXLER, K. E. **Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing and Computation**. California, USA: Jhon Wiley & Sons, Inc, 1992. 547.

DROUILLY, C.; KRAFFT, J. M.; AVERSENG, F.; CASALE, S.; BAZER-BACHI, D.; CHIZALLET, C.; LECOCQ, V.; VEZIN, H.; LAURON-PERNOT, H.; COSTENTIN, G. ZnO Oxygen Vacancies Formation and Filling Followed by in Situ Photoluminescence and in Situ EPR. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, p. 21297-21307, 2012.

ELISEEVA, S. V.; BUENZLI, J.-C. G. Rare earths: jewels for functional materials of the future. **New Journal of Chemistry**, v. 35, p. 1165-1176, 2011.

FAISAL, M.; ISMAIL, A. A.; IBRAHIM, A. A.; BOUZID, H.; AL-SAYARI, S. A. Highly efficient photocatalyst based on Ce doped ZnO nanorods: Controllable synthesis and enhanced photocatalytic activity. **Chemical Engineering Journal**, v. 229, p. 225-233, 2013.

FANG, D.; LI, C.; WANG, N.; LI, P.; YAO, P. Structural and optical properties of Mg-doped ZnO thin films prepared by a modified Pechini method. **Crystal Research and Technology**, v. 48, p. 265-272, 2013.

FARBOD, M.; JAFARPOOR, E. Hydrothermal synthesis of different colors and morphologies of ZnO nanostructures and comparison of their photocatalytic properties. **Ceramics International**, v. 40, p. 6605-6610, 2014.

FAROOQI, M. M. H.; SRIVASTAVA, R. K. Enhanced UV-vis photoconductivity and photoluminescence by doping of samarium in ZnO nanostructures synthesized by solid state reaction method. **Optik**, v. 127, p. 3991-3998, 2016.

FLEMBAN, T. H.; SEQUEIRA, M. C.; ZHANG, Z.; VENKATESH, S.; ALVES, E.; LORENZ, K.; ROQAN, I. S. Identifying the influence of the intrinsic defects in Gd-doped ZnO thin-films. **Journal of Applied Physics**, v. 119, 2016.

FTERICH, M.; BEN NASR, F.; LEFI, R.; TOUMI, M.; GUERMAZI, S. Effect of concentration of hexamethylenetetramine in structure, microstructure and optical properties of CuO nanoparticles synthesized by hydrothermal route. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 43, p. 114-122, 2016.

FUJISHIMA, A.; HONDA, K. Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. **Nature**, v. 238, p. 37-38, 1972.

GÁLICO, D. A. **Síntese e caracterização de complexos de naproxeno com lantanídeos (III) e ítrio (III) no estado sólido com exceção do promécio**. 2014. 94p (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Ciências - Campus Bauru, Universidade estadual paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP, Bauru - SP.

GARCIA, N. Theory of scanning tunneling microscopy and spectroscopy - resolution, image and field states, and thin oxide layers. **Ibm Journal of Research and Development**, v. 30, p. 533-542, 1986.

GIRALDI, T. R.; SANTOS, G. V. F.; DE MENDONCA, V. R.; RIBEIRO, C.; WEBER, I. T. Effect of synthesis parameters on the structural characteristics and photocatalytic activity of ZnO. **Materials Chemistry and Physics**, v. 136, p. 505-511, 2012.

HAFFAD, S.; CICERO, G.; SAMAH, M. Structural and electronic properties of ZnO nanowires: a theoretical study. **Energy Procedia**, v. 10, p. 128-137, 2011.

HEMALATHA, P.; KARTHICK, S. N.; HEMALATHA, K. V.; YI, M.; KIM, H. J.; ALAGAR, M. La-doped ZnO nanoflower as photocatalyst for methylene blue dye degradation under UV irradiation. **Journal of Materials Science-Materials in Electronics**, v. 27, p. 2367-2378, 2016.

HERRMANN, J. M. Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants. **Catalysis Today**, v. 53, p. 115-129, 1999.

HERRMANN, J. M. Heterogeneous photocatalysis: State of the art and present applications. **Topics in Catalysis**, v. 34, p. 49-65, 2005a.

HERRMANN, J. M. Heterogeneous photocatalysis: state of the art and present applications In honor of Pr. R.L. Burwell Jr. (1912–2003), Former Head of Ipatieff Laboratories, Northwestern University, Evanston (Ill). **Topics in Catalysis**, v. 34, p. 49-65, 2005b.

HERRMANN, J. M.; DUCHAMP, C.; KARKMAZ, M.; HOAI, B. T.; LACHHEB, H.; PUZENAT, E.; GUILLARD, C. Environmental green chemistry as defined by photocatalysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 146, p. 624-629, 2007.

HOFFMANN, M. R.; MARTIN, S. T.; CHOI, W. Y.; BAHNEMANN, D. W. Environmental applications of semiconductor photocatalysis. **Chemical Reviews**, v. 95, p. 69-96, 1995.

HONORATO, A. C.; MACHADO, J. M.; CELANTE, G.; BORGES, W. G. P.; DRAGUNSKI, D. C.; CAETANO, J. Biossorção de azul de metileno utilizando resíduos agroindustriais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, p. 705-710, 2015.

HOUAS, A.; LACHHEB, H.; KSIBI, M.; ELALOUI, E.; GUILLARD, C.; HERRMANN, J. M. Photocatalytic degradation pathway of methylene blue in water. **Applied Catalysis B-Environmental**, v. 31, p. 145-157, 2001.

HU, D.; LIU, X.; DENG, S.; LIU, Y.; FENG, Z.; HAN, B.; WANG, Y.; WANG, Y. Structural and optical properties of Mn-doped ZnO nanocrystalline thin films with the different dopant concentrations. **Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures**, v. 61, p. 14-22, 2014.

HUANG, J. F.; XIA, C. K.; CAO, L. Y.; ZENG, X. R. Facile microwave hydrothermal synthesis of zinc oxide one-dimensional nanostructure with three-dimensional morphology. **Materials Science and Engineering B-Advanced Functional Solid-State Materials**, v. 150, p. 187-193, 2008.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.

ISHIZUMI, A.; FUJITA, S.; YANAGI, H. Influence of atmosphere on photoluminescence properties of Eu-doped ZnO nanocrystals. **Optical Materials**, v. 33, p. 1116-1119, 2011.

JANITABAR-DARZI, S. Structural and Photocatalytic Activity of Mesoporous N-Doped TiO₂ with Band-to-Band Visible Light Absorption Ability. **Particulate Science and Technology**, v. 32, p. 506-511, 2014.

JANOTTI, A.; VAN DE WALLE, C. G. Native point defects in ZnO. **Physical Review B**, v. 76, p. 165202, 2007.

JANOTTI, A.; VAN DE WALLE, C. G. Fundamentals of zinc oxide as a semiconductor. **Reports on Progress in Physics**, v. 72, p. 1-29, 2009.

JANSEN, E.; SCHAFER, W.; WILL, G. R values in analysis of powder diffraction data using Rietveld refinement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 27, p. 492-496, 1994.

JIANG, J. Y.; LI, Y. F.; TAN, S. W.; HUANG, Z. Y. Synthesis of zinc oxide nanotetrapods by a novel fast microemulsion-based hydrothermal method. **Materials Letters**, v. 64, p. 2191-2193, 2010.

JIAO, M.; NGUYEN VIET, C.; NGUYEN VAN, D.; NGUYEN DUC, H.; NGUYEN VAN, H.; HJORT, K.; HUGO, N. On-chip hydrothermal growth of ZnO nanorods at low temperature for highly selective NO₂ gas sensor. **Materials Letters**, v. 169, p. 231-235, 2016.

JOHNSON, K.; SANDOE, J. Solvent LiCl-KCl in the nephelauxetic series for trivalent rare earths. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 46, p. 3457-3462, 1968.

JUNG, Y.-I.; NOH, B.-Y.; LEE, Y.-S.; BAEK, S.-H.; KIM, J. H.; PARK, I.-K. Visible emission from Ce-doped ZnO nanorods grown by hydrothermal method without a post thermal annealing process. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, p. 43-43, 2012.

KAJBAFVALA, A.; GHORBANI, H.; PARAVAR, A.; SAMBERG, J. P.; KAJBAFVALA, E.; SADRNEZHAAD, S. K. Effects of morphology on photocatalytic performance of Zinc oxide nanostructures synthesized by rapid microwave irradiation methods. **Superlattices and Microstructures**, v. 51, p. 512-522, 2012.

KANG, J.-G.; MIN, B.-K.; SOHN, Y. Synthesis and characterization of $\text{Sm}(\text{OH})_3$ and Sm_2O_3 nanoroll sticks. **Journal of Materials Science**, v. 50, p. 1958-1964, 2015.

KANNADASAN, N.; SHANMUGAM, N.; CHOLAN, S.; SATHISHKUMAR, K.; POONGUZHALI, R.; VIRUTHAGIRI, G. Synergistic effect of bimetal ions (Ce, Pb) incorporation on optical, structural, and sensory activity of ZnO nanocrystals. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 19, p. 757-768, 2015.

KAUR, P.; KUMAR, S.; CHEN, C. L.; HSU, Y.-Y.; CHAN, T.-S.; DONG, C.-L.; SRIVASTAVA, C.; SINGH, A.; RAO, S. M. Investigations on structural, magnetic and electronic structure of Gd-doped ZnO nanostructures synthesized using sol-gel technique. **Applied Physics A**, v. 122, p. 1-8, 2016.

KHATAEE, A.; SOLTANI, R. D. C.; KARIMI, A.; JOO, S. W. Sonocatalytic degradation of a textile dye over Gd-doped ZnO nanoparticles synthesized through sonochemical process. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 219-230, 2015.

KIM, B. Y.; YUN, J.-I. Optical absorption and fluorescence properties of trivalent lanthanide chlorides in high temperature molten LiCl-KCl eutectic. **Journal of Luminescence**, v. 178, p. 331-339, 2016.

KIOMARSIPOUR, N.; RAZAVI, R. S. Characterization and optical property of ZnO nano-, submicro- and microrods synthesized by hydrothermal method on a large-scale. **Superlattices and Microstructures**, v. 52, p. 704-710, 2012.

KODAIRA, C. A. **Síntese e Espectroscopia de Sistema envolvendo Tungstato e íons Terras Raras**. 2003. 177p (Tese de Doutorado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, SP.

KOMARNENI, S.; KATSUKI, H. Nanophase materials by a novel microwave-hydrothermal process. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 1537-1543, 2002.

KOMARNENI, S.; KATSUKI, H. Microwave-hydrothermal synthesis of barium titanate under stirring condition. **Ceramics International**, v. 36, p. 1165-1169, 2010.

KOMARNENI, S.; ROY, R.; LI, Q. H. Microwave-hydrothermal synthesis of ceramic powders. **Materials Research Bulletin**, v. 27, p. 1393-1405, 1992.

KORZHIK, M. V.; PAVLENKO, V. B.; TIMOSCHENKO, T. N.; KATCHANOV, V. A.; SINGOVSKII, A. V.; ANNENKOV, A. N.; LIGUN, V. A.; SOLSKII, I. M.; PEIGNEUX, J. P. Spectroscopy and Origin of Radiation Centers and Scintillation in PbWO_4 Single Crystals. **physica status solidi (a)**, v. 154, p. 779-788, 1996.

KRUK, M.; JARONIEC, M. Gas Adsorption Characterization of Ordered Organic-Inorganic Nanocomposite Materials. **Chemistry of Materials**, v. 13, p. 3169-3183, 2001.

KUBELKA, P.; MUNK, F. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. **Zeitschrift fuer technische Physik**, v. 12, p. 8, 1931.

KUMAR, R.; KUMAR, G.; AKHTAR, M. S.; UMAR, A. Sonophotocatalytic degradation of methyl orange using ZnO nano-aggregates. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 629, p. 167-172, 2015.

KUMAR, R.; UMAR, A.; KUMAR, G.; AKHTAR, M. S.; WANG, Y.; KIM, S. H. Ce-doped ZnO nanoparticles for efficient photocatalytic degradation of direct red-23 dye. **Ceramics International**, v. 41, p. 7773-7782, 2015.

KUMAR, R. D.; KARUPPUCHAMY, S. Microwave mediated synthesis of nanostructured Co-WO_3 and CoWO_4 for supercapacitor applications. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 674, p. 384-391, 2016.

KUMAR, S.; SINGH, V.; TANWAR, A. Structural, morphological, optical and photocatalytic properties of Ag-doped ZnO nanoparticles. **Journal of Materials Science-Materials in Electronics**, v. 27, p. 2166-2173, 2016.

KUMAR, S. G.; DEVI, L. G. Review on Modified TiO_2 Photocatalysis under UV/Visible Light: Selected Results and Related Mechanisms on Interfacial Charge Carrier Transfer Dynamics. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, p. 13211-13241, 2011.

KUMAR, S. G.; RAO, K. S. R. K. Tungsten-based nanomaterials (WO_3 & Bi_2WO_6): Modifications related to charge carrier transfer mechanisms and photocatalytic applications. **Applied Surface Science**, v. 355, p. 939-958, 2015.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G. D.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, p. 78-82, 2002.

LACHHEB, H.; PUZENAT, E.; HOUAS, A.; KSIBI, M.; ELALOUI, E.; GUILLARD, C.; HERRMANN, J. M. Photocatalytic degradation of various types of dyes (Alizarin S, Crocein Orange G, Methyl Red, Congo Red, Methylene Blue) in water by UV-irradiated titania. **Applied Catalysis B-Environmental**, v. 39, p. 75-90, 2002.

LANG, J. H.; WANG, J. Y.; ZHANG, Q.; LI, X. Y.; HAN, Q.; WEI, M. B.; SUI, Y. R.; WANG, D. D.; YANG, J. H. Chemical precipitation synthesis and significant enhancement in photocatalytic activity of Ce-doped ZnO nanoparticles. **Ceramics International**, v. 42, p. 14175-14181, 2016.

LARSON, A. C.; DREELE, R. B. V. **General Structure Analysis System (GSAS)**. p.86-748. 2000

LASTUSAARI, M.; LAAMANEN, T.; MALKAMÄKI, M.; ESKOLA, K. O.; KOTLOV, A.; CARLSON, S.; WELTER, E.; BRITO, H. F.; BETTINELLI, M.; JUNGNER, H.; HÖLSÄ, J. The Bologna Stone: history's first persistent luminescent material. **European Journal of Mineralogy**, v. 24, p. 885-890, 2012.

LEBEDEV, V. A.; GAVRILOV, A. I.; SHAPOREV, A. S.; IVANOV, V. K.; CHURAGULOV, B. R.; TRET'YAKOV, Y. D. Hydrothermal and hydrothermal-microwave syntheses of oriented nanorods of zinc oxide on an ITO substrate. **Doklady Chemistry**, v. 444, p. 117-119, 2012.

LEE, J. H.; YANG, Y. S. Effect of hydrolysis conditions on morphology and phase content in the crystalline TiO₂ nanoparticles synthesized from aqueous TiCl₄ solution by precipitation. **Materials Chemistry and Physics**, v. 93, p. 237-242, 2005.

LEE, K. M.; LAI, C. W.; NGAI, K. S.; JUAN, J. C. Recent developments of zinc oxide based photocatalyst in water treatment technology: A review. **Water Research**, v. 88, p. 428-448, 2016.

LEI, W.; ZHANG, T.; GU, L.; LIU, P.; RODRIGUEZ, J. A.; LIU, G.; LIU, M. Surface-Structure Sensitivity of CeO₂ Nanocrystals in Photocatalysis and Enhancing the Reactivity with Nanogold. **Acs Catalysis**, v. 5, p. 4385-4393, 2015.

LEITNER, J.; KAMRADEK, M.; SEDMIDUBSKY, D. Thermodynamic properties of rock-salt ZnO. **Thermochimica Acta**, v. 572, p. 1-5, 2013.

LEONELLI, R.; BREBNER, J. L. Time-resolved spectroscopy of the visible emission band in strontium titanate. **Physical Review B**, v. 33, p. 8649-8656, 1986.

LI, D.; HUANG, J.-F.; CAO, L.-Y.; LI, J.-Y.; OUYANG, H.-B.; YAO, C.-Y. Microwave hydrothermal synthesis of Sr²⁺ doped ZnO crystallites with enhanced photocatalytic properties. **Ceramics International**, v. 40, p. 2647-2653, 2014.

LI, X.; LIU, P.; MAO, Y.; XING, M.; ZHANG, J. Preparation of homogeneous nitrogen-doped mesoporous TiO₂ spheres with enhanced visible-light photocatalysis. **Applied Catalysis B-Environmental**, v. 164, p. 352-359, 2015.

LI, X.; ZHOU, X.; LIU, Y.; SUN, P.; SHIMANOE, K.; YAMAZOE, N.; LU, G. Microwave hydrothermal synthesis and gas sensing application of porous ZnO core-shell microstructures. **RSC Advances**, v. 4, p. 32538-32543, 2014.

LIANG, Y.; GUO, N.; LI, L.; LI, R.; JI, G.; GAN, S. Preparation of porous 3D Ce-doped ZnO microflowers with enhanced photocatalytic performance. **Rsc Advances**, v. 5, p. 59887-59894, 2015.

LIBERATTI, V. R.; AFONSO, R.; LUCILHA, A. C.; DA SILVA, P. R. C.; DALL, L. H. Fotocatálise do azul de metileno na presença de óxido de bismuto sob irradiação de luz UV e solar. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 35, p. 55-62, 2014.

LIENHARD, J. H. **A Heat Transfer Textbook**. 4^a Ed. Dover Publications, 2013. 768p.

LIM, K.; HAMID, M. A. A.; SHAMSUDIN, R.; AL-HARDAN, N. H.; MANSOR, I.; CHIU, W. Temperature-Driven Structural and Morphological Evolution of Zinc Oxide Nano-Coalesced Microstructures and Its Defect-Related Photoluminescence Properties. **Materials**, v. 9, 2016.

LIMA, R. C.; MACARIO, L. R.; ESPINOSA, J. W. M.; LONGO, V. M.; ERLO, R.; MARANA, N. L.; SAMBRANO, J. R.; DOS SANTOS, M. L.; MOURA, A. P.; PIZANI, P. S.; ANDRES, J.; LONGO, E.; VARELA, J. A. Toward an understanding of intermediate- and short-range defects in ZnO single crystals. A combined experimental and theoretical study. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, p. 8970-8978, 2008.

LIMA, R. C.; PARIS, E. C.; LEITE, E. R.; ESPINOSA, J. W. M.; SOUZA, A. G.; LONGO, E. Structural order-disorder transformations monitored by X-ray diffraction and photoluminescence. **Journal of Chemical Education**, v. 84, p. 814-817, 2007.

LIMA, S. A. M.; CREMONA, M.; DAVOLOS, M. R.; LEGNANI, C.; QUIRINO, W. G. Electroluminescence of zinc oxide thin-films prepared via polymeric precursor and via sol-gel methods. **Thin Solid Films**, v. 516, p. 165-169, 2007.

LIU, J.; HOSSEINPOUR, P. M.; LUO, S.; HEIMAN, D.; MENON, L.; ARENA, D. A.; LEWIS, L. H. TiO₂ nanotube arrays for photocatalysis: Effects of crystallinity, local order, and electronic structure. **Journal of Vacuum Science & Technology A**, v. 33, 2015.

LIU, M.; PIAO, L.; ZHAO, L.; JU, S.; YAN, Z.; HE, T.; ZHOU, C.; WANG, W. Anatase TiO₂ single crystals with exposed {001} and {110} facets: facile synthesis and enhanced photocatalysis. **Chemical Communications**, v. 46, p. 1664-1666, 2010.

LIU, Z. F.; SHAN, F. K.; SOHN, J. Y.; KIM, S. C.; KIM, G. Y.; LI, Y. X. Photoluminescence of ZnO:Ga Thin Films Fabricated by Pulsed Laser Deposition Technique. **Journal of Electroceramics**, v. 13, p. 183-187, 2004.

LIXIONG, Y.; FEIFEI, W.; JIANZHONG, M.; JIANFENG, H.; XINGANG, K.; DAN, W.; WEI, H. High photocatalytic activity of Sm(OH)₃-ZnO composites synthesized by a facile hydrothermal method. **Materials Letters**, v. 152, p. 109-112, 2015.

LOPES, J. E. M.; OLIVEIRA, M. M.; COSTA, M. D. G. S.; DE FIGUEREDO, G. P.; VASCONCELOS, J. S.; RANGEL, J. H. G. Chemical synthesis and characterization of Nb-ZrO₂. **Ceramics International**, v. 42, p. 861-873, 2016.

LOPES, W. S.; AZEVEDO, M. G. C. D. O.; LEITE, V. D.; SOUSA, J. T.; BURITI, J. S. Degradation of 17 α -ethinylestradiol in water by heterogeneous photocatalysis. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, p. 728-736, 2015.

LUCENA, P. R. D.; PONTES, F. M.; PINHEIRO, C. D.; LONGO, E.; PIZANI, P. S.; LÁZARO, S.; SOUZA, A. G.; SANTOS, I. M. G. D. Fotoluminescência em materiais com desordem estrutural. **Cerâmica**, v. 50, p. 138-144, 2004.

LUCILHA, A. C.; TAKASHIMA, K. Efeitos de agentes oxidantes e oxigênio dissolvido na descoloração do azo corante acid orange 7 por fotólise e fotocatalise. **Química Nova**, v. 32, p. 1399-1404, 2009.

LUO, Y.; WANG, K.; QIAN, Q.; ZHENG, W.; XUE, H.; HUANG, B.; XIAO, L.; CHEN, Q. Fabrication and photocatalytic properties of Gd-doped ZnO nanoparticle-assembled nanorods. **Materials Letters**, v. 149, p. 70-73, 2015.

MACHADO, A. E. H.; FRANCA, M. D.; VELANI, V.; MAGNINO, G. A.; VELANI, H. M. M.; FREITAS, F. S.; MULLER, P. S.; SATTLER, C.; SCHMUCKER, A. Characterization and evaluation of the efficiency of TiO₂/zinc phthalocyanine nanocomposites as photocatalysts for wastewater treatment using solar irradiation. **International Journal of Photoenergy**, v. 2008, p. 1-12, 2008.

MACHADO, T. C. **Degradação fotocatalítica de rosuvastatina em solução aquosa empregando ZnO em suspensão. Cinética, subprodutos e toxicidade.** 2011. 96p (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS.

MAHMOUD, W. E. Synthesis and optical properties of Ce-doped ZnO hexagonal nanoplatelets. **Journal of Crystal Growth**, v. 312, p. 3075-3079, 2010.

MARINHO, J. Z.; MONTES, R. H. O.; DE MOURA, A. P.; LONGO, E.; VARELA, J. A.; MUNOZ, R. A. A.; LIMA, R. C. Rapid preparation of α -FeOOH and α -Fe₂O₃ nanostructures by microwave heating and their application in electrochemical sensors. **Materials Research Bulletin**, v. 49, p. 572-576, 2014.

MARINHO, J. Z.; ROMEIRO, F. C.; LEMOS, S. C. S.; MOTTA, F. V.; RICCARDI, C. S.; LI, M. S.; LONGO, E.; LIMA, R. C. Urea-Based Synthesis of Zinc Oxide Nanostructures at Low Temperature. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

MARINHO, J. Z.; SILVA, R. A. B.; BARBOSA, T. G. G.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A.; LIMA, R. C. Graphite-Composite Electrodes Bulk-Modified with (BiO)₂CO₃ and Bi₂O₃ Plates-Like Nanostructures for Trace Metal Determination by Anodic Stripping Voltammetry. **Electroanalysis**, v. 25, p. 765-770, 2013.

MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C. Terras raras: aplicações industriais e biológicas. **Química Nova**, v. 28, p. 111-117, 2005.

MARY, J. A.; VIJAYA, J. J.; KENNEDY, L. J.; BOUOUDINA, M. Microwave-assisted synthesis, characterization and antibacterial properties of Ce-Cu dual doped ZnO nanostructures. **Optik**, v. 127, p. 2360-2365, 2016.

MELLO, P. H. D. **Estudo teórico sobre corantes catiônicos e possíveis modelos que expliquem a interação com a argila do tipo montmorilonita.** 2006. 118p (Doutorado em Físico-Química). Instituto de Química, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos, SP.

MENDES, P. G.; MOREIRA, M. L.; TEBCHERANI, S. M.; ORLANDI, M. O.; ANDRES, J.; LI, M. S.; DIAZ-MORA, N.; VARELA, J. A.; LONGO, E. SnO₂ nanocrystals synthesized by microwave-assisted hydrothermal method: towards a relationship between structural and optical properties. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, p. 750-757, 2012.

MERESHCHENKO, A. S.; OLSHIN, P. K.; MYASNIKOVA, O. S.; PANOV, M. S.; KOCHEMIROVSKY, V. A.; SKRIPKIN, M. Y.; MOROZ, P. N.; ZAMKOV, M.; TARNOVSKY, A. N. Ultrafast Photochemistry of Copper(II) Monochlorocomplexes in Methanol and Acetonitrile by Broadband Deep-UV-to-Near-IR Femtosecond Transient Absorption Spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 120, p. 1833-1844, 2016.

MHLONGO, G. H.; SHINGANGE, K.; TSHABALALA, Z. P.; DHONGE, B. P.; MAHMOUD, F. A.; MWAKIKUNGA, B. W.; MOTAUNG, D. E. Room temperature ferromagnetism and gas sensing in ZnO nanostructures: Influence of intrinsic defects and Mn, Co, Cu doping. **Applied Surface Science**, v. 390, p. 804-815, 2016.

MICHA, D. N.; PENELLO, G. M.; KAWABATA, R. M. S.; CAMAROTTI, T. "Vendo o invisível": experimentos de visualização do infravermelho feitos com materiais simples e de baixo custo. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 33, p. 01-06, 2011.

MISHRA, B. G.; RAO, G. R. Promoting effect of ceria on the physicochemical and catalytic properties of CeO₂-ZnO composite oxide catalysts. **Journal of Molecular Catalysis a-Chemical**, v. 243, p. 204-213, 2006.

MORKOÇ, H.; OZGUR, U. **Zinc Oxide: Fundamentals, Materials and Device Technology**. Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., 2009. 469.

MOUSSA, H.; GIROT, E.; MOZET, K.; ALEM, H.; MEDJANDI, G.; SCHNEIDER, R. ZnO rods/reduced graphene oxide composites prepared via a solvothermal reaction for efficient sunlight-driven photocatalysis. **Applied Catalysis B-Environmental**, v. 185, p. 11-21, 2016.

MURMU, P. P.; MENDELSBERG, R. J.; KENNEDY, J.; CARDER, D. A.; RUCK, B. J.; MARKWITZ, A.; REEVES, R. J.; MALAR, P.; OSIPOWICZ, T. Structural and photoluminescence properties of Gd implanted ZnO single crystals. **Journal of Applied Physics**, v. 110, 2011.

NAKATA, K.; FUJISHIMA, A. TiO₂ photocatalysis: Design and applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology C-Photochemistry Reviews**, v. 13, p. 169-189, 2012.

NGUYEN DUC, D.; CAO THAI, S.; PHAM VU, L.; NGUYEN HUU, C.; PHAM THE, K.; PHAM THANH, H.; NGO NGOC, H. Magnetic properties of sol-gel synthesized C-doped ZnO nanoparticles. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 668, p. 87-90, 2016.

NISKANEN, M.; KUISMA, M.; CRAMARIUC, O.; GOLOVANOV, V.; HUKKA, T. I.; TKACHENKO, N.; RANTALA, T. T. Porphyrin adsorbed on the (1010) surface of the wurtzite structure of ZnO - conformation induced effects on the electron transfer characteristics. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, p. 17408-17418, 2013.

NOGUEIRA, R. F. P.; JARDIM, W. F. A fotocatalise heterogênea e sua aplicação ambiental. **Química Nova**, v. 21, p. 69-72, 1998.

NUNES, J. M. A.; ESPINOSA, J. W. M.; GURGEL, M. F. C.; PIZANI, P. S.; LEAL, S. H.; SANTOS, M. R. M. C.; LONGO, E. Photoluminescent properties of lead zirconate powders obtained by the polymeric precursor method. **Ceramics International**, v. 38, p. 4593-4599, 2012.

OJHA, A. K.; SRIVASTAVA, M.; KUMAR, S.; HASSANEIN, R.; SINGH, J.; SINGH, M. K.; MATERNY, A. Influence of crystal size on the electron-phonon coupling in ZnO nanocrystals investigated by Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 72, p. 90-96, 2014.

ÖKTE, A. N. Characterization and photocatalytic activity of Ln (La, Eu, Gd, Dy and Ho) loaded ZnO nanocatalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 475, p. 27-39, 2014.

OLIVEIRA, D. F. M.; BATISTA, P. S.; MULLER JR, P. S.; VELANI, V.; FRANÇA, M. D.; DE SOUZA, D. R.; MACHADO, A. E. H. Evaluating the effectiveness of photocatalysts based on titanium dioxide in the degradation of the dye Ponceau 4R. **Dyes and Pigments**, v. 92, p. 563-572, 2012.

OLIVEIRA, L. H. **Influência dos íons Cu^{2+} nas propriedades ópticas dos pós de $(\text{Ca}_{1-x}\text{Cu}_x)\text{TiO}_3$ preparados por métodos químicos**. 2012. 102p (Doutorado em Química Inorgânica). Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

OLIVEIRA, L. H.; DE MOURA, A. P.; MAZZO, T. M.; RAMÍREZ, M. A.; CAVALCANTE, L. S.; ANTONIO, S. G.; AVANSI, W.; MASTELARO, V. R.; LONGO, E.; VARELA, J. A. Structural refinement and photoluminescence properties of irregular cube-like $(\text{Ca}_{1-x}\text{Cu}_x)\text{TiO}_3$ microcrystals synthesized by the microwave-hydrothermal method. **Materials Chemistry and Physics**, v. 136, p. 130-139, 2012.

OPREA, O.; VASILE, O. R.; VOICU, G.; CRACIUN, L.; ANDRONESCU, E. Photoluminescence, magnetic properties and photocatalytic activity of Gd^{3+} doped ZnO nanoparticles. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 7, p. 1757-1766, 2012.

OSMAN, M. A.; EL-SAID, W. A.; OTHMAN, A. A.; ABD-ELRAHIM, A. G. Influence of thermally induced structural and morphological changes, and UV irradiation on photoluminescence and optical absorption behavior of CdS nanoparticles. **Journal of Physics D-Applied Physics**, v. 49, 2016.

OTHMAN, A. A.; ALI, M. A.; IBRAHIM, E. M. M.; OSMAN, M. A. Influence of Cu doping on structural, morphological, photoluminescence, and electrical properties of ZnO nanostructures synthesized by ice-bath assisted sonochemical method. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 683, p. 399-411, 2016.

OZGUR, U.; ALIVOV, Y. I.; LIU, C.; TEKE, A.; RESHCHIKOV, M. A.; DOGAN, S.; AVRUTIN, V.; CHO, S. J.; MORKOC, H. A comprehensive review of ZnO materials and devices. **Journal of Applied Physics**, v. 98, 2005.

PACHECO-TORGAL, F.; JALALI, S. Nanotechnology: Advantages and drawbacks in the field of construction and building materials. **Construction and Building Materials**, v. 25, p. 582-590, 2011.

PAL, U.; SANDOVAL, A.; MADRID, S. I. U.; CORRO, G.; SHARMA, V.; MOHANTY, P. Mixed titanium, silicon, and aluminum oxide nanostructures as novel adsorbent for removal of rhodamine 6G and methylene blue as cationic dyes from aqueous solution. **Chemosphere**, v. 163, p. 142-152, 2016.

PALARD, M.; BALENCIE, J.; MAGUER, A.; HOCHEPIED, J.-F. Effect of hydrothermal ripening on the photoluminescence properties of pure and doped cerium oxide nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 120, p. 79-88, 2010.

PALFI, T.; WOJNAROVITS, L.; TAKACS, E. Mechanism of azo dye degradation in Advanced Oxidation Processes: Degradation of Sulfanilic Acid Azochromotrop and its parent compounds in aqueous solution by ionizing radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 80, p. 462-470, 2011.

PAN, H. Principles on design and fabrication of nanomaterials as photocatalysts for water-splitting. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 584-601, 2016.

PAN, J.; LI, J.; YAN, Z.; ZHOU, B.; WU, H.; XIONG, X. SnO₂@CdS nanowire-quantum dots heterostructures: tailoring optical properties of SnO₂ for enhanced photodetection and photocatalysis. **Nanoscale**, v. 5, p. 3022-3029, 2013.

PAN, L.; MUHAMMAD, T.; MA, L.; HUANG, Z.-F.; WANG, S.; WANG, L.; ZOU, J.-J.; ZHANG, X. MOF-derived C-doped ZnO prepared via a two-step calcination for efficient photocatalysis. **Applied Catalysis B-Environmental**, v. 189, p. 181-191, 2016.

PANDEY, P.; KURCHANIA, R.; HAQUE, F. Z. Structural, diffused reflectance and photoluminescence study of cerium doped ZnO nanoparticles synthesized through simple sol–gel method. **Optik - International Journal for Light and Electron Optics**, v. 126, p. 3310-3315, 2015.

PANDIYARAJAN, T.; MANGALARAJA, R. V.; KARTHIKEYAN, B.; SATHISHKUMAR, P.; MANSILLA, H. D.; CONTRERAS, D.; RUIZ, J. UV-A light-induced photodegradation of Acid Blue 113 in the presence of Sm-doped ZnO nanostructures. **Applied Physics A**, v. 119, p. 487-495, 2015.

PAPOULIS, D.; KOMARNENI, S.; PANAGIOTARAS, D.; STATHATOS, E.; TOLI, D.; CHRISTOFORIDIS, K. C.; FERNANDEZ-GARCIA, M.; LI, H.; YIN, S.; SATO, T.; KATSUKI, H. Halloysite-TiO₂ nanocomposites: Synthesis, characterization and photocatalytic activity. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 132, p. 416-422, 2013.

PATTERSON, E. M.; SHELDEN, C. E.; STOCKTON, B. H. Kubelka-Munk Optical-Properties of a barium-sulfate white reflectante standard. **Applied Optics**, v. 16, p. 729-732, 1977.

PAUFLER, P. R. A. Young (ed.). The Rietveld Method. International Union of Crystallography. Oxford University Press 1993. 298 p. ISBN 0–19–855577–6. **Crystal Research and Technology**, v. 30, p. 494-494, 1995.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRLZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to Spectroscopy**. 4^a ed. Brooks/Cole, 2008.

PHURUANGRAT, A.; KUNTALUE, B.; THONGTEM, S.; THONGTEM, T. Synthesis of cubic CuFe₂O₄ nanoparticles by microwave-hydrothermal method and their magnetic properties. **Materials Letters**, v. 167, p. 65-68, 2016.

PINATTI, I. M.; MAZZO, T. M.; GONCALVES, R. F.; VARELA, J. A.; LONGO, E.; ROSA, I. L. V. CaTiO₃ and Ca_{1-3x}Sm_xTiO₃: Photoluminescence and morphology as a

result of Hydrothermal Microwave Methodology. **Ceramics International**, v. 42, p. 1352-1360, 2016.

PISANI JÚNIOR, R.; TONUCCI, L. R. D. S.; INNOCENTINI, M. D. D. M. Inativação de pseudomonas aeruginosa em resíduos de serviços de saúde por microondas. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 13, p. 284-290, 2008.

QIN, N.; XIANG, Q.; ZHAO, H.; ZHANG, J.; XU, J. Evolution of ZnO microstructures from hexagonal disk to prismoid, prism and pyramid and their crystal facet-dependent gas sensing properties. **CrystEngComm**, v. 16, p. 7062-7073, 2014.

QIU, Y.; CHEN, W.; YANG, S. Facile hydrothermal preparation of hierarchically assembled, porous single-crystalline ZnO nanoplates and their application in dye-sensitized solar cells. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, p. 1001-1006, 2010.

RAFATULLAH, M.; SULAIMAN, O.; HASHIM, R.; AHMAD, A. Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, p. 70-80, 2010.

RAI, P.; KWAK, W.-K.; YU, Y.-T. Solvothermal Synthesis of ZnO Nanostructures and Their Morphology-Dependent Gas-Sensing Properties. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 5, p. 3026-3032, 2013.

RAVELLI, D.; FAGNONI, M.; DONDI, D.; ALBINI, A. Significance of TiO₂ Photocatalysis for Green Chemistry. **Journal of Advanced Oxidation Technologies**, v. 14, p. 40-46, 2011.

REZAEI, M.; HABIBI-YANGJEH, A. Microwave-assisted preparation of Ce-doped ZnO nanostructures as an efficient photocatalyst. **Materials Letters**, v. 110, p. 53-56, 2013.

RICCARDI, C. S.; LIMA, R. C.; DOS SANTOS, M. L.; BUENO, P. R.; VARELA, J. A.; LONGO, E. Preparation of CeO₂ by a simple microwave-hydrothermal method. **Solid State Ionics**, v. 180, p. 288-291, 2009.

RIDHA, N. J.; UMAR, A. A.; ALOSFUR, F.; JUMALI, M. H. H.; SALLEH, M. M. Microwave Assisted Hydrothermal Method for Porous Zinc Oxide Nanostructured-Films. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 13, p. 2667-2674, 2013.

RIETVELD, H. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. **Journal of applied Crystallography**, v. 2, p. 65-71, 1969.

ROHATGI-MUKHERJEE, K. K. **Fundamentals of Photochemistry**. Wiley, 1978. 363p.

ROMEIRO, F. C.; MARINHO, J. Z.; SILVA, A. C. A.; CANO, N. F.; DANTAS, N. O.; LIMA, R. C. Photoluminescence and Magnetism in Mn^{2+} -Doped ZnO Nanostructures Grown Rapidly by the Microwave Hydrothermal Method. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, p. 26222-26227, 2013.

RÓZ, A. L. D.; LEITE, F. D. L.; FERREIRA, M.; JÚNIOR, O. N. D. O. **Nanoestruturas: princípios e aplicações**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 320p.

RUNOWSKI, M.; LIS, S. Synthesis of lanthanide doped $CeF_3:Gd^{3+}$, Sm^{3+} nanoparticles, exhibiting altered luminescence after hydrothermal post-treatment. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 661, p. 182-189, 2016.

SAKATA, M.; COOPER, M. J. An analysis of the Rietveld refinement method. **Journal of Applied Crystallography**, v. 12, p. 554-563, 1979.

SAMADI, M.; ZIRAK, M.; NASERI, A.; KHORASHADIZADE, E.; MOSHFEGH, A. Z. Recent progress on doped ZnO nanostructures for visible-light photocatalysis. **Thin Solid Films**, v. 605, p. 2-19, 2016.

SANCHEZ, C.; DORIA, J.; PAUCAR, C.; HERNANDEZ, M.; MOSQUERA, A.; RODRIGUEZ, J. E.; GOMEZ, A.; BACA, E.; MORAN, O. Nanocrystalline ZnO films prepared via polymeric precursor method (Pechini). **Physica B-Condensed Matter**, v. 405, p. 3679-3684, 2010.

SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 25, p. 660-667, 2002.

SARMIENTO, G. P.; ZELCER, A.; ESPINOSA, M. S.; BABAY, P. A.; MIRENDA, M. Photochemistry of imidazolium cations. Water addition to methylimidazolium ring induced by UV radiation in aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry**, v. 314, p. 155-163, 2016.

SASTRI, V. S.; BÜNZLI, J.-C.; RAO, V. R.; RAYUDU, G. V. S.; PERUMAREDDI, J. R. Introduction. In: (Ed.). **Modern Aspects of Rare Earths and Their Complexes**. Amsterdam: Elsevier, 2003. p.1-72.

ŠĆEPANOVIĆ, M.; GRUJIĆ-BROJČIN, M.; VOJISAVLJEVIĆ, K.; BERNIK, S.; SREČKOVIĆ, T. Raman study of structural disorder in ZnO nanopowders. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 41, p. 914-921, 2010.

SCOTTI, R.; LIMA, E. C.; BENVENUTTI, E. V.; PIATNICKI, C. M. S.; DIAS, S. L. P.; GUSHIKEM, Y.; KUBOTA, L. T. Azul de metileno imobilizado na celulose/TiO₂ e SiO₂/TiO₂: propriedades eletroquímicas e planejamento fatorial. **Química Nova**, v. 29, p. 208-212, 2006.

SERRA, O. A.; CICILLINI, S. A.; ISHIKI, R. R. A new procedure to obtain Eu³⁺ doped oxide and oxosalt phosphors. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 303–304, p. 316-319, 2000.

SERRA, O. A.; LIMA, J. F.; DE SOUSA FILHO, P. C. A Luz e as Terras Raras. **Revista Virtual de Química**, v. 7, p. 242-266, 2015.

SHACKELFORD, J. F. **Ciências dos Materiais**. 6ª Ed. São Paulo, Brasil: Pearson Prentice Hall, 2008. p. 575.

SHARMA, D.; SHARMA, S.; KAITH, B. S.; RAJPUT, J.; KAUR, M. Synthesis of ZnO nanoparticles using surfactant free in-air and microwave method. **Applied Surface Science**, v. 257, p. 9661-9672, 2011.

SHI, Q.; WANG, C.; LI, S.; WANG, Q.; ZHANG, B.; WANG, W.; ZHANG, J.; ZHU, H. Enhancing blue luminescence from Ce-doped ZnO nanophosphor by Li doping. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, p. 1-7, 2014.

SHINGANGE, K.; TSHABALALA, Z. P.; DHONGE, B. P.; NTWAEABORWA, O. M.; MOTAUNG, D. E.; MHLONGO, G. H. OD to 3D ZnO nanostructures and their luminescence, magnetic and sensing properties: Influence of pH and annealing. **Materials Research Bulletin**, v. 85, p. 52-63, 2017.

SHIRSATH, S. E.; JADHAV, S. S.; TOKSHA, B. G.; PATANGE, S. M.; JADHAV, K. M. Influence of Ce^{4+} ions on the structural and magnetic properties of NiFe_2O_4 . **Journal of Applied Physics**, v. 110, p. 013914, 2011.

SHOJAEE, N.; EBADZADEH, T.; AGHAEI, A. Effect of concentration and heating conditions on microwave-assisted hydrothermal synthesis of ZnO nanorods. **Materials Characterization**, v. 61, p. 1418-1423, 2010.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica**. 4ª Ed. Porto Alegre - RS: Bookman, 2008. 847p.

SONG, L.; JIANG, Q.; DU, P.; YANG, Y.; XIONG, J. A facile synthesis of novel ZnO structures and their applications in photocatalysis. **Materials Letters**, v. 123, p. 214-216, 2014.

SOUSA, R. B.; NASCIMENTO, V. A.; MATOS, J. M. E.; LIMA, C. L.; SANTOS, C. M.; SANTOS, M. R. M. C. Síntese, caracterização e propriedade fotoluminescente de tungstato de bário puro e dopado com hólmio. **Cerâmica**, v. 61, p. 224-235, 2015.

SOUZA, A. E.; SANTOS, G. T. A.; SILVA, R. A.; MOREIRA, M. L.; VOLANTI, D. P.; PARIS, E. C.; TEIXEIRA, S. R.; LONGO, E. Morphological and Structural changes of $\text{Ca}_x\text{Sr}_{1-x}\text{TiO}_3$ Powders Obtained by the Microwave-Assisted Hydrothermal Method. **International Journal of Applied Ceramic Technology**, v. 9, p. 186-192, 2012.

SRDIĆ, V. V.; WINTERER, M. Aluminum-Doped Zirconia Nanopowders: Chemical Vapor Synthesis and Structural Analysis by Rietveld Refinement of X-ray Diffraction Data. **Chemistry of Materials**, v. 15, p. 2668-2674, 2003.

SRIKANTH, C. K.; JEEVANANDAM, P. Effect of anion on the homogeneous precipitation of precursors and their thermal decomposition to zinc oxide. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 486, p. 677-684, 2009.

STUDENIKIN, S. A.; GOLEGO, N.; COCIVERA, M. Fabrication of green and orange photoluminescent, undoped ZnO films using spray pyrolysis. **Journal of Applied Physics**, v. 84, p. 2287-2294, 1998.

SU, Y. L.; ZHANG, Q. Y.; PU, C. Y.; TANG, X.; ZHAO, J. J. First-principles study on the lattice dynamics of the layered ZnO in comparison with the wurtzite structure. **Solid State Communications**, v. 223, p. 19-23, 2015.

SUWANBOON, S.; AMORNPITOKSUK, P. Preparation and characterization of nanocrystalline La-doped ZnO powders through a mechanical milling and their optical properties. **Ceramics International**, v. 37, p. 3515-3521, 2011.

SUWANBOON, S.; AMORNPITOKSUK, P.; SUKOLRAT, A.; MUENSIT, N. Optical and photocatalytic properties of La-doped ZnO nanoparticles prepared via precipitation and mechanical milling method. **Ceramics International**, v. 39, p. 2811-2819, 2013.

TAN, S. T.; TAN, C. H.; CHONG, W. Y.; YAP, C. C.; UMAR, A. A.; GINTING, R. T.; LEE, H. B.; LIM, K. S.; YAHAYA, M.; SALLEH, M. M. Microwave-assisted hydrolysis preparation of highly crystalline ZnO nanorod array for room temperature photoluminescence-based CO gas sensor. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 227, p. 304-312, 2016.

TAN, Y.; FANG, Z.; CHEN, W.; HE, P. Structural, optical and magnetic properties of Eu-doped ZnO films. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 509, p. 6321-6324, 2011.

TAN, Y. H.; DAVIS, J. A.; FUJIKAWA, K.; GANESH, N. V.; DEMCHENKO, A. V.; STINE, K. J. Surface area and pore size characteristics of nanoporous gold subjected to thermal, mechanical, or surface modification studied using gas adsorption isotherms, cyclic voltammetry, thermogravimetric analysis, and scanning electron microscopy. **Journal of materials chemistry**, v. 22, p. 6733-6745, 2012.

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, p. 808-818, 2001.

THANGARAJ, P.; VISWANATHAN, M. R.; BALASUBRAMANIAN, K.; PANNEERSELVAM, S.; MANSILLA, H. D.; GRACIA-PINILLA, M. A.; CONTRERAS, D.; RUIZ, J. Morphology controlled synthesis of Sm doped ZnO nanostructures for photodegradation studies of Acid Blue 113 under UV-A light. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 26, p. 8784-8792, 2015.

THANKACHAN, R. M.; JOY, N.; ABRAHAM, J.; KALARIKKAL, N.; THOMAS, S.; OLUWAFEMI, O. S. Enhanced photocatalytic performance of ZnO nanostructures produced via a quick microwave assisted route for the degradation of rhodamine in aqueous solution. **Materials Research Bulletin**, v. 85, p. 131-139, 2017.

TOBY, B. EXPGUI, a graphical user interface for GSAS. **Journal of Applied Crystallography**, v. 34, p. 210-213, 2001.

TROVARELLI, A. **Catalysis by ceria and related materials**. World Scientific, 2002.

TSAL, M. K.; HUANG, C. C.; LEE, Y. C.; YANG, C. S.; YU, H. C.; LEE, J. W.; HU, S. Y.; CHEN, C. H. A study on morphology control and optical properties of ZnO nanorods synthesized by microwave heating. **Journal of Luminescence**, v. 132, p. 226-230, 2012.

TSUBOI, T. Absorption spectra due to the $4f^7 \rightarrow 4f^7$ transitions of Gd^{3+} ions in $GdAl_3(BO_3)_4$ crystals. **Journal of Physics-Condensed Matter**, v. 10, p. 9155-9159, 1998.

VANHEUSDEN, K.; SEAGER, C. H.; WARREN, W. L.; TALLANT, D. R.; VOIGT, J. A. Correlation between photoluminescence and oxygen vacancies in ZnO phosphors. **Applied Physics Letters**, v. 68, p. 403-405, 1996.

VIJAYAPRASATH, G.; MURUGAN, R.; HAYAKAWA, Y.; RAVI, G. Optical and magnetic studies on Gd doped ZnO nanoparticles synthesized by co-precipitation method. **Journal of Luminescence**, v. 178, p. 375-383, 2016.

VOLANTI, D. P.; CAVALCANTE, L. S.; KEYSON, D.; LIMA, R. C.; DE MOURA, A. P.; MOREIRA, M. L.; GODINHO, M.; LONGO, E.; VARELA, J. A. Materiais Nanoestruturados obtidos por síntese hidrotermal assistida por microondas. **Metalurgia e Materiais**, v. 63, p. 353-357, 2007.

VON, R. Quantitative texture analysis by Rietveld refinement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 30, p. 517-525, 1997.

WALTON, K. S.; SNURR, R. Q. Applicability of the BET Method for Determining Surface Areas of Microporous Metal–Organic Frameworks. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 8552-8556, 2007.

WANG, C.; HUANG, Z. Controlled synthesis α - Fe_2O_3 nanostructures for efficient photocatalysis. **Materials Letters**, v. 164, p. 194-197, 2016.

WANG, C.; ZHANG, X.; LIU, Y. Promotion of multi-electron transfer for enhanced photocatalysis: A review focused on oxygen reduction reaction. **Applied Surface Science**, v. 358, p. 28-45, 2015.

WANG, F.; CAO, L.; PAN, A.; LIU, R.; WANG, X.; ZHU, X.; WANG, S.; ZOU, B. Synthesis of tower-like ZnO structures and visible photoluminescence origins of varied-shaped ZnO nanostructures. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, p. 7655-7660, 2007.

WANG, F.; HAN, Y.; LIM, C. S.; LU, Y.; WANG, J.; XU, J.; CHEN, H.; ZHANG, C.; HONG, M.; LIU, X. Simultaneous phase and size control of upconversion nanocrystals through lanthanide doping. **Nature**, v. 463, p. 1061-1065, 2010.

WANG, H.; XIE, J.; YAN, K.; DUAN, M. Growth Mechanism of Different Morphologies of ZnO Crystals Prepared by Hydrothermal Method. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 27, p. 153-158, 2011.

WANG, J.; WANG, Z.; HUANG, B.; MA, Y.; LIU, Y.; QIN, X.; ZHANG, X.; DAI, Y. Oxygen Vacancy Induced Band-Gap Narrowing and Enhanced Visible Light Photocatalytic Activity of ZnO. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 4, p. 4024-4030, 2012.

WIEDMER, D.; SAGSTUEN, E.; WELCH, K.; HAUGEN, H. J.; TIAINEN, H. Oxidative power of aqueous non-irradiated TiO₂-H₂O₂ suspensions: Methylene blue degradation and the role of reactive oxygen species. **Applied Catalysis B-Environmental**, v. 198, p. 9-15, 2016.

WU, X.; ZHANG, B.; HU, Z. Microwave hydrothermal synthesis of boehmite hollow microspheres. **Materials Letters**, v. 73, p. 169-171, 2012.

XIANG, Q.; YU, J.; JARONIEC, M. Synergetic Effect of MoS₂ and Graphene as Cocatalysts for Enhanced Photocatalytic H₂ Production Activity of TiO₂ Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 6575-6578, 2012.

XING, Z.; GENG, B.; LI, X.; JIANG, H.; FENG, C.; GE, T. Self-assembly fabrication of 3D porous quasi-flower-like ZnO nanostrip clusters for photodegradation of an organic dye with high performance. **CrystEngComm**, v. 13, p. 2137-2142, 2011.

YANG, H.; LI, G.; AN, T.; GAO, Y.; FU, J. Photocatalytic degradation kinetics and mechanism of environmental pharmaceuticals in aqueous suspension of TiO₂: A case of sulfa drugs. **Catalysis Today**, v. 153, p. 200-207, 2010.

YANG, J.; GAO, M.; YANG, L.; ZHANG, Y.; LANG, J.; WANG, D.; WANG, Y.; LIU, H.; FAN, H. Low-temperature growth and optical properties of Ce-doped ZnO nanorods. **Applied Surface Science**, v. 255, p. 2646-2650, 2008.

YANG, J. H.; GAO, M.; YANG, L. L.; ZHANG, Y. J.; LANG, J. H.; WANG, D. D.; WANG, Y. X.; LIU, H. L.; FAN, H. G. Low-temperature growth and optical properties of Ce-doped ZnO nanorods. **Applied Surface Science**, v. 255, p. 2646-2650, 2008.

YANG, J. L.; AN, S. J.; PARK, W. I.; YI, G. C.; CHOI, W. Photocatalysis using ZnO thin films and nanoneedles grown by metal-organic chemical vapor deposition. **Advanced Materials**, v. 16, p. 1661-1664, 2004.

YANG, L.; KRUSE, B. Revised Kubelka–Munk theory. I. Theory and application. **Journal of the Optical Society of America A**, v. 21, p. 1933-1941, 2004.

YANG, P.; LU, C.; HUA, N.; DU, Y. Titanium dioxide nanoparticles co-doped with Fe³⁺ and Eu³⁺ ions for photocatalysis. **Materials Letters**, v. 57, p. 794-801, 2002.

YAYAPAO, O.; THONGTEM, S.; PHURUANGRAT, A.; THONGTEM, T. Sonochemical synthesis, photocatalysis and photonic properties of 3% Ce-doped ZnO nanoneedles. **Ceramics International**, v. 39, p. S563-S568, 2013.

YIN, M.; WANG, F.; FAN, H.; XU, L.; LIU, S. Heterojunction CuO@ZnO microcubes for superior p-type gas sensor application. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 672, p. 374-379, 2016.

YINGYING, L.; LESHU, Y.; HEYONG, H.; YUYING, F.; DONGZHEN, C.; XIN, X. Application of the soluble salt-assisted route to scalable synthesis of ZnO nanopowder with repeated photocatalytic activity. **Nanotechnology**, v. 23, p. 065402, 2012.

YOUSEFI, M.; AMIRI, M.; AZIMIRAD, R.; MOSHFEGH, A. Z. Enhanced photoelectrochemical activity of Ce doped ZnO nanocomposite thin films under visible light. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 661, p. 106-112, 2011.

YU, W. L.; ZHANG, J. F.; PENG, T. Y. New insight into the enhanced photocatalytic activity of N-, C- and S-doped ZnO photocatalysts. **Applied Catalysis B-Environmental**, v. 181, p. 220-227, 2016.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, p. 1469-1479, 2007.

ZHANG, L.; HUANG, H. Structural transformation of ZnO nanostructures. **Applied Physics Letters**, v. 90, 2007.

ZHANG, R.; YIN, P.-G.; WANG, N.; GUO, L. Photoluminescence and Raman scattering of ZnO nanorods. **Solid State Sciences**, v. 11, p. 865-869, 2009.

ZHAO, X.; LI, M.; LOU, X. Sol-gel assisted hydrothermal synthesis of ZnO microstructures: Morphology control and photocatalytic activity. **Advanced Powder Technology**, v. 25, p. 372-378, 2014.

ZHENG, Y.; CHEN, C.; ZHAN, Y.; LIN, X.; ZHENG, Q.; WEI, K.; ZHU, J.; ZHU, Y. Luminescence and Photocatalytic Activity of ZnO Nanocrystals: Correlation between Structure and Property. **Inorganic Chemistry**, v. 46, p. 6675-6682, 2007.

ZHOU, C.; GENG, Y.; CHEN, Q.; XU, J.; HUANG, N.; GAN, Y.; ZHOU, L. A novel PbS/TiO₂ composite counter electrode for CdS quantum dot-sensitized ZnO nanorods solar cells. **Materials Letters**, v. 172, p. 171-174, 2016.

ZHOU, L.; WANG, W. Z.; XU, H. L.; SUN, S. M.; SHANG, M. Bi₂O₃ Hierarchical Nanostructures: Controllable Synthesis, Growth Mechanism, and their Application in Photocatalysis. **Chemistry-a European Journal**, v. 15, p. 1776-1782, 2009.

ZHU, K.; ZHANG, Y.; QIU, H.; MENG, Y.; GAO, Y.; MENG, X.; GAO, Z.; CHEN, G.; WEI, Y. Hierarchical Fe_3O_4 microsphere/reduced graphene oxide composites as a capable anode for lithium-ion batteries with remarkable cycling performance. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 675, p. 399-406, 2016.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**



Manuella Verdinelli de Paula Reis

**Avaliação de meios de armazenagem e
substâncias moduladoras na preservação da
viabilidade e inibição clástica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia-MG

2017

Manuella Verdinelli de Paula Reis

**Avaliação de meios de armazenagem e
substâncias moduladoras na preservação da
viabilidade e inibição clástica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Carlos José Soares

Co-orientadora: Profa. Dra. Camilla Christian Gomes Moura

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos José Soares – UFU

Profa. Dra. Paula Dechichi – UFU

Profa. Dra. Priscilla Barbosa Ferreira Soares – UFU

Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva - UFTM

Profa. Dra. Maria Angélica Hueb de Menezes Oliveira – UNIUBE

Uberlândia-MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- R375a
2017 Reis, Manuella Verdinelli de Paula, 1987
 Avaliação de meios de armazenagem e substâncias moduladoras na
 preservação da viabilidade e inibição clástica / Manuella Verdinelli de
 Paula Reis. - 2017.
 90 f. : il.
- Orientador: Carlos José Soares.
 Coorientadora: Camilla Christian Gomes Moura.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Odontologia.
 Inclui bibliografia.
1. Odontologia - Teses. 2. Periodontia - Teses. 3. Reabsorção da raiz
(Dentes) - Teses. 4. Dentes - Reimplante - Teses. I. Soares, Carlos José, .
II. Moura, Camilla Christian Gomes, 1979. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.314



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Tese de Doutorado nº 018- COPOD

Data: 20/02/2017

Discente: **Manuella Verdinelli de Paula Reis (11313ODO006)**

Título do Trabalho: Avaliação de meios de armazenagem e substâncias moduladoras na preservação da viabilidade e inibição clástica

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Linha de pesquisa: Processo de reparo.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Processo de reparo.

As oito horas e trinta minutos do dia vinte de fevereiro de 2017 no Anfiteatro Bloco 4L Anexo A, sala 23 Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em janeiro de 2017, assim composta: Professores Doutores: Paula Dechichi (UFU); Priscilla Barbosa Ferreira Soares (UFU); Marcos Vinícius da Silva (UFTM); Maria Angélica Hueb de Menezes Oliveira (UNIUBE); Carlos José Soares (UFU) orientador(a) do(a) candidato(a) **Manuella Verdinelli de Paula Reis**.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa Dr. Carlos José Soares apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

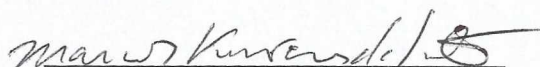
A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores (a)(s), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Finalizada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

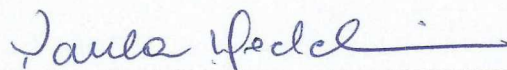
Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o(a) candidato(a) A provado(a).


Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

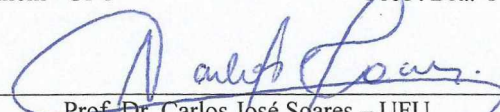
Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 12 horas e 40 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof.ª Dra. Maria Angélica Hueb de Menezes Oliveira - UNIUBE)


Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva -UFTM


Prof.ª Dra. Paula Dechichi- UFU


Prof.ª Dra. Priscilla Barbosa Ferreira Soares- UFU


Prof. Dr. Carlos José Soares – UFU
Orientador(a)



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às crianças e jovens que sofreram avulsão e tiveram seus dentes perdidos precocemente devido ao trauma.

Dedico este trabalho por uma Odontologia melhor, baseada em evidência científica com novas perspectivas para o futuro, especialmente para os casos de avulsão dental.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre ilumina os meus dias, me fortalece quando preciso, proporcionando coragem e sabedoria para lidar com os desafios da vida.

Aos meus pais, Herminio e Rosane, que me educaram com princípios, e sempre apoiaram e incentivaram meus estudos, para que um dia eu pudesse ter oportunidades que eles não tiveram.

Ao meu noivo Eder, que me ensinou a olhar a vida com outros olhos, me dá coragem e esperança para os novos dias. Obrigada por apoiar e incentivar minhas escolhas.

Ao meu irmão Marcel, sempre presente na minha vida e acreditando no meu crescimento.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos José Soares, pelas oportunidades que me proporcionou durante esses anos. Obrigada pelo incentivo e apoio para o meu crescimento profissional. Tenho orgulho de ter sido sua orientada por 6 anos ao todo, espero que tenha retribuído toda sua dedicação e confiança em mim.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Camilla Christian Gomes Moura, pela dedicação e ensinamentos que compartilhou comigo durante esses anos. Tenho certeza que você foi fundamental para a minha formação acadêmica. Obrigada pelo companheirismo e confiança que depositou em mim. Como sua primeira co-orientação de doutorado, espero ter proporcionado orgulho nesses últimos anos, podendo retribuir um pouco do que fez por mim.

A Profa. Priscilla Barbosa Ferreira Soares, pelos ensinamentos, apoio e confiança durante esses anos.

A minha aluna de iniciação científica, Gabriela, pela paciência com meu aprendizado em orientar pela primeira vez, e pela amizade que constituímos.

nesses anos. Obrigada por ter me ajudado a desenvolver parte dessa tese, e estar presente em todos os momentos que precisei.

A Aletheia, por todo incentivo e apoio nos momentos que precisei. Agradeço pela contribuição nas análises histomorfométricas.

Ao Prof. Marcos Vinícius da Silva, pela colaboração na citometria de fluxo e separação dos monócitos humanos.

A Profa. Maria Aparecida de Souza, pela disposição em colaborar e disponibilizar a lectina necessária para a realização desse trabalho.

A Profa. Cristiane Salgueiro e Profa. Marcia Helena Sobral, por disponibilizar as diferentes formulações da água de coco liofilizada para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores dessa instituição, especialmente aos do programa de pós-graduação, que fizeram parte da minha formação.

As minhas amigas do doutorado, Luisa e Fabiane, agradeço pela amizade sincera, troca de experiências, e apoio durante esses anos.

Aos colegas da pós-graduação pelos momentos compartilhados.

Em especial a minha amiga Laila, que está sempre ao meu lado apoiando com paciência e compreensão. Obrigada pelo enorme carinho, solidariedade e pela amizade sincera que sempre posso confiar.

Ao John, técnico do CPBio, que me ajuda com o que preciso no laboratório, e pela amizade que constituímos nesse período.

As secretárias do programa de pós-graduação, Graça e Brenda, sempre atenciosas e à disposição para ajudar em tudo que eu precisasse.

A Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, por permitir meu crescimento pessoal e profissional, desde a graduação. Tenho imenso orgulho de ser aluna desta Instituição.

As agências de fomento: Capes, pela concessão da bolsa; FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

A banca examinadora, composta pelos professores Paula Dechichi, Priscilla Barbosa Ferreira Soares, Marcos Vinícius da Silva, Maria Angélica Hueb de Menezes Oliveira e Carlos José Soares. Aos membros suplentes representados pelo professor Darcey Zanetta Barbosa e professora Yara Terezinha Corrêa Silva Sousa.

E a todas as pessoas que torceram pelo meu sucesso e contribuíram de alguma forma para que essa etapa fosse vencida!

EPÍGRAFE

"A persistência é o caminho do êxito."

Charles Chaplin

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	1
Resumo	2
Abstract	5
1. Introdução e Referencial Teórico	8
2. Objetivos	13
3. Objetivos específicos (capítulos)	14
3.1. Capítulo 1 - <i>Evaluation of effect of different storage media on the root dentine composition and viability of fibroblasts evaluated by different assay methods.</i>	17
3.2. Capítulo 2 - <i>Replanted teeth stored in a newly developed powdered coconut water formula.</i>	25
3.3. Capítulo 3 - <i>Effect of lectin (ScLL) on fibroblasts stimulated with LPS – an in vitro study.</i>	38
3.4. Capítulo 4 - <i>Effect of ScLL and 15d-PGJ₂ on fibroblasts stimulated-LPS on cell viability and cytokine release – an in vitro study.</i>	47
3.5. Capítulo 5 - <i>Effects of Lectin (ScLL) on osteoclast maturation – an in vitro study.</i>	61
4. Considerações finais	78
5. Conclusões	81
6. Referências	83
7. Anexos	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm - micrômetro

mm - milímetro

15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PG J2 - 15d-PGJ₂

ACP-404 - Água de coco em pó

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

HBSS - Solução Salina Balanceada de Hank's

IL-6 - Interleucina 6

IL-10 - Interleucina 10

LP - Ligamento periodontal

LPS - Lipopolissacarídeo

ScLL - Lectina de *Synadenium carinatum*

TNF - Fator de necrose tumoral

TGFβ - Fator de transformação do crescimento

Resumo

RESUMO

Estudos têm proposto o uso de diferentes soluções para armazenagem de dentes avulsionados, tais como leite, HBSS, e mais recentemente a água de coco. Contudo, é recomendável que esses meios apresentem capacidade imunomodulatória, a fim de controlar a resposta inflamatória após o reimplante tardio, o que favoreceria melhor prognóstico clínico. Diante disso, o objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito de soluções utilizadas como meios de armazenagem e substâncias com propriedades imunomoduladoras, na preservação da viabilidade celular e inibição da atividade clástica, por meios de experimentos *in vitro* e *in vivo*. Este estudo envolveu cinco objetivos específicos.

Objetivo 1: avaliar o efeito dos meios de armazenagem na viabilidade de fibroblastos gengivais humanos (FGH) por meio de análise de multiparamétrica da citotoxicidade; e, seus efeitos na superfície externa da dentina radicular bovina por meio de análise com FTIR. **Objetivo 2:** avaliar histomorfometricamente o processo de reparo do periodonto de dentes de cães reimplantados após armazenagem em duas formulações diferentes de água de coco liofilizada. **Objetivo 3:** avaliar o efeito da lectina (ScLL), na viabilidade, proliferação e liberação de IL-10 em FGH estimulados com LPS. **Objetivo 4:** avaliar o efeito de 15d-PGJ₂ e ScLL em FGH estimulados com LPS quanto a viabilidade, liberação de IL-6 e TGFβ-1. **Objetivo 5:** avaliar a viabilidade de células periféricas mononucleares de sangue humano estimuladas com LPS e em macrófagos murinos RAW 264.7 tratados com ScLL, bem como seus efeitos na osteoclastogênese *in vitro*, e na liberação de TNF-α e NO. Frente aos resultados destes objetivos conclui-se que: 1) o leite de soja apresentou maior viabilidade quando comparado aos meios HBSS e leite integral, enquanto que na composição da dentina todos os meios apresentaram comportamento similar. E, do ponto de vista clínico o tempo de armazenagem de até 1h mostrou ser fator crucial para o prognóstico de dentes reimplantados; 2) Em relação à água de coco liofilizada, a formulação ACP-404 I foi capaz de preservar o LP e limitar os níveis de reabsorção superficial; 3) As concentrações testadas de ScLL em cultura de fibroblastos não apresentaram citotoxicidade, e não gerou efeito negativo nos parâmetros proliferação celular e liberação de IL-10; 4) A

concentração de ScLL 5 µg/ml não interferiu na viabilidade celular. Em relação ao parâmetro liberação de IL-6, ScLL 2 µg/ml e 15d-PGJ₂ 1 µg/ml demonstrou menores níveis desta citocina inflamatória, e todas as substâncias testadas não tiveram efeito na liberação de TGFβ-1; 6) E por fim, ScLL na concentração de 5 µg/ml suprimiu a osteoclastogênese *in vitro*, sem interferir na viabilidade de células periféricas de sangue humano e precursoras de osteoclastos murinos, e não apresentou efeito na liberação de TNF-α e NO. Portanto, este estudo foi o primeiro passo para avaliar o uso de ScLL como agente imunomodulatório para prevenir a reabsorção em dentes avulsionados, e futuramente sua associação com a água de coco liofilizada, pode gerar perspectivas de inovação tecnológica e transferência de tecnologia com geração de novos produtos para dentes avulsionados.

Abstract

ABSTRACT

Studies have proposed the use of different solutions for storage of avulsed teeth, such as milk, HBSS, and recently the coconut water. However, it would be interesting the association of these storage media with some immunomodulatory substance that be able to control the inflammatory response after late replantation, and improve the prognosis in such cases. Thus, the general objective of the present study was to evaluate the effect of storage media and modulatory substances on preservation viability and inhibit the osteoclast activity, by *in vitro* and *in vivo* studies. This study involved five specific objectives: **Objective 1:** evaluate the effect of storage media on viability of human gingival fibroblasts (HGF) by multiparametric cytotoxic assay; and, on the external superficial of bovine root dentine by FTIR analysis. **Objective 2:** evaluate the the periodontal healing process quantitatively and qualitatively of dog teeth replanted after storage in two different formulations of powdered coconut water by histomorphometric analysis. **Objective 3:** evaluate the effect of lectin (ScLL), stimulated with LPS, on the viability, proliferation and release of IL-10 in HGF. **Objective 4:** evaluate the effect of 15d-PGJ₂ and ScLL in HGF LPS-stimulated on viability, and release of IL-6 and TGFβ-1. **Objective 5:** evaluate the viability of ScLL in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with LPS and in murine macrophage RAW 264.7, as well as their effects on the osteoclastogenesis *in vitro*, and on the release of TNF-α and NO. Based on the results of these objectives is possible to conclude that: 1) the soy milk presented higher viability when compared with HBSS and whole milk, whereas the solutions behaved similarly on the dentine composition. Clinically the time at 1 h is a crucial factor in the prognosis of dental replantation; 2) In relation the powdered coconut water, ACP-404 I formulation was able to preserve the normal periodontium and limit the level of surface resorption. Additionally, this study demonstrated that the adjustment of the pH of coconut water is essential to maintain the normal periodontium; 3) The ScLL concentrations tested as possible immunomodulator agent were not cytotoxic, and had not effect on the cell proliferation and release of IL-10 parameters; 4) In the others analysis assay, the concentration of ScLL 5 µg/ml did not interfere in the cell viability. In relation to release of IL-6 parameter, ScLL 2 µg/ml and 15d-PGJ₂ 1 µg/ml demonstrated the lowest levels of this

inflammatory cytokine, and all the tested substances had no effect on the release of TGF β -1; 5) Finally, ScLL in the concentration 5 μ g/ml suppressed the *in vitro* osteoclastogenesis, without interfering in the PBMC and murine osteoclast precursors viability, and no presented effect on the release of TNF- α and NO. Therefore, it is the first step to evaluate the use of ScLL as immunomodulatory agent to prevent the resorption in avulsed teeth, and in the future their association with the powdered coconut water, which may open up new perspectives innovation and transferring of technology with the generation of the new products for treating avulsed teeth.

Introdução

E Referencial Teórico

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

A avulsão dentária é caracterizada pelo deslocamento completo do dente do alvéolo, sendo considerada uma das formas mais severas de traumatismo dento-alveolar (Gopikrishna *et al.* 2008a). Este tipo de trauma acomete principalmente crianças e adolescentes, com incidência de 16% de todas as lesões traumáticas (Andreasen, 1970). Neste tipo de lesão ocorre comprometimento do suprimento neurovascular, o que pode resultar em danos à estrutura do periodonto e perda da vitalidade pulpar (Martin & Pileggi, 2004). O tratamento ideal é o reimplante imediato que deve ser realizado o mais próximo possível da ocorrência do trauma. Para obtenção de melhor prognóstico, é imperioso que o dente permaneça o menor tempo possível fora do alvéolo e que o meio de armazenagem seja adequado (Martin & Pileggi, 2004). Entretanto, na maioria dos casos de avulsão, o dente é reimplantado após longo período extra-alveolar, sendo muitas vezes mantido seco ou em meio inadequado (Soares *et al.* 2008; Andersson *et al.* 2012). Em busca de minimizar futuras complicações como anquilose e reabsorção por substituição, as quais se figuram entre as principais causas de insucesso no reimplante, podendo levar a perda do elemento dental, o dente deve ser armazenado em meio que seja capaz de manter a viabilidade das células do ligamento periodontal (Gopikrishna *et al.* 2008a; Souza *et al.* 2011). O meio de armazenagem ideal deve ter pH apropriado, cerca de 7.0, osmolaridade fisiológica, e conter substâncias nutritivas tais como, aminoácidos, vitaminas e proteínas que permitam a manutenção de sua vitalidade celular (Pearson *et al.* 2003).

A Solução Salina Balanceada de Hank's (HBSS) tem sido recomendada como meio de armazenagem para dentes avulsionados pela Associação Americana de Endontistas (AAE) (Andersson *et al.* 2012), entretanto este meio não está prontamente disponível para a população (Moazami *et al.* 2012). O leite bovino é outra solução amplamente aceita como meio de armazenagem para dentes avulsionados, mantendo a viabilidade das células LP por longos períodos (Souza *et al.* 2010; Souza *et al.* 2011). Estudos têm sido realizados indicando o leite de soja como meio de armazenagem alternativo (Moazami *et al.* 2012; Moura *et al.* 2012; Silva *et al.* 2013), devido a presença de

minerais e vitaminas, e ao consumo de produtos à base de soja ter aumentado em muitos países.

Considerando todas estas propriedades que devem ser levadas em consideração na escolha de um meio de armazenagem adequado, estudos têm proposto a água de coco como meio para armazenagem e transporte de dentes avulsionados (Gopikrishna *et al.* 2008a; Gopikrishna *et al.* 2008b; Moreira-Neto *et al.* 2009; Souza *et al.* 2011). A água de coco é rica em aminoácidos essenciais, proteínas, vitaminas, minerais, eletrólitos e açúcares, os quais são responsáveis por sua alta osmolaridade. Estes nutrientes são fatores importantes para a preservação da viabilidade das células LP (Gopikrishna *et al.* 2008a; Gopikrishna *et al.* 2008b). Entretanto, a água de coco possui pH ácido, fator deletério para o metabolismo celular (Moreira-Neto *et al.* 2009; Silva *et al.* 2013; Moura *et al.* 2014; de Paula Reis *et al.* 2014). Substâncias como NaHCO_3 (Gopikrishna *et al.* 2008b; Soares *et al.* 2016) e trietanolamina (Moura *et al.* 2014; de Paula Reis *et al.* 2014; Soares *et al.* 2016) têm sido testadas para neutralizar o pH da água de coco, o que permitiria seu uso como meio de armazenagem para dentes avulsionados. No entanto, a neutralização da água de coco para obter pH de aproximadamente 7,0 não é acessível em condições domésticas, pois seria necessário o uso de um medidor de pH. A despeito dos resultados promissores, obtidos *in vitro* (Moreira-Neto *et al.* 2009; Moura *et al.* 2014; Soares *et al.* 2016) e *in vivo* (de Paula Reis *et al.* 2014) em estudos nos quais o pH da água de coco foi neutralizado, é importante considerar as limitações deste produto, tais como pH ácido e rápida deterioração mesmo em embalagem longa-vida. Diante disso, foi desenvolvido um meio de preservação feito a partir da água de coco, porém na forma em pó (ACP-404), a qual já possuiria valores de pH e osmolaridade ajustados. Este produto, denominado ACP-404, possui um prazo de validade de aproximadamente dois anos e é facilmente reconstituído em água filtrada, o que torna viável seu uso e distribuição como meio de armazenagem. Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou três diferentes formulações de ACP-404 para preservação de células LP, o qual confirmou a habilidade desses meios em preservar as células LP e indicou seu uso como possível meio de armazenagem (Moura *et al.* 2017).

Contudo, os fatores psicológicos envolvidos no momento do acidente e principalmente, a falta de informação sobre os cuidados a serem tomados, faz com que o dente permaneça seco e seja reimplantado tardiamente (Trope, 2011; Tuna *et al.* 2014). Nestes casos, a resposta à injúria leva a uma cadeia de reações bioquímicas, na qual os fibroblastos são as primeiras células a responder aos danos causados aos tecidos (Gunraj, 1999). Essas células têm como função manter a integridade da raiz, conseqüentemente, quando ocorre algum dano às mesmas, pode comprometer a camada de cemento e dentina. Assim, precursores de células clásticas serão recrutados e ativados na presença de mediadores inflamatórios para as áreas expostas da superfície dentinária, levando à reabsorção radicular (Trope, 2011; Gunraj, 1999). Muitos agentes com possíveis propriedades antirreabsorção, tais como alendronato, Emdogain (Yang *et al.* 2015; Schjott *et al.* 2005), e zolendronato (Choi *et al.* 2010) têm sido estudados para tratamento da superfície radicular antes do reimplante tardio. Entretanto, estes agentes apresentam resultados parcialmente satisfatórios no controle ou prevenção da reabsorção radicular (Schjott *et al.* 2005; Poi *et al.* 2007; Panzarini *et al.* 2012). Considerando que a reabsorção tem um aspecto imunoinflamatório, seria interessante avaliar substâncias capazes de modular a cascata de eventos moleculares envolvidos na ativação de células clásticas.

A partir do látex extraído da planta Euphorbiaceae *Synadenium carinatum* é obtida a lectina ligante de d-galactose (ScLL), a qual está envolvida em diversos eventos biológicos (Souza *et al.* 2013). As lectinas de forma geral, interferem em processos celulares cruciais, tais como endocitose, regulação e migração celular, e processo de defesa. No caso específico da lectina ScLL, seu uso tem sido demonstrado com sucesso em modelos de inflamação crônica (Rogerio *et al.* 2007), leishmaniose (Afonso-Cardoso *et al.* 2011) e neosporose (Cardoso *et al.* 2012). No entanto, até o presente momento, a ScLL ainda não foi avaliada em modelos envolvendo células da cavidade oral.

Outro componente com capacidade imunomodulatória já confirmada é a prostaglandina ciclopentanona, 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PG J2 (15d-PGJ₂), a qual demonstrou resultados promissores em diferentes modelos experimentais *in vitro* (Nakamura *et al.* 2013) e *in vivo* (Napimoga *et al.* 2012; Quinteiro *et al.* 2012;

Nakamura *et al.* 2013). O 15d-PGJ₂ possui diversas atividades fisiológicas, sendo um dos produtos da via ciclo-oxigenase (COX)-2 (Napimoga *et al.* 2012). Porém difere das outras prostaglandinas em vários aspectos, tanto quimicamente, como biologicamente, principalmente devido aos seus efeitos anti-inflamatórios (Napimoga *et al.* 2012; Quinteiro *et al.* 2012), anti-tumorais (Nakamura *et al.* 2013) e antinociceptivos (Quinteiro *et al.* 2012). Seu efeito imunomodulatório foi comprovado em modelo murino de periodontite (Napimoga *et al.* 2012), no qual 15d-PGJ₂ diminuiu a reabsorção óssea e a resposta inflamatória. No entanto, não foi cogitado até o momento seu possível uso para tratamento da superfície de dentes reimplantados tardiamente.

Diante do exposto, torna-se importante, além de avaliar substâncias que possam ser utilizadas como meio de transporte e armazenagem, também buscar substâncias para tratamento da raiz de dentes que permaneceram longo tempo fora do alvéolo, nos quais substâncias com capacidade imunomoduladora se fazem necessárias para auxiliar no controle das reações celulares e bioquímicas que culminarão posteriormente na reabsorção dental e insucesso do tratamento.

Objetivos

2. Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar o efeito de várias substâncias utilizadas como meios de armazenagem e substâncias com propriedades imunomoduladoras, na preservação da viabilidade celular e inibição da atividade clástica, por meios de experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos Específicos

Objetivo específico 1

Capítulo 1 - *Evaluation of effect of different storage media on the root dentine composition and viability of fibroblasts evaluated by different assay methods.*

Este objetivo específico avaliou o efeito dos meios de armazenagem HBSS, leite integral e leite de soja na: 1) viabilidade de fibroblastos gengivais humanos (FGH) por meio de análise de multiparamétrica da citotoxicidade; 2) e, seus efeitos na superfície externa da dentina radicular bovina em relação aos parâmetros $-OH$ e $-PO_4^{3-}$ por meio de análise com FTIR.

Objetivo específico 2

Capítulo 2 - *Replanted teeth stored in a newly developed powdered coconut water formula.*

Este objetivo específico avaliou histomorfometricamente o processo de reparo do periodonto de dentes de cães reimplantados após armazenagem em duas formulações diferentes de água de coco liofilizada com osmolaridade e pH ajustados.

Objetivo específico 3

Capítulo 3 - *Effect of lectin (ScLL) on fibroblasts stimulated with LPS – an in vitro study.*

Este objetivo específico avaliou o efeito da lectina (ScLL), na viabilidade, proliferação e liberação de IL-10 em fibroblastos gengivais estimulados com LPS.

Objetivo específico 4

Capítulo 4 - *Effect of ScLL and 15d-PGJ₂ on fibroblasts stimulated-LPS on cell viability and cytokine release – an in vitro study.*

Este objetivo específico avaliou o efeito de 15d-PGJ₂ e ScLL em fibroblastos gengivais estimulados com LPS quanto a viabilidade, e liberação de IL-6 e TGFβ-1.

Objetivo específico 5

Capítulo 5 - *Effects of Lectin (ScLL) on osteoclast maturation – an in vitro study.*

Este objetivo específico avaliou a viabilidade de células mononucleares de sangue periférico humano estimuladas com LPS e macrófagos murinos RAW 264.7, tratados com ScLL, bem como seus efeitos na osteoclastogênese *in vitro*, e na liberação de TNF-α e NO.

Capítulos

Capítulos

3.1 CAPÍTULO 1

Evaluation of effect of different storage media on the root dentine composition and viability of fibroblasts evaluated by different assay methods.

Artigo publicado no periódico International Endodontic Journal

Effect of different storage media on root dentine composition and viability of fibroblasts evaluated by several assay methods

M. V. P. Reis¹, G. L. Souza¹, C. C. G. Moura², P. B. F. Soares³ & C. J. Soares¹

¹Biomechanics Research Group, Department of Operative Dentistry and Dental Materials; ²Biomechanics Research Group, Department of Endodontics; and ³Biomechanics Research Group, Department of Periodontology and Implantology, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

Abstract

Reis MVP, Souza GL, Moura CCG, Soares PBF, Soares CJ. Effect of different storage media on root dentine composition and viability of fibroblasts evaluated by several assay methods. *International Endodontic Journal*.

Aim To perform multiparametric analysis of the effects of soya milk (SM), whole milk (WM) and Hank's balanced salt solution (HBSS) on the viability of fibroblasts (HGF). The study also aimed to evaluate the influence of these solutions on bovine root dentine according to OH⁻ and PO₄³⁻ on the surface.

Methodology The HGF cytotoxicity was determined according to XTT, NR and SRB assays at 1, 3 and 6 h. Root dentine fragments were assessed by Fourier infrared (FTIR) spectrophotometer before and after immersion in the solutions for the same periods. The positive control group included cells and tooth fragments maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), and the negative control included tooth fragments that were kept dry. Data were analysed using ANOVA and Tukey's test.

Results No significant difference was found in cell viability evaluated by XTT ($P > 0.05$). Using the NR assay, WM and HBSS had significantly lower cell viability compared to the positive control group at 6 h ($P < 0.05$). SM had similar cell viability to the positive control group at all periods evaluated when assessed using all three tests ($P > 0.05$). A significant difference was found in values of OH⁻ for the negative control group at 1 h ($P = 0.002$).

Conclusions Soya milk promoted better cell viability, whereas on dentine composition, the solutions behaved similarly. The association of different assay methods is promising for improving cell viability analysis. The 1-h time-point is a crucial factor in the prognosis of dental replantation because the teeth remain more hydrated and help maintain cell viability.

Keywords: assay method, cell viability, root dentine, storage media, tooth avulsion.

Received 28 June 2016; accepted 8 December 2016

Introduction

In cases of tooth avulsion, immediate replantation is considered the ideal treatment. However, in most situations, there is replantation delay (Gopikrishna *et al.* 2008a), which influences the prognosis.

According to the extra-alveolar dry period and storage conditions, pulp necrosis and degeneration of periodontal ligament cells (PDLs) may occur (Moraes-Neto *et al.* 2009). Therefore, to minimize the primary causes of tooth loss, ankylosis and root resorption, it is of utmost importance that the storage medium maintains PDL cell viability (Barrett & Kenny 1997, Gopikrishna *et al.* 2008a, Souza *et al.* 2011).

Hank's balanced salt solution (HBSS) and bovine milk have been recommended for tooth storage (Trope 2011, Andersson *et al.* 2012). Milk is widely

Correspondence: Carlos José Soares, Biomechanics Research Group, Department of Operative Dentistry and Dental Materials, Federal University of Uberlândia, Av Pará 1720, Block 4L, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38408-325, Brazil (e-mail: carlosjsoares@umuarama.ufu.br).

used worldwide, easy to access, is inexpensive and contains nutrients that maintain cell vitality for longer time periods (Souza *et al.* 2010). Recently, soya milk (SM) was proposed (Moazami *et al.* 2012, Moura *et al.* 2012) as an alternative storage medium. SM possesses minerals and vitamins, nourishes PDL cells and maintains their viability (Moazami *et al.* 2012). These characteristics are crucial to preserve cells, as demonstrated in various studies (Moazami *et al.* 2012, Moura *et al.* 2012, Silva *et al.* 2013). Although several reports have evaluated the influence of storage media on cell viability (Moazami *et al.* 2012, Silva *et al.* 2013, Moura *et al.* 2014), the results are conflicting. Furthermore, no study has reported the effect of these storage media on root dentine composition.

Dentine extracellular matrix consists of approximately 47% (v/v) mineral, 30% (v/v) protein and 21% (v/v) water (Legeros 1991). Additionally, the demineralized dentine surface has a lower level of mineral crystals and high surface area of organic matrix (Zhang *et al.* 2012). Type I collagen accounts for approximately 90% of the protein fraction (Magne *et al.* 2004). In cases of dental trauma, specific dentine proteins (phosphophoryn and sialoprotein) can be exposed (Hidalgo *et al.* 2005). These soluble noncollagenous proteins that are released from dentine can interfere with mineralization (DeSteno & Feagin 1975). The influence of storage media on dentine surfaces is important. Therefore, it would be interesting to evaluate the OH^- and PO_4^{3-} parameters, which are related to a variety of the dentine components (Eliades *et al.* 2013, Feitosa *et al.* 2013), representing the water and mineralized dentine levels.

No previous study has analysed the influence of HBSS, whole milk (WM) and SM using a multiparameter cytotoxicity test in conjunction with Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis. To improve analysis of the ideal storage medium, it is necessary to use different techniques that enhance the prediction of performance on avulsed teeth. FTIR instrument has been applied within the new noninvasive method for analysing small samples. This innovation makes it possible to obtain the chemical characterization and calculate with accuracy the concentrations of the organic and inorganic elements (Khaustova *et al.* 2010, Prati *et al.* 2016).

Therefore, the purpose of this study was to evaluate the effect of HBSS, WM and SM on: (i) the viability of immortalized human gingival fibroblasts (HGF) using a multiparameter cytotoxicity assay, and (ii) the

external surface of bovine root dentine in response to the connection parameters, OH^- and PO_4^{3-} , by FTIR analysis. The null hypotheses were as follows: (i) the SM, WM, HBSS and DMEM (positive control) would exhibit similar performance for cell preservation over the short and long term, and (ii) the SM, WM, HBSS and DMEM would exhibit similar performance to dried dentine (negative control) on root dentine composition over the time.

Materials and methods

FTIR analysis

Intact bovine incisors were collected, the soft tissues and debris were removed, and the teeth stored in distilled water at 4 °C. The selected teeth were sectioned below the cement–enamel junction using a diamond disc (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) to remove the crown. The root dentine specimens were obtained from the mesial root sectioned in the middle of the canal (size 3.0×3.0 mm, $n = 75$) and submitted to ultrasonic cleaning (T7, C/T, Thornton, Vinhedo, SP, Brazil) with distilled water over 20 min for each surface.

Five root dentine specimens for each group were submitted to FTIR analysis before and after immersion in the following experimental solutions: soya milk – SM (Ades Original, Unilever, Pouso Alegre, MG, Brazil), whole milk – WM (Itambé, Pirituba, SP, Brazil) and HBSS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with Dulbecco's modified Eagle's medium – DMEM (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brazil) as a positive control group. For the negative control group, the dentine fragments were kept dry over gauze. The specimens were maintained at room temperature for 1, 3 and 6 h; they were then prepared for FTIR measurements. The samples were dried (excess solution was removed using absorbent paper points) and the root surface was positioned on contact with the attenuated total reflectance (ATR) area. FTIR analysis was performed using the ATR-FTIR Vertex 70/80 (Bruker, Ettlingen, Germany), and the scanning range was set from 400 to 4000 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} and 32 scan co-addition. Spectra were subjected to baseline corrections.

FTIR measurements and curve fitting analysis were performed using OPUS 6.5 software (Bruker). The following peaks were adopted for analysis: OH^- (3300 cm^{-1}) and PO_4^{3-} (1020 cm^{-1}). The

calculated curve values were submitted to statistical analysis.

Cell viability assay

HGF cells (Cell Bank of Rio de Janeiro, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil) were cultured in 50-cm² culture flasks using DMEM supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Vitrocell Embriolife) in a humidified incubator with 5% CO₂ and 95% air at 37 °C until confluence. The cells were detached from the flask, counted in a hemocytometer and placed in 100 µL of DMEM in 96-well plates (Coastar Corp., Cambridge, MA, USA) at an initial density of 2×10^4 cells well⁻¹. The plates were incubated for 24 h to allow for cell attachment. The medium was removed from each well and replaced by one of the previously described experimental solutions. The positive control group included cells maintained in 10% DMEM. The plates were incubated for 1, 3 and 6 h; afterwards, they were prepared to evaluate cell viability using a multiparametric commercial kit (Cytotox, Xenometrix AG, Allschwil, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. The viability according to mitochondrial dehydrogenase activity was evaluated using the XTT assay (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide). The absorbance was measured at 480 nm by a UV-vis microplate reader (Biochrom, Cambridge, UK).

The cells evaluated with the XTT test were washed and assayed with the neutral red uptake test (NR). The optical density (OD) of the supernatant was read at 540 nm. After the NR test, fixed cells were washed and the total density of adherent cells was evaluated according to the sulforhodamine B (SRB). Cells were treated with SRB solution; after washing, the dye was extracted and the OD was read at 540 nm.

Statistical analysis

Data were subjected to analysis of normality using the Shapiro–Wilk and Levene's tests. The NR and SRB data were evaluated with log transformation followed by one-way analysis of variance (ANOVA) and then the Tukey and Dunnett tests to compare the control and experimental groups. The XTT data were not normally distributed; therefore, the Kruskal–Wallis test was used ($P < 0.05$). Data for $-\text{OH}^-$ and $-\text{PO}_4^{3-}$ were analysed using the Kruskal–Wallis test and one-way ANOVA followed by the Tukey test, respectively. The Dunnett test was performed to

compare the control and experimental groups. The Pearson correlation test was also performed. The statistical analyses were performed using SigmaPlot 12.0 software (Systat Software, San Jose, CA, USA) with statistical significance set at a value of $\alpha = 0.05$.

Results

FTIR analysis

The mean and standard deviation values of $\nu_1 \text{OH}^-$ and $\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$ are shown in Fig. 1. The $\nu_1 \text{OH}^-$ values were significantly higher at the period of 1 h ($P = 0.017$) compared to periods of 3 and 6 h in the positive control and experimental groups. However, a significant difference was found for the negative control group compared to the positive and experimental groups at 1 h ($P = 0.002$). The $\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$ values were not significantly different between the solutions and storage time ($P > 0.1$).

Cell viability assay

The cell viability evaluated by XTT is shown in Fig. 2a. No significant difference was found between the experimental and control groups ($P = 0.23$). The cell viability evaluated by NR is shown in Fig. 2b. At 1 h, only SM was similar to the control group ($P = 0.151$). At 3 h, all groups had variability that was similar to the control group ($P = 0.32$). WM had significantly lower viability than SM at 6 h ($P < 0.001$), and all groups were significantly different compared to the control group at this time period ($P < 0.001$), except SM, which was similar to the control group ($P = 0.713$). For the viability determined by SRB (Fig. 2c), no significance difference was found between the experimental and control groups at 1 h and 3 h. At 6 h, only SM was similar to the control group ($P = 1.000$).

Discussion

The first null hypothesis was accepted, because cell viability analysis performed using the XTT assay revealed similar results for all storage media compared with the positive control group (DMEM). The second null hypothesis was rejected, and the negative control (dried dentine) had lower levels of OH^- at 1 h. This study employed a multiparametric assay to evaluate the cell viability for the following three parameters: XTT, NR and SRB. The simultaneous

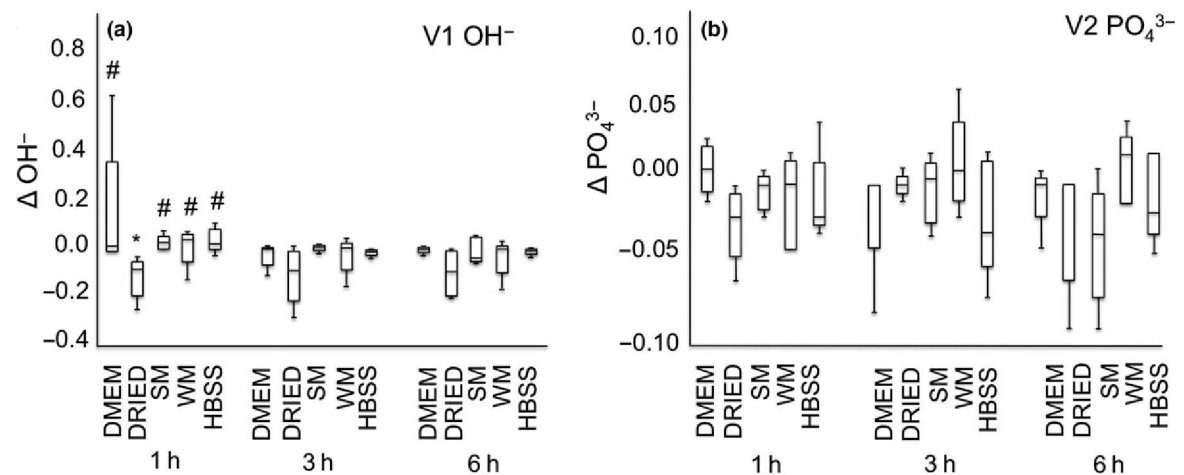


Figure 1 FTIR analysis at 1, 3 and 6 h for parameters OH^- (a) and $-\text{PO}_4^{3-}$ (b). DMEM: positive control group. Dried, negative control group; SM, soya milk; WM, whole milk; HBSS, Hank's balanced salt solution. * $P < 0.05$ compared with positive control group (DMEM). # $P < 0.05$ compared with negative control group.

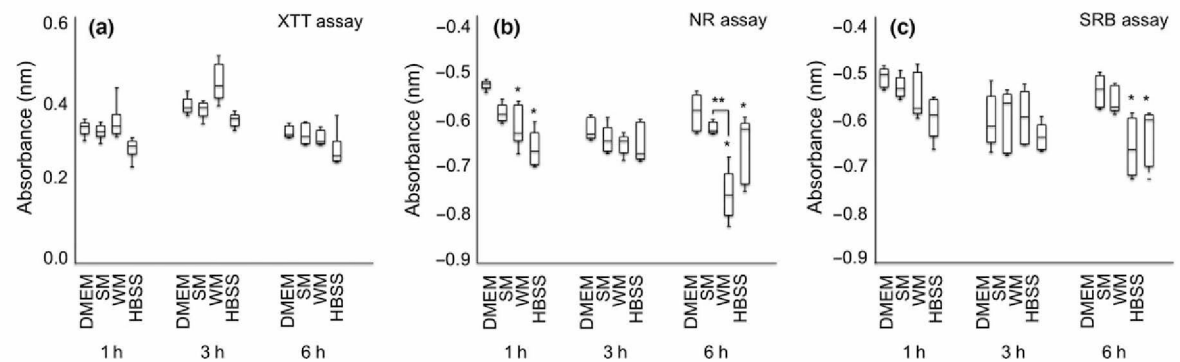


Figure 2 Analysis of absorbance values (cell viability) at 1, 3 and 6 h by XTT (a), NR (b) and SRB (c) assay. DMEM, positive control group; SM, soya milk; WM, whole milk; HBSS, Hank's balanced salt solution. * $P < 0.05$ compared with positive control group (DMEM). ** $P < 0.05$ compared between the experimental groups.

evaluation of different cell viability parameters increases the chance of detecting the possible cytotoxic effects of the storage medium on HGF cells (De-Deus *et al.* 2009, Scelza *et al.* 2012). The principle of the XTT test consists of identifying viable cells through the ability of their mitochondrial enzymes to convert XTT to a soluble salt (Scelza *et al.* 2012). Coloured substances may inhibit dehydrogenases, which can lead to erroneous results. As a consequence media without phenol red were used, increasing the sensitivity of the assay. The NR assay is based on the capacity of viable cells to integrate neutral red dye within lysosomes, and the quantity of the dye incorporated into cells is proportional to the number of cells that lack a damaged membrane. The SRB test

involves a sensitive toxicology marker; the dye electrostatically binds to cellular proteins such that the number of cells is correlated with the total protein content. The association of these methods allows for correlation of different parameters and increases the validity of the results (Scelza *et al.* 2012).

The results revealed that SM tended to perform better than WM according to the NR assay. However, previous studies revealed conflicting results about the ability of WM to maintain cell viability over time (Silva *et al.* 2013, Moura *et al.* 2014). The reduced viability of cells stored in WM may be explained by changes in their characteristics for longer periods. It has been hypothesized that the pH of milk decreases over time, which results in an inadequate environment for

preserving cell viability (Blomlöf & Otteskog 1980, Moura *et al.* 2014). Furthermore, the present study used different cell models, including fibroblasts (HGF), the predominant gingival connective tissue. Despite the similarity in the morphology of fibroblasts and PDL cells, their characteristics in culture are different (Scheres *et al.* 2010). However, studies on immortalized cell cultures provide complementary models with easy reproducibility, which justifies their use.

FTIR analysis was performed to examine the changes that could occur in the composition of root dentine after storage in the media. The specimens were previously stored in distilled water alone to avoid any negative influence on dentine composition. The OH^- ($3720\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$) and PO_4^{3-} ($1180\text{--}920\text{ cm}^{-1}$) regions were analysed; these are associated with water and mineralized dentine, enabling examination of alterations connected to the loss of collagen and demineralization of dentine (Eliades *et al.* 2013, Feitosa *et al.* 2013). Therefore, FTIR was used to evaluate the chemical interactions and ultra-morphology changes on the dentine surface (Eliades *et al.* 2013, Feitosa *et al.* 2013), demonstrating it is a useful tool in dental research. At present, this study is the first published report of the use of FTIR to analyse the storage media used for avulsed teeth. The FTIR results demonstrated a significant decrease in OH-bonds, resulting in dehydration of the tooth with time, which may influence cell viability (Trope 2011).

The better performance of SM in most tests may be due to its nutritional properties. The process of grinding the soya beans with water preserves the proteins of the soluble carbohydrates, unsaturated fats, vitamins and minerals present in soya beans. One of the advantages of this solution compared to other products is the rich source of phyto-oestrogens such as isoflavones, including genistein, daidzein and glycitein (Nourozi *et al.* 2015). These components may positively influence cell growth and proliferation because antioxidant elements may increase the success of replantation (Buttke & Trope 2003). Antioxidant agents facilitate the decomposition of hydrogen peroxide (H_2O_2) to water, protecting cells from oxygen radical-mediated damage (Halliwell & Gutteridge 1990). Considering the difference in the chemical composition of the storage media might increase cell viability (Gopikrishna *et al.* 2008b), studies have shown its effectiveness can also be influenced by time (Huang *et al.* 1996, Souza *et al.* 2010), which is supported by the results of the present study. Considering that avulsed teeth are generally not quickly reimplanted,

the teeth should be stored in an adequate environment until replantation (Gopikrishna *et al.* 2008a). Thus, the present study was designed to evaluate storage times of 1, 3 and 6 h to be clinically relevant. The extraoral time and storage medium are considered critical factors for prognosis of avulsed teeth (Moreira-Neto *et al.* 2009, Caglar *et al.* 2010). After avulsion, the PDL cells are deprived of blood supply, which is necessary to maintain their cell metabolism. As the prognosis of replanted teeth is correlated with the amount of viable PDL cells, the storage medium should maintain cell viability over extended periods (Caglar *et al.* 2010). In the current study, long storage periods affected cell viability considering that in the NR and SRB assay, all solutions had decreased performance at 6 h compared to the positive control group (DMEM) and only SM was similar to DMEM. In addition, FTIR analysis also confirmed the effect of storage time on dentine characteristics as the time at 1 h was associated with the best performance of all solutions for root dentine composition, and it remained more hydrated during this period. The three time periods that were evaluated correspond to storage situations that are standard (1 h), moderate (3 h) and extreme (6 h), which reduce the effectiveness of the storage media. Extrapolating the results to clinical practice, it may be inferred that even in storage solutions with power nutrients, the tooth should not be stored for periods exceeding 1 h, which probably compromises the prognosis of replantation. Despite the favourable results found in this preliminary study, more studies need to be conducted *in vitro* and *in vivo* with different methodologies to evaluate the capacity of these media to safely transport avulsed teeth.

Conclusion

Soya milk performed better in maintaining cell viability, whereas the solutions behaved similarly with respect to the dentine composition. The comparison of different assay methods is promising for improving cell viability analysis. The time at 1 h is a clinically crucial factor in the prognosis of dental replantation because the teeth remain better hydrated, contributing to the maintenance of cell viability.

Acknowledgements

This study was supported by the Research Support FAPEMIG APQ 02145-14, Foundation of the State of Minas Gerais, CNPq 474505/2013-8 and CAPES.

Conflict of interest

The authors have stated explicitly that there are no conflict of interests in connection with this article.

References

- Andersson L, Andreasen JO, Day P *et al.* (2012) 1. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dental Traumatology* **28**, 88–96.
- Barrett EJ, Kenny DJ (1997) Avulsed permanent teeth: a review of the literature and treatment guidelines. *Endodontics Dental Traumatology* **13**, 153–63.
- Blomlöf L, Otteskog P (1980) Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. *Scandinavian Journal of Dental Research* **88**, 436–40.
- Buttke TM, Trope M (2003) Effect of catalase supplementation in storage media for avulsed teeth. *Dental Traumatology* **19**, 103–8.
- Caglar E, Sandalli N, Kuseu OO *et al.* (2010) Viability of fibroblasts in a novel probiotic storage media. *Dental Traumatology* **26**, 383–7.
- De-Deus G, Canabarro A, Alves G, Linhares A, Senne MI, Granjeiro JM (2009) Optimal cytocompatibility of a bio-ceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. *Journal of Endodontics* **35**, 1387–90.
- DeSteno CV, Feagin FF (1975) Effect of matrix bound phosphate and fluoride on mineralization of dentine. *Calcified Tissue International* **17**, 151–9.
- Eliades G, Mantzourani M, Labella R, Mutti B, Sharma D (2013) Interactions of dentine desensitisers with human dentine: morphology and composition. *Journal of Dentistry* **41**, S28–39.
- Feitosa VP, Bazzocchi MG, Putignano A *et al.* (2013) Dicalcium phosphate ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) precipitation through ortho- or meta-phosphoric acid-etching: effects on the durability and nanoleakage/ultra-morphology of resin-dentine interfaces. *Journal of Dentistry* **41**, 1068–80.
- Gopikrishna V, Baweja PS, Venkateshbabu N, Thomas T, Kandaswamy D (2008a) Comparison of coconut water, propolis, HBSS, and milk on PDL cell survival. *Journal of Endodontics* **34**, 587–9.
- Gopikrishna V, Thomas T, Kandaswamy D (2008b) A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **105**, 61–5.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1990) The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives Biochemistry Biophysics* **280**, 1–8.
- Hidalgo MM, Itano EN, Consolaro A (2005) Humoral immune response of patients with dental trauma and consequent replacement resorption. *Dental Traumatology* **21**, 218–21.
- Huang SC, Remeikis NA, Daniel JC (1996) Effects of long-term exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions. *Journal of Endodontics* **22**, 30–3.
- Khaustova S, Shkurnikov M, Tonevitsky E, Artyushenko V, Tonevitsky A (2010) Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *Analyst* **135**, 3183–92.
- Legeros RZ (1991) Calcium phosphates in enamel, dentine and bone. In: Myers HM, ed. *Calcium Phosphate in Oral Biology and Medicine*. Karger: New York, USA, pp. 108.
- Magne D, Bluteau G, Lopez-Cazaux S *et al.* (2004) Development of an odontoblast in vitro model to study dentine mineralization. *Connective Tissue Research* **45**, 101–8.
- Moazami F, Mirhadi H, Geramizadeh B, Sahebi S (2012) Comparison of soymilk, powdered milk, Hank's balanced salt solution and tap water on periodontal ligament cell survival. *Dental Traumatology* **28**, 132–5.
- Moreira-Neto JJ, Gondim JO, Raddi MS, Pansani CA (2009) Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. *International Endodontic Journal* **42**, 827–30.
- Moura CCG, Soares PBF, Reis MV, Fernandes Neto AJ, Soares CJ (2012) Soy milk as a storage medium to preserve human fibroblast cell viability: an in vitro study. *Brazilian Dental Journal* **23**, 559–63.
- Moura CC, Soares PB, de Paula Reis MV, Fernandes Neto AJ, Zanetta Barbosa D, Soares CJ (2014) Potential of coconut water and soy milk for use as storage media to preserve the viability of periodontal ligament cells: an in vitro study. *Dental Traumatology* **30**, 22–6.
- Nourozi M, Haghollahi F, Ramezanzadeh F, Hanachi P (2015) Effect of soy milk consumption on quality of life in Iranian postmenopausal women. *Journal of Family & Reproductive Health* **9**, 93–100.
- Prati S, Sciutto G, Bonacini I, Mazzeo R (2016) New frontiers in application of FTIR microscopy for characterization of cultural heritage materials. *Topics in Current Chemistry* **374**, 26.
- Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG (2012) A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *International Endodontic Journal* **45**, 12–8.
- Scheres N, Laine ML, de Vries TJ, Everts V, van Winkelhoff AJ (2010) Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* **45**, 262–70.
- Silva EJ, Rollemberg CB, de Souza Coutinho-Filho T, Zaia AA (2013) A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of soy milk with different storage media. *Dental Traumatology* **29**, 319–22.
- Souza BDM, Lückemeyer DD, Felipe WT, Simões CM, Felipe MC (2010) Effect of temperature and storage

- media on human periodontal ligament fibroblast viability. *Dental Traumatology* **26**, 271–5.
- Souza BD, Lückemeyer DD, Reyes-Carmona JF, Felipe WT, Simões CM, Felipe MC (2011) Viability of human periodontal ligament fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and coconut water as storage media. *International Endodontic Journal* **44**, 111–5.
- Trope M (2011) Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dental Traumatology* **27**, 281–94.
- Zhang X, Neoh KG, Lin CC, Kishen A (2012) Remineralization of partially demineralized dentine substrate based on a biomimetic strategy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **23**, 733–42.

Capítulos

3.2 CAPÍTULO 2

Replanted teeth stored in a newly developed powdered coconut water formula.

Artigo a ser enviado para publicação no periódico Dental Traumatology

Replanted teeth stored in a newly developed powdered coconut water formula

Manuella Verdinelli de Paula Reis,^a Camilla Christian Gomes Moura,^b Aletheia Moraes Rocha,^a Priscilla Barbosa Ferreira Soares,^c Cristiane Clemente de Mello Salgueiro,^d Márcia Helena Niza Ramalho Sobral,^d Carlos José Soares^{a*}

^a Biomechanics Research Group, Department of Operative Dentistry and Dental Materials, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

^b Department of Endodontics, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

^c Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Implantology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

^d Veterinary Sciences Institute, Ceará State University, Fortaleza, Brazil.

Running title: Storage of the avulsed teeth

Keywords: Avulsed tooth, histologic analysis, replantation, storage media

***Corresponding Author**

Prof. Carlos José Soares, DDS, MSc, PhD

Biomechanics Research Group, Department of Operative Dentistry and Dental Materials,

Federal University of Uberlândia, MG, Brazil

Av Pará 1720, Campus Umuarama, Block 4L, annex B, Uberlândia, MG, Brazil.

Zip-Code: 38405-328

E-mail address: carlosjsoares@ufu.br

ABSTRACT

Introduction: A newly developed powdered coconut water formula (ACP-404) has been proposed to preserve periodontal ligament cell viability. This study investigated the periodontal healing process of dog teeth replanted after storage in ACP-404 with two different osmolalities (ACP-404 I, ACP-404 II), in coconut water long-shelf (CW), or in pH-neutralized coconut water long-shelf (pH-CW) by histomorphometric analysis compared with immediate replantation and dry conditions.

Methods: Sixty roots of 10 adult beagle dogs were extracted and randomly subjected to the following protocols: immediate replantation after extraction (positive control); dry conditions (negative control); and storage in ACP-404 I, ACP-404 II, CW, or pH-CW for 50 minutes before replantation. The animals were euthanized 28 days postoperatively and processed for histomorphometric analysis using an optical microscope. The data were statistically analysed using the Kruskal-Wallis test with post-analysis using Dunnett's test.

Results: ACP-404 I and pH-CW performed similarly to the positive control group in the normal periodontium condition ($p < 0.05$). ACP-404 I presented the lowest level of surface resorption compared to the other groups ($p < 0.05$). However, all storage solutions had similar periodontal conditions for repaired resorption areas, inflammatory root resorption, ankylosis, and replacement resorption ($p > 0.05$).

Conclusions: ACP-404 I presented better performance and was able to preserve the normal periodontium and avoid higher levels of surface resorption.

Key Words: Avulsed tooth, histologic analysis, replantation, storage media.

INTRODUCTION

In most cases of avulsion, the long-term prognosis of replanted teeth is influenced by significant extra-alveolar time and dry or inadequate wet storage (1, 2). Furthermore, it is known that the major causes of replantation failure and tooth loss are associated with ankylosis and root resorption (3). Thus, it is important the teeth should be stored in a medium capable of maintaining periodontal ligament (PDL) cell viability (3, 4). To allow cell survival, the potential storage medium must have nutritional substances, appropriate pH, physiological osmolality (5), and accessibility (6). Considering these requirements, studies have proposed coconut water (CW) as a storage medium for avulsed teeth (3, 4, 7). CW contains amino acids, proteins and minerals, which are essential for nourishing and preserving the viability of PDL cells (4). However, CW possesses an acid pH that compromises cell metabolism (3, 8), and thus it is important to use some substance able to maintain a neutral pH for a long time (7, 9). Considering this requirement, studies have been performed using NaHCO_3 (7) and triethanolamine (9-12) to neutralize the pH of CW, allowing its use as a storage media for avulsed teeth. However, it is not possible to adjust the pH of CW to 7.0 in domestic conditions. To address this limitation, a powdered coconut water (ACP-404) with adjusted pH and osmolality was developed, which can be reconstituted in filtered water. Recently, an *in vitro* study was conducted using three different formulations of ACP-404 for PDL cell preservation, which confirmed its ability to preserve PDL cells and indicated its use as a storage medium (11). However, until now, no *in vivo* study has been performed evaluating the effects of ACP-404 as a storage medium for avulsed teeth. As *in vitro* studies need to be validated by *in vivo* animal analysis before clinical tests, the purpose of the current study was to evaluate the healing process of dog teeth replanted after storage in two different formulations of ACP-404, with neutral pH and different osmolalities values (closer to that of blood plasma; and greater than this value), by histomorphometrical analysis. The null hypotheses were 1) ACP-404 I and ACP-404 II used as storage media for avulsed teeth would exhibit similar performance to pH-CW neutralized with triethanolamine and 2) ACP-404 I and ACP-404 II are similar to immediate replantation.

MATERIALS & METHODS

This study was approved by the local Animal Ethics Committee (Protocol No. 101). A total of ten adult beagle dogs of 18 months of age and weighing 5.55 – 7.10 kg were used. Sixty mature incisors were selected for extraction and were randomly assigned to the groups, totalling 10 teeth in each group. The animals were pre-anesthetized intramuscularly with atropine sulphate base (Atropion; Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas, São Paulo, SP, Brazil; 0.04 mg/kg body weight). Then, the animals were anesthetized by intramuscular injection using xylazine hydrochloride (Anasedan; AgriBrands Ltda, São Paulo, SP, Brazil; 1 mg/kg body weight) and a 1:1 combination of tiletamine hydrochloride and zolazepam hydrochloride (Zoletil 50; Virbac S.A., Carros, France; 50 mg/kg body weight). As a complementary local anaesthetic, 2% mepivacaine (DFL; Indústria de Comércio S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brazil) was administered (Sottovia et al., 2010). The teeth were extracted using elevators and forceps as atraumatically as possible and immediately stored in the experimental solutions at room temperature for 50 minutes: CW long-shelf (Ducoco, Linhares, ES, Brazil; 445 mOsm kg⁻¹ H₂O, pH 4.88); pH-CW long-shelf with the pH adjusted using triethanolamine (Bothânica, Uberlândia, MG, Brazil; 443 mOsm kg⁻¹ H₂O, pH 7.27); and ACP-404 I (250 mOsm kg⁻¹ H₂O, pH 7.0); ACP-404 II (372 mOsm kg⁻¹ H₂O, pH 7.0). The ACP-404 formulations were prepared with 100 mL of filtered H₂O. The positive control group consisted of immediately replanted teeth, which were only irrigated with a 0.9% saline solution (0.9% sodium chloride, Drogasil S.A, Uberlândia, MG, Brazil). For the negative control group, the crown was attached to a piece of wax, and the root was exposed to air for 50 minutes.

After this time, the teeth were replanted in the socket using light finger pressure and splinted with semi-rigid contention for 14 days. After 28 days, the dogs were euthanized using a massive dose of intravenous sodium pentobarbital at 100 mg/kg body weight, and the replanted teeth were removed in blocks. The specimens were fixed in a 10% formalin solution for 48 h, decalcified in 10% formic acid, separated into thirds (cervical, middle, and apical), and embedded in paraffin. The samples were sectioned perpendicular to the long axes of the roots in step-serial sections (5 µm) at approximately 100 µm intervals and stained with haematoxylin and eosin.

Histomorphometrical Analysis

Five sections per root third (fifteen per root) were analysed around the entire perimeter. The images of the root were captured under 4x magnification using a digital camera (DXM-1200, Nikon, Tokyo, Japan) attached to an optical microscope (Nikon Eclipse E200). All of the root perimeters were measured using the Motic Images Advanced 3.2 software (Moticam Pro 252B, Tokyo, Japan). The roots were analysed according to the characteristics observed in the normal periodontium, repaired resorption areas, inflammatory root resorption, ankylosis, replacement resorption, and surface resorption (10; Table 1). The total perimeter and the perimeter corresponding to each event were measured in micrometres and transformed into percentages for statistical analysis.

Statistical Analysis

The data were analysed for normality using the Shapiro-Wilk test and equality of variances using Levene's test. The significance of the difference among the groups was determined by Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). Dunnett's test was used to define significant differences for each periodontal condition between experimental groups compared with the controls ($p < 0.05$). The statistical analysis was performed using the Sigma Plot 12.0 software (Systat Software, San Jose, CA, USA), and statistical significance was accepted at $\alpha=0.05$.

RESULTS

Histomorphometrical Analysis

The normal periodontium condition was significantly higher for the ACP-404 I group than for the CW and ACP-404 II groups ($p < 0.001$; Fig. 1A). When was compared the positive control group with all groups, similar normal periodontium conditions was found, except for the CW and negative control groups ($p < 0.001$; Fig. 1A), which showed similar results to each other. The level of surface resorption was significantly lower for ACP-404 I group than for the other experimental groups ($p < 0.001$; Fig. 1B). The ACP-404 I and pH-CW groups presented similar levels of surface resorption to the positive control group ($p < 0.001$; Fig. 1B). The highest levels of surface resorption were found in the negative control group ($p < 0.001$; Fig. 1B). All storage solutions resulted in similar periodontal conditions for the repaired resorption areas, inflammatory root resorption,

ankylosis, and replacement resorption ($p > 0.05$; Fig. 1C-F). Illustrative images of the periodontal conditions evaluated are shown in Fig. 2A-F.

DISCUSSION

The first null hypothesis was partially accepted, as ACP-404 II performed similarly to pH-CW, which was previously demonstrated to be an effective storage medium *in vivo* (10) and *in vitro* (9) studies. However, the ACP-404 I formulation presented lower levels of surface resorption than pH-CW. The second hypothesis was rejected as teeth stored in ACP-404 II showed significantly more surface resorption than immediately replanted teeth (positive control group). In fact, ACP-404 II also presented higher values of surface resorption than ACP-404 I, which indicates that the former solution is probably more effective as a storage medium. On the other hand, both ACP-404 formulas exhibited similar abilities to maintain normal periodontium to the positive control, which mimics immediate replantation. These findings corroborate with previous *in vitro* results (11) demonstrating that ACP-404 I and ACP-404 II exhibited similar levels of ability to maintain cell viability to the positive control group, which represents the best clinical situation in cases of avulsion (13-15).

The differences observed in histomorphometric analysis between ACP-404 I and pH-CW may be related to different pH control systems. The group pH-CW, which used triethanolamine as a neutralizer agent, was included in the current research due to favourable results in previous studies (9-12). However, the use of this substance as a neutralizing agent is not feasible under home and school conditions. Additionally, CW presents rapid deterioration even in the long-shelf preparation, rendering its use as a tooth preservation medium unfeasible. Considering these limitations, it was proposed the development of a product with pre-established pH and osmolality, able to maintain the excellent nutritional properties of CW, with a longer shelf-life and the ability to be stored for long periods – ACP-404. Initially, three different formulations were proposed, with osmolalities ranging from 250 to 372 mOsm kg⁻¹ H₂O (ACP-404 I, ACP-404 II, and ACP-404 III). However, the *in vitro* results (11) showed poorer performance by the ACP-404 III formulation (300 mOsm kg⁻¹ H₂O, pH 7.4), which was excluded in this study. Those findings were probably attributable to the sodium phosphate dibasic anhydrous used as a pH neutralizer in the ACP-404 III formulation, rendering it inadequate for preserving the viability of periodontal ligament cells. However, the formulations ACP-404 I and ACP-

404 II, which presented similar results *in vitro* (11), showed statistically significant differences in the current study regarding the normal periodontium condition and surface resorption. The findings confirm the need for *in vivo* studies to validate the results obtained *in vitro*. Considering that the two different formulas ACP-404 I and ACP-404 II were subjected to the same pH control system (using glycine), the differences observed in the histomorphometric analysis may have some relation to the differences in osmolality. Though the influence of osmolality on cell survival was initially discarded in the *in vitro* analysis (11), the methodology used in that study did not allow evaluation the interaction between other cell elements present in the periodontal membrane that participate in the immunological response related to periodontal healing or root resorption (10,16).

The unfavourable performance of CW, similar to dry conditions (negative control), with higher values of surface resorption, is probably related to its acidic pH, which affects cell metabolism (3, 4). Though the current literature shows conflicting results regarding the potential use of CW as a storage medium (3-5, 17, 18), recent studies confirm the importance of adjusting the pH of the CW (7, 10-12), which has proven to be an essential step for its use as an interim storage medium for avulsed teeth. On the other hand, the percentages of ankylosis and replacement resorption in the CW and negative control groups were extremely low and showed no differences from the other experimental groups. These findings were especially surprising in the negative control group because the teeth were not placed in any storage solution for 50 minutes. Although it is not possible to state the reasons for these results, it is possible that the vast experience of the surgical team resulted in minimal trauma during the extraction of the teeth, which limited the damage to the PDL cells and cement, consequently contributing to the prognosis of replantation. Another factor that probably contributed to the low percentage of unfavourable events in all studied groups was the short time during which the teeth were out of the alveolus, which may have limited the damage to the cells. This period was chosen according to previous *in vivo* researches using animal model to avulsion (10, 14). Regarding the lack of inflammatory resorption, it was expected to be minimal in all studied groups, as demonstrated previously in a study using similar methodology (10). Despite the pulp necrosis observed in all sections, these findings support the idea that endodontic treatment can be postponed for up to 40 days without impairing the periodontal healing (19). However, this experimental model was used under aseptic

conditions, and in the clinical practice, the avulsed teeth are susceptible to contamination depending on the conditions of the accident, reducing the period recommended for endodontic treatment to 10 days (2). Despite the limitations of preclinical models using animals, this step is essential for improving patient treatment outcomes. Dogs are often used as a model for replantation as they show similar wound-healing processes to humans (20).

Though the methodology used in this study did not exactly determine the mechanisms responsible for the higher levels of normal periodontium and lower levels of resorption under the hyposmotic conditions observed in the teeth previously stored in ACP-404-I. The current findings are satisfactory for selecting this formulation as a potential commercial product for the storage of avulsed teeth.

CONCLUSION

This *in vivo* study confirmed the potential of ACP-404 I as a possible new storage medium for avulsed teeth, which was able to preserve the normal periodontium and limit the level of surface resorption. Additionally, this study demonstrated that the adjustment of the pH of coconut water is essential to maintain the normal periodontium.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from FAPEMIG APQ 02145-14, CAPES and CNPq 474505/2013-8. The authors report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

1. Soares Ade J, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. Relationship between clinical-radiographic evaluation and outcome of teeth replantation. *Dent Traumatol* 2008;124: 183-8.
2. Andersson L, Andreasen JO, Day P et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol* 2012;28:88-96.
3. Souza BD, Lückemeyer DD, Reyes-Carmona JF, Felipe WT, Simões CM, Felipe MC. Viability of human periodontal ligament fibroblasts in milk, Hank's

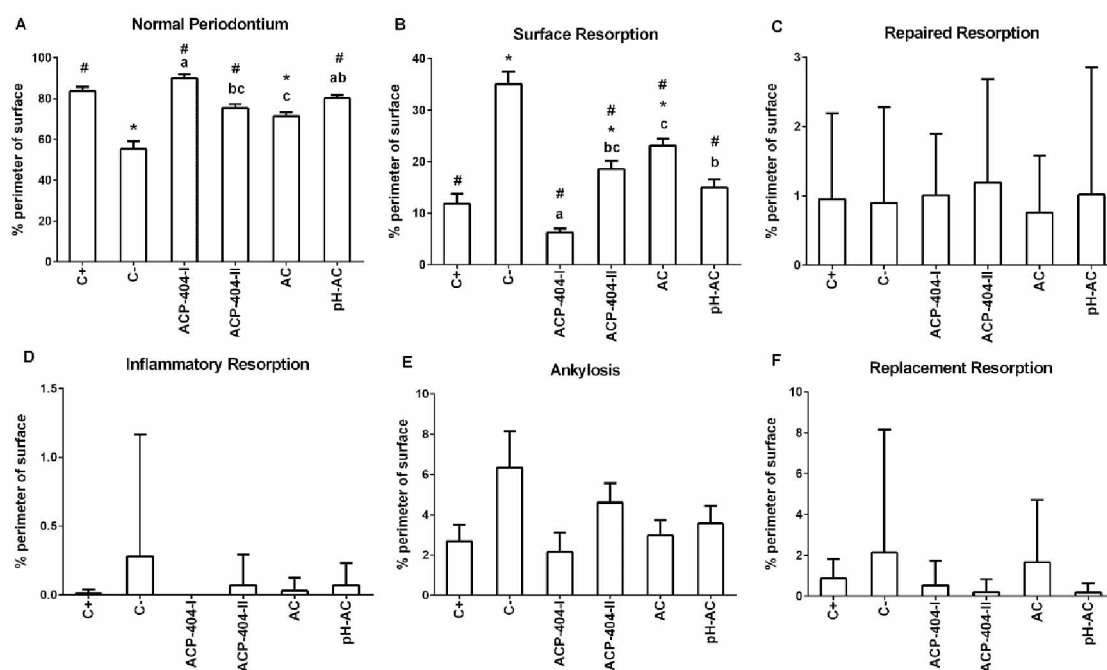
- balanced salt solution and coconut water as storage media. *Int Endod J* 2011;44:111-5.
4. Gopikrishna V, Thomas T, Kandaswamy D. A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008a;105:61-5.
 5. Pearson RM, Liewehr FR, West LA, Patton WR, McPherson JC 3rd, Runner RR. Human periodontal ligament cell viability in milk and milk substitutes. *J Endod* 2003;29:184–6.
 6. Huang SC, Remeikis NA, Daniel JC. Effects of long-term exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions. *J Endod* 1996;22:30-3.
 7. Moreira-Neto JJ, Gondim JO, Raddi MS, Pansani CA. Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. *Int Endod J* 2009;42:827-30.
 8. Silva EJ, Rollemberg CB, de Souza Coutinho-Filho T, Zaia AA. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of soy milk with different storage media. *Dent Traumatol* 2013;29:319-22.
 9. Moura CC, Soares PB, de Paula Reis MV, Fernandes Neto AJ, Zanetta Barbosa D, Soares CJ . Potential of coconut water and soy milk for use as storage media to preserve the viability of periodontal ligament cells: an in vitro study. *Dent Traumatol* 2014;30:22-6.
 10. de Paula Reis MV, Moura CC, Soares PB et al. Histologic and micro-computed tomographic analyses of replanted teeth stored in different kind of media. *J Endod* 2014;40:665-9.
 11. Moura CC, Soares PB, Reis MV, et al. Powdered coconut water as a storage medium to preserve the viability of periodontal ligament cells: a laboratory study. *Int Endod J* 2017;50:84-89.
 12. Soares PBF, Rocha AM, Reis MVP, Moura CCG, Soares CJ. Evaluation of coconut water neutralized by different agents on the viability of human fibroblasts: an in vitro study. *Rev Odontol UNESP* 2016;45:234-9.
 13. Andreasen JO. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Int J Oral Surg* 1981;10:43–53.

14. Andreasen JO, Kristerson L. The effect of limited drying or removal of the periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Acta Odontol Scand* 1981;39:1–13.
15. Andreasen JO, Andreasen FM, Skeie A, Hjørting-Hansen E, Schwartz O. Effect of treatment delay upon pulp and periodontal healing of traumatic dental injuries – a review article. *Dent Traumatol* 2002;18:116–28.
16. Sottovia AD, Sottovia Filho D, Poi WR, Panzarini SR, Luize DS, Sonoda CK. Tooth replantation after use of Euro-Collins solution or bovine milk as storage medium: a histomorphometric analysis in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:111-9.
17. Gopikrishna V, Baweja PS, Venkateshbabu N, Thomas T, Kandaswamy D. Comparison of coconut water, propolis, HBSS, and milk on PDL cell survival. *J Endod* 2008b;34:587-9.
18. Macway-Gomez S, Lallier TE. Pedialyte promotes periodontal ligament cell survival and motility. *J Endod* 2013;39:202-7.
19. Azevedo PC, Moura CC, Zanetta-Barbosa D, Bernadineli N. Time of endodontic treatment in autogenic transplants of mature teeth: histological study in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:287-93.
20. Andreasen JO, Andersson L. Critical considerations when planning experimental in vivo studies in dental traumatology. *Dent Traumatol* 2011;27:275-80.

TABLE

Table 1. Characterization of the phenomena evaluated.

Phenomena	Characteristics
Normal periodontium	No evidence of inflammatory cells. Presence of an intact cementum layer surface surrounded by connective tissue.
Surface resorption	Shallow areas of resorption in root, possibly extending to dentin, without inflammatory cells.
Inflammatory resorption	Extensive resorption of root accompanied by inflammatory cells, with osteoclasts generally present.
Ankylosis	Obliteration of the periodontal ligament space resulting in bone and dentin contact.
Replacement resorption	Areas of direct bony union with dentin with resorption of cementum and dentin.
Repaired resorption areas	Resorption cavities filled with cementum or cementum –like tissue.

FIGURES**Figure 1.** Results of histological analyses of the A) Normal periodontium. B) Surface resorption. C) Repaired resorption. D) Inflammatory resorption. E) Ankylosis. F)

Replacement resorption. Statistical significance was determined using Kruskal-Wallis and Dunnett's tests. Different letters compared between the experimental groups ($p < 0.05$). * $p < 0.05$ compared with the positive control (immediate replantation). # $p < 0.05$ compared with the negative control (dry conditions). Error bars represent the standard deviation of the mean.

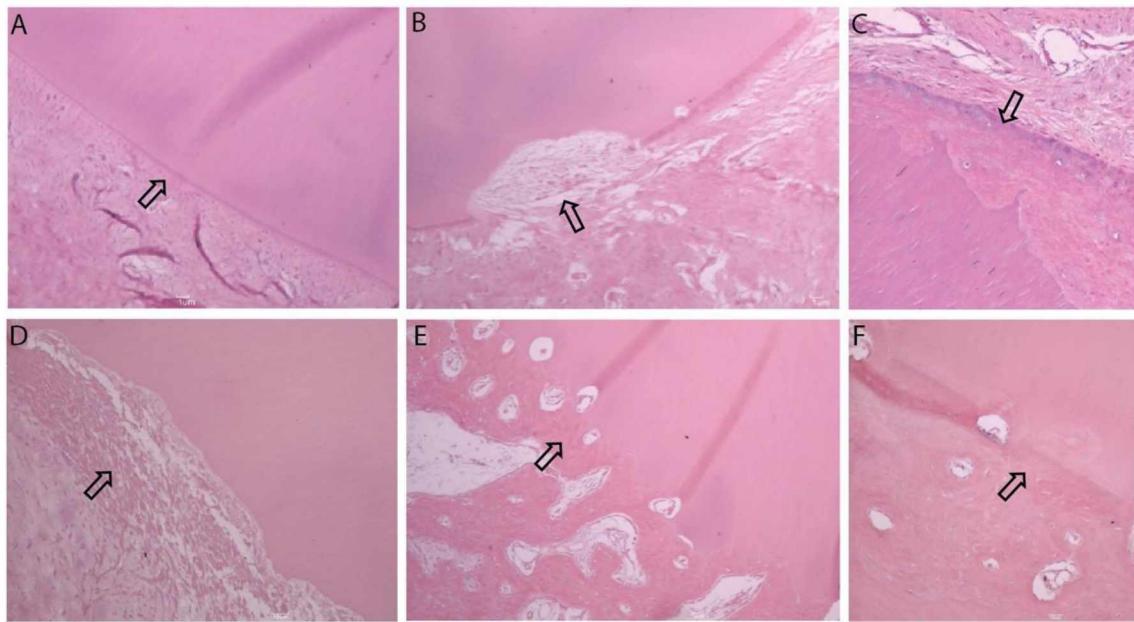


Figure 2. Histological images of A) Normal periodontium – organized PDL with collagen fibres and cementum layer (arrow). B) Surface resorption with cavity areas (arrow). C) Presence of reparative tissue (arrow) and delayed reorganization of PDL fibres. D) Inflammatory root resorption area with destruction of root dentin (arrow). E) The bone tissue occupies an area of resorbed dentin, characteristic of replacement resorption (arrow). F) Ankylosis areas (arrow) (magnification 10X).

Capítulos

3.3 CAPÍTULO 3

Effect of lectin (ScLL) on fibroblasts stimulated with LPS – an in vitro study.

Artigo publicado no periódico Brazilian Oral Research

Effect of lectin (ScLL) on fibroblasts stimulated with LPS – an *in vitro* study

Manuella Verdinelli de Paula REIS^(a)
Camilla Christian Gomes MOURA^(b)
Marcus Vinicius da SILVA^(c)
Maria Aparecida de SOUZA^(d)
Priscilla Barbosa Ferreira SOARES^(e)
Carlos José SOARES^(a)

^(a)Universidade Federal de Uberlândia – UFU, School of Dentistry, Biomechanics Research Group, Department of Operative Dentistry and Dental Materials, Uberlândia, MG, Brazil.

^(b)Universidade Federal de Uberlândia – UFU, School of Dentistry, Biomechanics Research Group, Department of Endodontics, Uberlândia, MG, Brazil.

^(c)Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM, Institute of Biomedical Sciences, Department of Immunology, Uberaba, MG, Brazil.

^(d)Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Institute of Biomedical Sciences, Department of Immunology, Uberlândia, MG, Brazil.

^(e)Universidade Federal de Uberlândia – UFU, School of Dentistry, Biomechanics Research Group, Department of Periodontology and Implantology, Uberlândia, MG, Brazil.

Declaration of Interests: The authors certify that they have no commercial or associative interest that represents a conflict of interest in connection with the manuscript.

Corresponding Author:

Carlos José Soares
E-mail: carlosjssoares@ufu.br

DOI: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0140

Submitted: Dec 8, 2015
Accepted for publication: Jul 28, 2016
Last revision: Nov 11, 2016

Abstract: The lectin (ScLL) extracted from the *Synadenium carinatum* plant has been evaluated as an immunomodulator in diseases such as asthma, neosporosis and leishmaniasis. However, it has not yet been evaluated in the oral cavity. This study evaluated the effect of ScLL on viability, proliferation and release of IL-10 in human gingival fibroblasts (HGF) stimulated with lipopolysaccharide (LPS). HGF were stimulated with LPS 1 µg/ml and treated with ScLL in concentrations of 10, 5 and 2 µg/ml for 1 and 5 h, and evaluated by flow cytometry for viability, apoptosis (initial/advanced) and necrosis. The supernatant was collected to detect release of IL-10 by ELISA. The proliferation was assessed with the BrdU assay. Positive control consisted of cells maintained in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), and the negative control, of those kept in tap water. Data were analyzed by ANOVA and Dunnett's test ($\alpha = 0.05$). No significant difference was found for ScLL concentrations regarding viability or initial and advanced apoptosis ($p=0.455$). All the groups, including the positive control, had a significantly lower necrosis parameter than negative control at 5 h ($p < 0.001$). No difference was found for proliferation among the experimental groups ($p = 0.832$). ScLL at 5 and 2 µg/ml resulted in a lower release of IL-10 than positive and negative controls at 5 h ($p = 0.047$). The results indicated that ScLL concentrations tested were not cytotoxic, and had no effect on proliferation and release of IL-10 parameters. A thorough understanding of ScLL, regarding its immunomodulatory potential, may open the door to new perspectives for dentistry.

Keywords: Mannose-binding Lectin; Fibroblasts; Lipopolysaccharides; Cell Survival; Tooth Avulsion.

Introduction

Dental avulsion is considered a severe dental trauma resulting from the complete displacement of a tooth from its alveolar socket. The periodontal ligament (PDL), alveolar bone, gingival mucosa and dental pulp tissue are frequently affected.^{1,2} The damage may be irreversible, resulting in root resorption, ankylosis or tissue necrosis, which influence tooth replantation prognosis.^{1,2,3} Considering that immediate replantation is not always possible, it is important to preserve the PDL cells for successful replantation of the avulsed tooth.^{1,2} Studies have been performed to determine an effective method for preserving PDL cells using different



storage media, such as Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), milk and coconut water.^{2,4} However, the psychological factors involved at the time of the accident, and, especially, the lack of information about first aid regarding tooth avulsion, may result in delayed replantation, which often occurs after a longer extra-alveolar dry period.^{1,2} In these cases, the response of a tooth to an injury triggers a biochemical chain reaction; in this process, the fibroblasts are the first cells to respond to the early signs of tissue damage.⁵ PDL cells are responsible for maintaining the integrity of the root; irritation or injury to these cells may cause damage to the cementum and dentin. Consequently, clastic cells will be attracted to the areas of the exposed dentin surface, leading to root resorption.^{1,3,5} In addition, exposure of root dentin proteins, phosphophoryn and sialoprotein, may also cause an immunopathological reaction.⁶

Antiresorptive substances such as alendronate,⁷ gallium nitrate⁸ and Emdogain^{3,9} have been studied for root surface treatment associated with later replantation. However, these agents yielded unsatisfactory results in controlling or preventing root resorption.^{3,9} Considering that root resorption has an immune-inflammatory aspect,¹⁰ it would be interesting to evaluate substances capable of modulating the cascade of molecular events. Although the mechanism of traumatic resorption is complex and poorly understood, osteoprotegerin (OPG) and the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) are known regulators of bone formation.¹⁰ The effects of RANKL are opposite from those of OPG; consequently, the disruption of OPG/RANKL pathways leads to low bone mass, which may contribute to root resorption.¹¹ Moreover, OPG and RANKL are mediated by the Wnt signaling pathway that simultaneously downregulates RANKL and upregulates OPG in the presence of a positive stimulus.¹² Thus, the latter contributes to bone formation and inhibits bone resorption.¹² Considering that RANKL and OPG are regulated by modulators of the immune system (hormones and cytokines),¹⁰ treatment of the root surface using immunomodulatory active components of medicinal plants would be a new and interesting challenge.

Latex extracted from the Euphorbiaceae *Synadenium carinatum* plant yields D-galactose binding lectin (ScLL).¹³ Lectins are involved in several biological events, such as endocytosis, cell migration, cell regulation and immune defense processes.¹⁴ The anti-inflammatory effects of ScLL have been successfully demonstrated in models of chronic inflammation,¹³ leishmaniasis¹⁵ and neosporosis.¹⁶ Despite its anti-inflammatory activity,^{13,15,16} ScLL has not been evaluated in the oral cavity until the present time. The purpose of the present study was to investigate the effect of ScLL, stimulated with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides (LPS), on the viability, proliferation and release of IL-10 in gingival fibroblasts. The first null hypothesis was that cells stimulated with LPS and treated with ScLL would not affect proliferation or cell viability. The second null hypothesis was that the levels of IL-10 would be the same for both treated and control groups.

Methodology

Cell culture

Immortalized human gingival fibroblasts (HGF) (Cell Bank of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) were used in the present study. The cells were cultured in T-50 flasks containing Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brazil), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Vitrocell Embriolife), in a humidified incubator with 5% CO₂ and 95% air at 37°C, until confluence. The HGF were trypsinized with trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), counted in a hemocytometer and seeded into 96-well plates (Coastar Corp., Cambridge, MA, USA) at 2 × 10⁴ cells/well in DMEM with 10% FBS. After 24 h, the cells were stimulated with 1 µg/ml of LPS from *P. gingivalis* (Invivogen, San Diego, CA, USA) in DMEM with 10% FBS for 24 h. Then, the medium containing LPS was removed and the cells were treated with 10, 5 and 2 µg/ml of ScLL (Federal University of Uberlandia Herbarium) in a fresh, serum-free medium for 1 and 5 h. The positive control group contained the cells maintained in 10% DMEM (not LPS-stimulated), representing their physiological behavior. The negative control group contained the cells kept in tap water (LPS-stimulated), mimicking the worst clinically

occurring situation. The tests were performed with six samples per group. After the incubation period with ScLL, the culture medium supernatant was collected for IL-10 dosage by ELISA. The cells were prepared for analysis by flow cytometry.

Flow Cytometry

This assay was performed following ScLL treatment, using an Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The HGF were trypsinized, rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and re-suspended using annexin buffer. The cells were incubated using 5 μ l of annexin V and 1 μ l of propidium iodide (PI; 100 μ g/ml) for 15 minutes. Flow cytometric analysis was performed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The data were obtained using CellQuest 5.1 software (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). The results were converted into percentages, according to medium fluorescence intensity.

Cell Proliferation Assay

The proliferation rate of HGF cells was determined using a bromodeoxyuridine (BrdU) staining kit

(Invitrogen). Then 2×10^4 cells were seeded on coverslips in 48-well plates for 24 h. The HGF were stimulated with or without LPS and treated with ScLL for the same duration described previously. Next, the cells were incubated in a humidified incubator with 5% CO₂ and 95% air at 37°C for 3 days to evaluate the proliferation potential assay. After this period, the HGF were labelled with BrdU for 24 h, fixed with methanol for 30 minutes at 4°C, and stained according to the kit procedure for cultured cells. Three samples per condition were used in this test.

Three images of each coverslip were taken at 10x magnification for analysis. The images were taken using a digital camera (DXM-1200, Nikon, Tokyo, Japan) attached to an optical microscope (Nikon Eclipse E200). The number of positive proliferative nucleic cells were counted and expressed in percentages, for statistical analysis (Figure 1 A-J).

Cytokine Assay

The number of IL-10 cytokines released in the cell culture supernatants was evaluated using a sandwich ELISA kit (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), according to the manufacturer's instructions. Absorbance was recorded using a microplate reader

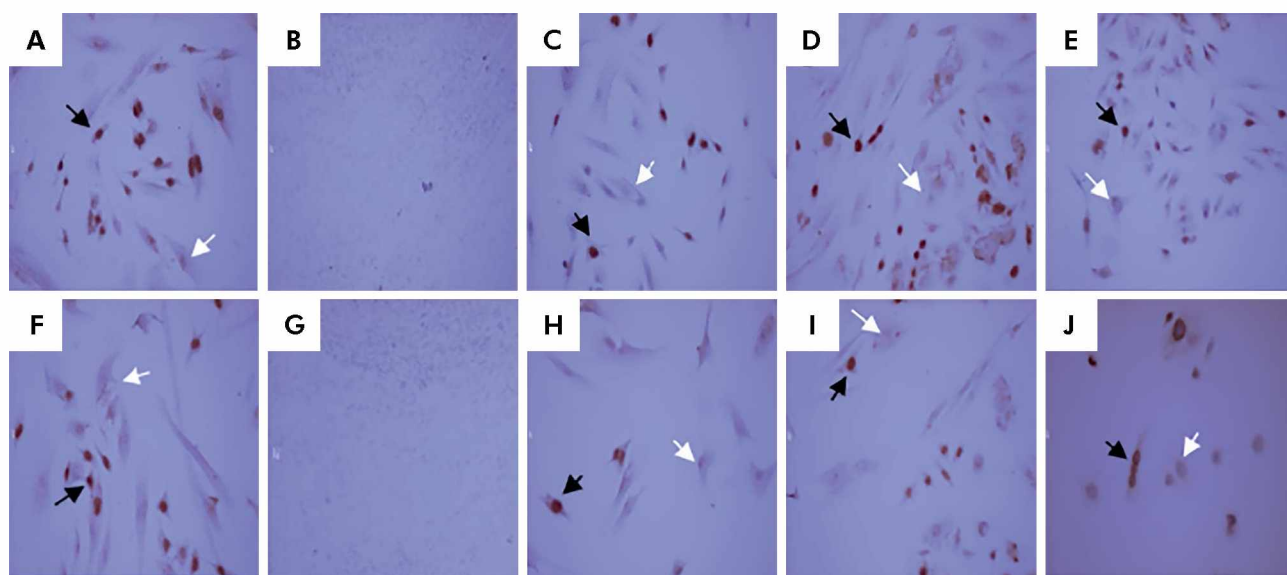


Figure 1. BrdU assay of HGF cells showed proliferative cells represented by labeled brown nucleus (black arrow) and no labeled nucleus (white arrow). Positive control group (DMEM) at 1 h (A); Negative control group (tap water) at 1 h (B); ScLL 10 μ g/ml at 1 h (C); ScLL 5 μ g/ml at 1 h (D); ScLL 2 μ g/ml at 1 h (E); DMEM at 5 h (F); Tap water at 5 h (G); ScLL 10 μ g/ml at 5 h (H); ScLL 5 μ g/ml at 5 h (I); ScLL 2 μ g/ml at 5 h (J). 10 \times magnification. Bars scale 10 μ m.

(Biochrom, Cambridge, UK) at 405 nm wavelength. The results obtained for absorbance were interpolated into a standard curve, using the Microplate Manager 4.0 software (Bio-rad, Hercules, CA, USA).

Statistical Analysis

Data of flow cytometry (cell viability, advanced apoptosis and necrotic cells), proliferation and IL-10 were analyzed for normality and homoscedasticity using Shapiro-Wilk's and Levene's tests. The one-way ANOVA and Tukey tests were used to compare data for cell viability, advanced apoptosis, necrotic cells, proliferation and IL-10 between the treated groups. Initial apoptosis was analyzed using the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). Dunnett's test was used to compare the control groups (positive and negative) with the experimental groups. Statistical significance was set at $\alpha = 0.05$. Statistical analysis was performed using Sigma Plot 12.0 software (Systat Software, San Jose, CA, USA).

Results

Cell viability, apoptosis and necrosis

Figure 2A shows cell viability and standard deviations. No significant differences were found among cell viability ($p = 0.455$), initial apoptosis and advanced apoptosis ($p = 0.956$) for the groups treated with different concentrations of ScLL (Figure 2A-C). The percentage of necrotic cells was statistically higher for the group treated with ScLL 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at 1 h, compared with the other ScLL treated groups ($p = 0.001$). No significant differences were found among the groups (Figure 2D) at 5 h. All the ScLL treated groups and the negative control group had lower percentages of viable cells at 1 h and 5 h, compared with the positive control ($p = 0.002$).

Regarding the initial apoptosis, no significant difference was found between the ScLL treatments and the positive control at 1 h. However, the values were significantly higher for the treated groups at 5 h, compared with the positive control ($p < 0.001$). All the ScLL treated groups had significantly higher values for advanced apoptosis than the positive control ($p < 0.001$) at 1 h. No statistically significant difference was found between the positive control and the ScLL treated groups at 5 h.

The percentage of necrotic cells was statistically higher for the treated group than the positive control at 1 h. However, no significant differences were found among the groups at 5 h. The negative control showed the lowest percentage of viable cells of all groups, regardless of the evaluation time ($p < 0.001$). The initial apoptosis presented similar values for the ScLL treated groups and the negative control at 5 h. The advanced apoptosis values were significantly higher for the negative control group, compared with all other the groups ($p < 0.001$), at 1 and 5 h. The level of necrosis for the positive control was lower than the negative control ($p < 0.001$) at 1 h. All ScLL treated groups and the positive control group had significantly lower values than the negative control ($p < 0.001$) at 5 h.

Cell proliferation

Cell proliferation means and standard deviations are shown in Figure 3. Cell proliferation was similar for all experimental groups ($p = 0.832$). The groups treated with ScLL 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and ScLL 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ presented proliferation values similar to those of the positive control group, regardless of the time evaluated. The negative control group had lower values than those of the treated groups, for all tested concentrations except ScLL 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at 5 h ($p < 0.001$). Cell proliferation for the positive control group was significantly higher, compared with the negative control group, regardless of the time point analyzed ($p < 0.001$).

Release of IL-10

Figure 4 shows means and standard errors for the release of IL-10. Similar values were found for the positive control and the ScLL treated groups at 1 h, except for ScLL 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, which showed lower IL-10 ($p = 0.026$) release. ScLL treated groups had values similar to those of the negative control group at 1 h. Dunnett's test showed that treatment with ScLL 5 and 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ resulted in lower releases of IL-10 than those of the positive and negative control groups at 5 h ($p < 0.001$).

Discussion

The effect of different ScLL concentrations on the viability, proliferation and release of IL10 using immortalized HGF cells was evaluated in the present study. The use of immortalized cell cultures in a

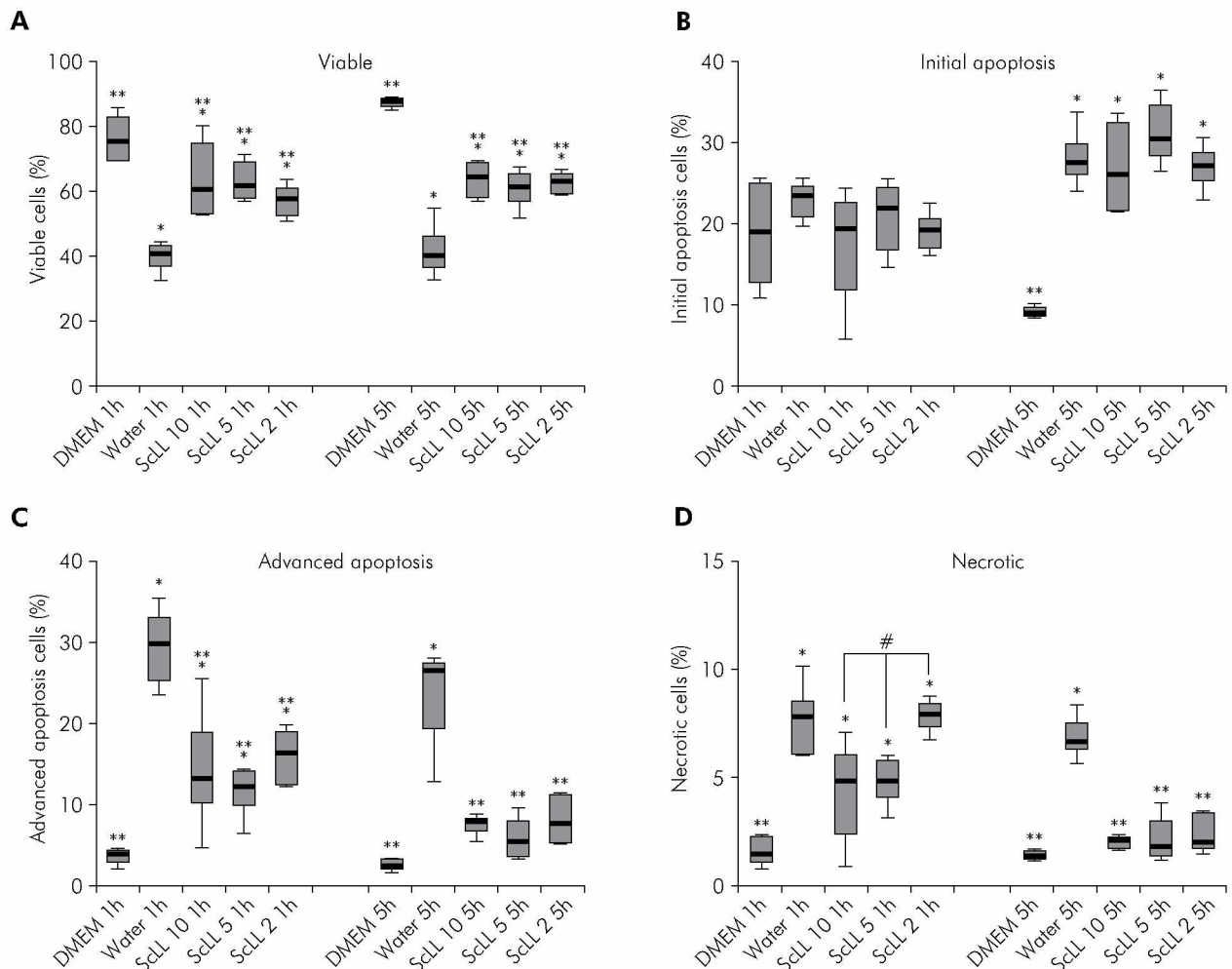


Figure 2. Results of flow cytometry analyses of the percentage of viable cells at 1 and 5 h (A); initial apoptosis cells at 1 and 5 h (B); advanced apoptosis cells at 1 and 5 h (C); necrotic cells at 1 and 5 h (D). Statistical significance was determined using one-way ANOVA and Dunnet's test. # $p < 0.05$ compared between the experimental groups. * $p < 0.05$ compared with positive control (DMEM). ** $p < 0.05$ compared with negative control (tap water).

preliminary study assessing drugs and medicines is widely supported in the literature.¹⁷ These types of cells have a known behavior and less heterogeneity than cells from primary culture.¹⁹ This allows easy reproducibility with no ethical conflicts involving research using human material. It is known that the phenotypic and genotypic characteristics of gingival fibroblasts differ from those of periodontal fibroblasts.¹⁸ However, immortalized PDL cells are not available for this protocol; therefore, this preliminary study opted for the HGF lineage.

Avulsed teeth become susceptible to contamination because the teeth usually fall to the ground, resulting in possible infection and inflammatory response.^{1,3,10}

Therefore, it was decided that the study cells would be stimulated with LPS in order to mimic situations that occur clinically. Studies have shown that gingival fibroblasts express Toll-like receptors and CD14 in response to LPS.^{19,20} LPS induces stress, which mediates the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways, following the inflammatory response.²¹ The MAPKs are serine threonine kinases that mediate the intracellular signaling associated with cellular activities, such as apoptosis, proliferation, differentiation and survival.²² The use of fibroblasts activated with LPS in drug tests is supported in the literature.²³

In the current study, the activated fibroblasts were evaluated regarding viability, initial/advanced

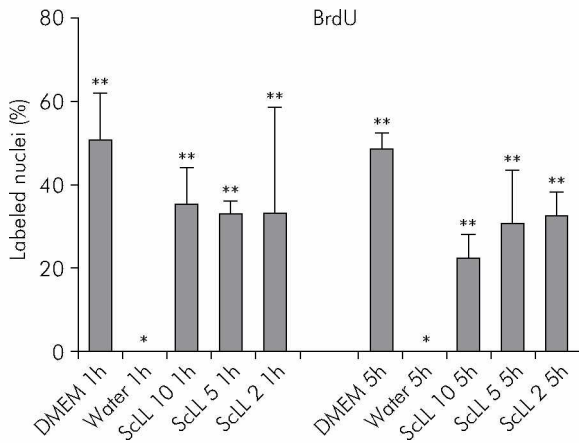


Figure 3. Comparison of cell proliferation percentage at 1 and 5 h. Statistical significance was determined using a one-way ANOVA and Dunnet's test. * $p < 0.05$ compared with positive control (DMEM). ** $p < 0.05$ compared with negative control (tap water).

apoptosis and necrosis using flow cytometry with annexin and PI labeling. PI is a nucleic acidbinding dye, impermeable to live and apoptotic cells; the high affinity of annexin for the phosphatidylserine exposed on the outer cell membrane is acquired early in the apoptosis process. Programmed cell death differs from necrosis in terms of the changes in biochemical and morphological characteristics, such as loss of membrane asymmetry and compaction/fragmentation of the nuclear chromatin. It is possible to distinguish the cells just beginning the programmed death process from those that are already at an advanced stage. This is important for analyses conducted for longer periods, such as the 5 h group. Compared with other methods of viability assays, cytometry is more accurate and yields more reliable results.²⁴ The highest viability levels were found for the positive control group, compared with the groups treated with the lectin ScLL and stimulated with LPS, since the presence of this endotoxin can trigger the cell death mechanism.²⁵ However, the fact that the viability of the ScLL groups differs from that of the negative control group shows that none of the ScLL concentrations used are cytotoxic. On the other hand, the substances tested were probably not able to block the molecular events that trigger the apoptotic process. This could be reflected by the higher percentage of advanced apoptotic cells in the ScLL treated groups than in the positive control group. Although analyses

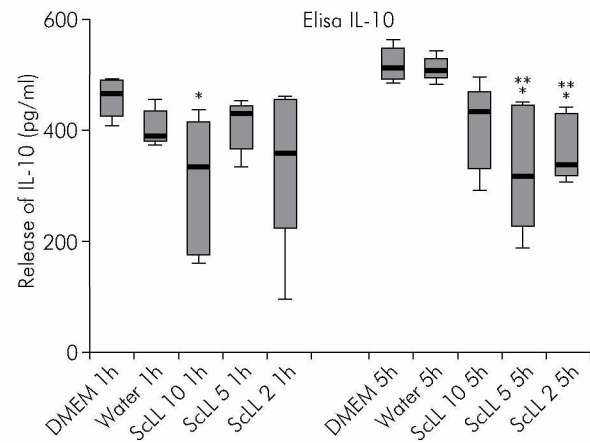


Figure 4. Release of IL-10 in HGFs examined by Elisa at 1 and 5 h. Statistical significance was determined using one-way ANOVA and Dunnet's test. # $p < 0.05$ compared between the experimental groups. * $p < 0.05$ compared with positive control (DMEM). ** $p < 0.05$ compared with negative control (tap water).

at the molecular and cellular levels were not conducted, lectin could act on any point of the apoptotic pathway, since the treated groups presented better results than the negative control group.

Considering that the presence of an immune inflammatory agent such as LPS could change the proliferative capacity of cells,²¹ and that treatment with ScLL could have a positive effect, analyses of cell proliferation were performed. The BrdU assay was chosen because it is an effective method of detecting changes in proliferation, which can be incorporated into the DNA of replicating cells.²⁵ The null hypothesis, regarding cells stimulated with LPS and treated with ScLL, was rejected since proliferation was higher for the experimental groups, compared with the negative control.

Another important factor, involved in establishing inflammatory reactions that can initiate resorption, is the release of cytokines by cells.¹⁰ IL-10 is a key regulator of immune responses, which inhibits the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and receptors,²³ and which affects T-cell activation by suppressing CD28 and CD2.²⁶ Its function is to protect the inflammatory responses of microbial infection, and to limit the production of TLR agonists such as LPS, which are induced cytokines and chemokines.²⁷ Furthermore, IL-10 promotes cell survival, proliferation and differentiation.²⁷ Thus, higher levels of IL-10 were expected in the treated groups than in the control groups, since the levels of

this cytokine provide protection against hard-tissue resorption in the periodontal microenvironment of replanted teeth.¹⁰ The second null hypothesis, namely that the levels of IL-10 are the same for both treated and control groups, was rejected since the detected IL-10 values of ScLL 5 and 2 µg/ml were different for both positive and negative controls at 5 h.

Despite the limitations of the present study, which did not include a group treated with LPS, the results presented here suggest that lectin ScLL may be promising in dentistry, specifically in the concentrations of 5 and 2 µg/ml, which do not indicate a dose-dependent effect on cell viability/proliferation and release of IL-10. However, the immunoregulatory functions of ScLL may depend on cell type, which may elicit the release of different cytokines, such as IL-12, IL-1β, TNF-α and IL-10. To this effect, more research using different models of avulsion are required so

that the potential of ScLL as an immunomodulator of fibroblasts may be studied more accurately, particularly, the association of storage media with the nutritional capacity of this lectin for use as an additional product for avulsed teeth.

Conclusion

Based on the results of the present study, it can be concluded that the ScLL concentrations tested were not cytotoxic, and had no effect on proliferation and release of IL-10 parameters.

Acknowledgments

The authors would like to thank the CPBio Dental Research Center for Biomechanics, Biomaterials and Cell Biology of the Federal University of Uberlândia. This research was financial supported by FAPEMIG, CNPq and CAPES.

References

1. Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dent Traumatol.* 2011;27(4):281-94. doi:10.1111/j.1600-9657.2011.01003.x
2. Tuna EB, Yaman D, Yamamoto S. What is the best root surface treatment for avulsed teeth? *Open Dent J.* 2014;8(8):175-9. doi:10.2174/1874210601408010175
3. Schjøtt M, Andreasen JO. Emdogain does not prevent progressive root resorption after replantation of avulsed teeth: a clinical study. *Dent Traumatol.* 2005;21(1):46-50. doi:10.1111/j.1600-9657.2004.00295.x
4. Moura CCG, Soares PBF, Reis MV, Fernandes Neto AJ, Soares CJ. Soy milk as a storage medium to preserve human fibroblast cell viability: an in vitro study. *Braz Dent J.* 2012;23(5):559-63. doi:10.1590/S0103-64402012000500015
5. Gunraj MN. Dental root resorption. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;88(6):647-53. doi:10.1016/S1079-2104(99)70002-8
6. Hidalgo MM, Itano EN, Consolaro A. Humoral immune response of patients with dental trauma and consequent replacement resorption. *Dent Traumatol.* 2005;21(4):218-21. doi:10.1111/j.1600-9657.2005.00296.x
7. Lustosa-Pereira AL, Garcia RB, Moraes IG, Bernardineli N, Bramante CM, Bortoluzzi EA. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth: microscopic analysis on rat's teeth. *Dent Traumatol.* 2006;22(1):30-5. doi:10.1111/j.1600-9657.2006.00417.x
8. Mori GG, Moraes IG, Garcia RB, Borro LCB, Purificação BR. Microscopic investigation of the use of gallium nitrate for root surface treatment in rat teeth submitted to delayed replantation. *Braz Dent J.* 2007;18(3):198-201. doi:10.1590/S0103-64402007000300004
9. Poi WR, Carvalho RM, Panzarini SR, Sonoda CK, Manfrin TM, Rodrigues TS. Influence of enamel matrix derivative (Emdogain) and sodium fluoride on the healing process in delayed tooth replantation: histologic and histometric analysis in rats. *Dent Traumatol.* 2007;23(1):35-41. doi:10.1111/j.1600-9657.2006.00481.x
10. Roskamp L, Westphalen VD, Carneiro E, Fariniuk LF, Silva Neto UX, Westphalen FH. Relationship between extra-alveolar time and atopy in the prognosis of the replantation of avulsed teeth. *J Trauma.* 2010;69(6):E79-81. doi:10.1097/TA.0b013e3181ec112b
11. Tyrovolas JB, Spyropoulos MN, Makou M, Perrea D. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *J Oral Sci.* 2008 Dec;50(4):367-76. doi:10.2334/josnusd.50.367
12. Goldring SR, Goldring MB. Eating bone or adding it: the Wnt pathway decides. *Nat Med.* 2007;13(2):133-4. doi:10.1038/nm0207-133
13. Rogerio AP, Cardoso CR, Fontanari C, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, Silva EVG, et al. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. *Glycobiology.* 2007;17(8):795-804. doi:10.1093/glycob/cwm053

14. Sharon N, Lis H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am.* 1993;268(1):82-9. doi:10.1038/scientificamerican0193-82
15. Afonso-Cardoso SR, Silva CV, Ferreira MS, Souza MA. Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in murine macrophages. *Exp Parasitol.* 2011;128(1):61-7. doi:10.1016/j.exppara.2011.02.006
16. Cardoso MR, Mota CM, Ribeiro DP, Noleto PG, Andrade WB, Souza MA et al. Adjuvant and immunostimulatory effects of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex (ScLL) in the mouse model of vaccination against neosporosis. *Vet Res (Faisalabad).* 2012;43(1):76. doi:10.1186/1297-9716-43-76
17. Niu N, Wang L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics.* 2015;16(3):273-85. doi:10.2217/pgs.14.170
18. Scheres N, Laine ML, de Vries TJ, Everts V, van Winkelhoff AJ. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2010;45(2):262-70. doi:10.1111/j.1600-0765.2009.01229.x
19. Wang PL, Oido-Mori M, Fujii T, Kowashi Y, Kikuchi M, Suetsugu Y et al. Heterogeneous expression of Toll-like receptor 4 and downregulation of Toll-like receptor 4 expression on human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288(4):863-7. doi:10.1006/bbrc.2001.5842
20. Wang PL, Ohura K. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and Toll-like receptors. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):132-42. doi:10.1177/154411130201300204
21. Seo T, Cha S, Kim TI, Lee JS, Woo KM. *Porphyromonas gingivalis*-derived lipopolysaccharide-mediated activation of MAPK signaling regulates inflammatory response and differentiation in human periodontal ligament fibroblasts. *J Microbiol.* 2012;50(2):311-9. doi:10.1007/s12275-012-2146-x
22. Lim W, Choi H, Kim J, Kim S, Jeon S, Zheng H et al. Anti-inflammatory effect of 635 nm irradiations on in vitro direct/indirect irradiation model. *J Oral Pathol Med.* 2015;44(2):94-102. doi:10.1111/jop.12204
23. Jung IH, Lee DE, Yun JH, Cho AR, Kim CS, You YJ, et al. Anti-inflammatory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated fibroblasts and stem cells derived from human periodontal ligament. *J Periodontal Implant Sci.* 2012;42(6):185-95. doi:10.5051/jpis.2012.42.6.185
24. Nebe-von-Caron G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR, Badley RA. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J Microbiol Methods.* 2000;42(1):97-114. doi:10.1016/S0167-7012(00)00181-0
25. Urnowey S, Ansai T, Bitko V, Nakayama K, Takehara T, Barik S. Temporal activation of anti- and pro-apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: potential role of bacterial proteases in host signalling. *BMC Microbiol.* 2006;6(1):26. doi:10.1186/1471-2180-6-26
26. Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991;174(5):1209-20. doi:10.1084/jem.174.5.1209
27. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(4):735-46. doi:10.1016/j.jaci.2009.02.030

Capítulos

3.4 CAPÍTULO 4

Effect of ScLL and 15d-PGJ₂ on fibroblasts stimulated-LPS on cell viability and cytokine release – an in vitro study.

Artigo a ser enviado para publicação no periódico Brazilian Dental Journal

Effect of ScLL and 15d-PGJ₂ on fibroblasts stimulated-LPS on cell viability and cytokine release – an *in vitro* study.

Short title: Effect of ScLL and 15d-PGJ₂ on fibroblasts.

Manuella Verdinelli de Paula Reis,^a Camilla Christian Gomes Moura,^b Priscilla Barbosa Ferreira Soares,^c Maria Aparecida de Souza,^d Carlos José Soares^{a *}

^a Biomechanics Research Group, Department of Operative Dentistry and Dental Materials, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

^b Biomechanics Research Group, Department of Endodontics, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

^c Biomechanics Research Group, Department of Periodontology and Implantology, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

^d Institute of Biomedical Sciences, Department of Immunology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

*Corresponding Author

Carlos José Soares,

Department of Operative Dentistry and Dental Materials,

Federal University of Uberlândia,

Av Pará 1720, Block 4L, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38408-325, Brazil.

E-mail address: carlosjsoares@ufu.br

Summary

This study evaluated the effect of cyclopentenone-type PG, 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PG J2 (15d-PGJ₂) and lectin (ScLL) on viability, release of IL-6 and TGF β -1 in human gingival fibroblasts (HGF) stimulated with lipopolysaccharide (LPS). HGF were stimulated with LPS 10 μ g/ml and treated with: 15d-PGJ₂ 2 and 1 μ g/ml, ScLL 5 and 2 μ g/ml, for 1 and 3h, and evaluated for viability by MTT assay. The supernatant was collected to detect release of IL-6 and TGF β -1 by ELISA. Positive control consisted of cells maintained in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), and the negative control, of those kept in LPS. Data were analyzed by ANOVA and Dunnett's test ($\alpha=0.05$). No significant difference was found in the viability between experimental groups at 1h ($p>0.05$). Absorbance levels of ScLL 5 μ g/ml was similar to positive control in evaluated periods ($p>0.05$), whereas all the other groups had lower levels compared to the positive control ($p<0.05$). The IL-6 release was statistically higher for ScLL 5 μ g/ml and 15d-PGJ₂ 2 μ g/ml at 1h, compared with the other treated groups and positive control group ($p<0.05$). No significant differences were found among the groups at 3 h ($p>0.05$), except for ScLL 2 μ g/ml and 15d-PGJ₂ 1 μ g/ml, which showed lower IL-6 release compared to negative control ($p<0.05$). No significant difference was found among the groups for TGF β -1 release ($p>0.05$). The results indicated that ScLL 5 μ g/ml not interfere in viability, ScLL 2 μ g/ml and 15d-PGJ₂ 1 μ g/ml demonstrated reduced the IL-6 release. The substances tested had no effect on release of TGF β -1.

Keywords: Lectin (ScLL), 15d-PGJ₂, fibroblasts, LPS, cell viability.

Introduction

The ideal conduct for avulsed teeth is their immediate replantation, but in the most of time this is not possible. In this way, the duration of the tooth's extra-alveolar dry time, its storage medium, replantation time and survival of the PDL cells are crucial factors that determine the prognosis (2). Taking to consideration these requirements to achieve a more favorable prognosis after replantation, the use of storage media that preserve the PDL cell viability has been considered as more important than the extra-alveolar period (2). However, in the clinical conditions has been observed that the patients no have knowledge about these storage media, and consequently occurs the delayed replantation (3). In this situation, the dry storage of avulsed teeth, leads to death of PDL cells, consequently, the presence of necrotic PDL remnants can trigger the development of root resorption (1). In order to increase the chance of survival avulsed tooth, several therapies have been proposed before replantation to prevent or delay root resorption (4) in cases of late replantation. It has been suggest the application in root surface of the 2% acidulated phosphate sodium fluorided or propolis solution 15% (4) over the root surface. However, these substances do not have active principles that could modulate immune-inflammatory reactions, which triggers the root resorption (5). In this aspect, the use of substances with potential to modulate the inflammatory response, and act as a possible therapy for late replanted teeth replacing the acid-root treatments, it would be a new and interesting challenge.

Some substances tested to treat root surface before delayed tooth replantation possess efficacy as osteoporotic therapeutic agents, inhibiting osteoclast activity (6). Among these substances is Emdogain, alendronate, odanacatib (6). In the last years, compounds of natural origin, obtained from plants, as curcumin and piperine, have been tested as anti-inflammatory and anti-osteoclastogenic drugs with potential use to treatment and prevention of replacement resorption on replanted teeth (7). In this way, a recent study tested the effect of an lectin obtained from a plant on stimulated gingival fibroblasts with promising results (8), which may in the future to be used as possible therapy of delayed replanted teeth. Lectins are carbohydrate-binding proteins involved in various biological process, including cell-cell recognition, proliferation, migration, adhesion and biochemical responses (9). The lectin isolated from the plant Euphorbiaceae *Synadenium carinatum* latex (ScLL) exhibits immunoregulatory functions (10). This capacity of ScLL

in modulate the inflammatory activity have been demonstrated in models of chronic inflammation, such as leishmaniose (11), asthma (10) and neosporosis (12).

Another component with immunomodulatory capacity is the cyclopentenone-type PG, 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PG J₂ (15d-PGJ₂), which demonstrated promising results in different experimental models *in vitro* (13) and *in vivo* (13-14). The 15d-PGJ₂ has a wide spectrum of physiological activities, is one of the terminal products of the cyclooxygenase (COX)-2 pathway (14). Moreover, differs from other prostaglandins in several aspects, chemically and biologically, mainly due to their anti-tumor effects (13) and anti-inflammatory (14). In addition, 15d-PGJ₂ was previously evaluated in a periodontitis mouse model, demonstrating immunomodulatory effects, decreasing bone resorption, and inflammatory responses (14). However, more studies evaluating the effect of 15d-PGJ₂ in other cells of oral cavity, and comparing them with other potentially immunomodulating substances are of interest in dentistry.

The purpose of this study was to investigate the effect of 15d-PGJ₂ and ScLL on gingival fibroblasts stimulated with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides (LPS) in the viability, and release of the IL-6 and TGF β -1. The hypothesis was that cells stimulated with LPS and treated with ScLL or 15d-PGJ₂, will demonstrate cell viability and release of TGF β -1 similar to positive control group; and levels of IL-6 will be lower on treated groups than in negative control group.

Materials and Methods

Cell culture

Immortalized human gingival fibroblasts (HFG) (Cell Bank of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) were cultured in T-50 culture flasks containing Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brazil) and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Vitrocell Embriolife) in a humidified incubator with 5% CO₂ and 95% air at 37°C, until confluence. HFG's were trypsinized, and plated on 96-well culture (Coastar Corp., Cambridge, MA, USA) with DMEM 10% at a cell density of 2×10^4 cells/well. After 24h, the medium was softly removed from each well and replaced by LPS 10 μ g/ml from *P. gingivalis* (Invivogen, San Diego, CA, USA) in DMEM 10% for 24h. Then, the medium was removed and treated with ScLL (2 μ g/ml, 5 μ g/ml) (Herbarium of Federal University of Uberlandia, UFU), and 15d-PGJ₂ (1 μ g/ml,

2 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in DMEM 10% for 1 and 3 h. Positive control group was maintained in DMEM 10% (no LPS-stimulated), and the negative control group was stimulated with LPS. After the period of incubation, the cells were prepared for analysis of cell viability and cytokine assay.

Cell Viability Assay

The cell viability was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich) assay. After removing the medium, the cells were rinsed with a phosphate-buffer solution (PBS), and MTT solution (5 mg/ml) was added to the cells and incubated at 37°C for 4 h to allow development of the formazan crystals. The supernatant of each well was replaced with the same volume of dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich) to dissolve the crystals. Optical density was measured at 570 nm using a microplate reader (Biochrom, Cambridge, UK, England).

Cytokine Assay

IL-6 and TGFβ-1 levels were analyzed after 24 h of cell exposure to the ScLL and 15d-PGJ₂. Cytokine levels were measured in culture supernatants using a sandwich Elisa kit for IL-6 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), and TGFβ-1 (Sigma-Aldrich) according to manufacturer's instructions. Absorbance was recorded using a microplate reader (Biochrom) at 405 nm wavelength for IL-6, and 450 nm for TGFβ-1. The results obtained for absorbance were interpolated into a standard curve, using the Microplate Manager 4.0 software (Bio-rad, Hercules, CA, USA).

Statistical Analysis

Data of MTT, IL-6 and TGFβ-1 were subjected to analysis of normality using Shapiro-Wilk and Levene's tests. The MTT data were evaluated with log transformation followed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test to compare the experimental groups ($p < 0.05$). Data for IL-6 and TGFβ-1 were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey test. The Dunnet's test was performed to compare the control and experimental groups. The statistical analyses were performed using SigmaPlot 12.0 software (Systat Software, San Jose, CA, USA) with statistical significance set at a value of $\alpha = 0.05$.

Results

Cell Viability

The cell viability evaluated by MTT is shown in Fig. 1. No significant difference was found between the experimental groups at 1 h ($p > 0.05$). However, ScLL 5 $\mu\text{g/ml}$ presented a higher cell viability than 15d-PGJ₂ 1 $\mu\text{g/ml}$ and 2 $\mu\text{g/ml}$, at 3 h ($p < 0.001$). The absorbance levels of ScLL 5 $\mu\text{g/ml}$ was similar to positive control group (DMEM) in both evaluated periods ($p > 0.05$). All the other groups had lower levels of absorbance compared to the positive control, at 1 and 3 h ($p < 0.05$). The experimental groups were similar to the negative control (LPS) in both evaluated periods ($P > 0.05$), except the positive control ($p < 0.05$).

Release of IL-6 and TGF β -1

The release of IL-6 and TGF β -1 is shown in Fig. 2 and 3, respectively. The level of IL-6 was statistically higher for the group treated with ScLL 5 $\mu\text{g/ml}$ and 15d-PGJ₂ 2 $\mu\text{g/ml}$ at 1 h, compared with the other treated groups and positive control group ($p < 0.05$). Similar values were found for the negative control and treated groups at 1 h, except for 15d-PGJ₂ 1 $\mu\text{g/ml}$, which showed lower IL-6 release ($p = 0.04$). No significant differences were found among the groups at 3 h ($p > 0.05$), except for ScLL 2 $\mu\text{g/ml}$ and 15d-PGJ₂ 1 $\mu\text{g/ml}$, which showed lower IL-6 release compared to the negative control group ($p < 0.05$). Regarding the TGF β -1 release, no significant difference was found among the groups in both evaluated periods ($p > 0.05$).

Discussion

The effect of different ScLL and 15d-PGJ₂ concentrations on the viability, release of IL-6 and TGF β -1 using immortalized HGF cells was evaluated in the current study. These substances were chosen because of their immunomodulatory potential already confirmed in other cellular models, which was evaluated until the moment in cell cultures that mimic conditions found in the oral cavity. It is important to note that the use of immortalized cell cultures in a preliminary study assessing drugs and medicines is recommended in the literature (7,8). Moreover, established cell lines have enhanced reproducibility of the results, unlimited life span, and higher rate of cell multiplication compared to primary culture cells (15). Although the phenotypic and genotypic characteristics of gingival fibroblasts differ from those of periodontal fibroblasts (16), immortalized PDL cells are

not available for this protocol. Therefore, in this preliminary study was selected the HGF lineage.

In the most of cases of tooth avulsion occurs infection and inflammatory response, because the teeth normally fall to the ground and become susceptible to contamination (1). Therefore, in the present study, the cells were stimulated with LPS in order to mimic situations that occur clinically. Studies have shown that gingival fibroblasts express Toll-like receptors and CD14 in response to LPS (15). It is known that LPS induces cell stress, which is associated with the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK), following the inflammatory response (17). The MAPK mediate the intracellular signaling related with cellular activities, such as apoptosis, differentiation and cell survival (18). Studies using fibroblasts activated with LPS in drug tests is recommended in this area (8). Considering that the presence of LPS could interfere on cell viability, the current research evaluated it parameter by MTT assay. Tetrazolium salts have become widely used to in cell biology assays, due to its ability to convert the yellow tetrazolium salt MTT into dark blue formazan crystals through the mitochondrial activity of living cells. Compared with other viability assays, the MTT assay is simple, fast, precise, sensitive and reproducible (19). In the current study, the highest viability levels were found for the positive control group, this result can be related with the absence of the LPS, which may trigger the cell death mechanism (20). However, the fact that the ScLL 5 µg/ml shows similar viability to positive control group, suggest that this ScLL concentration may act on any point of the apoptotic pathway, blocking the molecular events in the apoptotic process, maintaining viability levels similar to basal cell parameters.

Considering that LPS could be able to induce the fibroblasts to some pro-inflammatory reaction, and that treatment with ScLL and 15d-PGJ₂ could have a regulatory effect in this parameter, analyses of release of IL-6 and TGFβ-1 were performed. IL-6 is produced by human fibroblasts when stimulated by the presence of bacteria and their products, exercising a key role in the regulation of the immune response (21). Furthermore, IL-6 is involved in a broad spectrum of biological activities, as well as in cellular defense, or acting on various target cells. This cytokine acts on bone, where it affects mainly osteoclastogenesis and bone resorption (21). Taking to consideration the anti-inflammatory role of the substances tested, it was expected find lower levels of IL-6 in the treated groups than in the negative control group in the current study. However, only

the ScLL 2 µg/ml and the 15d-PGJ₂ 1 µg/ml showed a significant reduction in the release of IL-6. This result may indicate that these substances were able to modulate the release of this inflammatory cytokine in stimulated fibroblasts, in a concentration dependent-way.

Another relevant factor evaluated is the release of cytokine TGFβ, which has an important role in promoting fibroblasts differentiation at sites of inflammation and repair (22). In the current study, curiously, no differences were found in TGFβ-1 levels among the groups. It is possible that the 24 h time period for detection of TGFβ-1 levels in the present study may not have been enough to release this cytokine in gingival fibroblasts. Furthermore, the amount of LPS used to stimulate HGF cells may not have been sufficient to induce the release of TGFβ-1 at that time. It since, has been demonstrated that the TGFβ production differed between PDL cells and gingival fibroblasts, and that this difference could be attributed at the highest concentration of *P. gingivalis* LPS used to stimulate (23). Although it has not been evaluated in the present study, the joint production of TGFβ-1 and IL-6 may induce the release of Th17 cells profile (24), which can result in tissue inflammation, since their presence was demonstrated in the chronic periodontal inflammation (25). Therefore, more studies evaluating other cytokines and other cellular profiles should be performed seeking to contribute with the present findings.

Despite the limitations of the present study, the results presented here suggest that lectin ScLL and 15d-PGJ₂ may be promising in dentistry, specifically in the lower concentrations, which indicate a positive effect on the evaluated parameters, such as cell viability, release of IL-6 and TGFβ-1. However, it should consider that 15d-PGJ₂ is a commercial product, sold at small aliquots, which represents a higher cost and also greater difficulty in handling when compared to ScLL. This fact justifies the choice of ScLL for future research in biological models of greater complexity. Therefore, more research using different models *in vitro* and *in vivo* are required in order to evaluate the potential of ScLL as an immunomodulator and anti-resorption agent for avulsion therapy. Moreover, future researches should evaluate the use of immunomodulator agents in association of storage media with the nutritional capacity for use as a product for avulsed teeth.

Conclusion

Based on the results of the present study, it can be concluded that ScLL 5 $\mu\text{g/ml}$ did not interfere in cell viability. In relation of the parameter release of IL-6, ScLL 2 $\mu\text{g/ml}$ and the 15d-PGJ₂ 1 $\mu\text{g/ml}$ demonstrated reduced the levels of this inflammatory cytokine. All the concentrations tested had no effect on release of TGF β -1.

Resumo

Este estudo avaliou o efeito da ciclopentanona PG, 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PG J2 (15d-PGJ₂) e da lectina (ScLL) na viabilidade, liberação de IL-6 e TGF β -1 em fibroblastos gengivais humanos (FGH) estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). FGH foram estimulados com LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ e tratados com: 15d-PGJ₂ 1 e 2 $\mu\text{g/ml}$, ScLL 2 e 5 $\mu\text{g/ml}$, por 1 e 3h, e avaliados quanto à viabilidade pelo método MTT. O sobrenadante foi coletado para detectar a liberação de IL-6 e TGF β -1 por ELISA. Controle positivo consistiu de células mantidas no meio de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM), e o controle negativo, pelas células mantidas em LPS. Dados foram analisados pelos testes ANOVA e Dunnett's ($\alpha=0.05$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada na viabilidade entre os grupos experimentais no período 1h ($p>0.05$). Os níveis de absorbância de ScLL 5 $\mu\text{g/ml}$ foi similar ao controle positivo nos períodos avaliados ($p>0.05$), enquanto todos os outros grupos tiveram baixos níveis comparados ao controle positivo ($p<0.05$). A liberação de IL-6 foi estatisticamente maior para ScLL 5 $\mu\text{g/ml}$ e 15d-PGJ₂ 2 $\mu\text{g/ml}$ no período 1h, comparado com todos os outros grupos tratados e controle positivo ($p<0.05$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos no período 3h ($p>0.05$), exceto para ScLL 2 $\mu\text{g/ml}$ e 15d-PGJ₂ 1 $\mu\text{g/ml}$, os quais mostraram baixos níveis de liberação de IL-6 release comparados ao controle negativo ($p<0.05$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos para liberação de TGF β -1 ($p>0.05$). Os resultados indicam que ScLL 5 $\mu\text{g/ml}$ não interfere na viabilidade, ScLL 2 $\mu\text{g/ml}$ e 15d-PGJ₂ 1 $\mu\text{g/ml}$ demonstrou reduzir a liberação de IL-6. As substâncias testadas não têm efeito na liberação de TGF β -1.

Acknowledgements

This study was supported by the Research Support FAPEMIG APQ 02145-14, Foundation of the State of Minas Gerais, CNPq 474505/2013-8, and CAPES.

References

1. Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dent Traumatol* 2011;27:281–94.
2. Gopikrishna V, Baweja PS, Venkateshbabu N, Thomas T, Kandaswamy D. Comparison of coconut water, propolis, HBSS, and milk on PDL cell survival. *J Endod* 2008; 34:587-9.
3. Andersson L, Bodin I. Avulsed human teeth replanted within 15 minutes—a long-term clinical follow-up study. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6:37-42.
4. Gulinelli JL, Panzarini SR, Fattah CM, Poi WR, Sonoda CK, Negri MR, et al. Effect of root surface treatment with propolis and fluoride in delayed tooth replantation in rats. *Dent Traumatol* 2008;24:651-7.
5. Roskamp L, Westphalen VP, Carneiro E, Fariniuk LF, Silva Neto UX. The positive influence of atopy on the prognosis of avulsed and replanted teeth despite differences in post-trauma management. *J Endod* 2011;37:463-5.
6. Yang W, Ko H, Kim H, Kim M. The effect of cathepsin K inhibitor on osteoclastic activity compared to alendronate and enamel matrix protein. *Dent Traumatol*. 2015;31:202-8.
7. Martins CA, Leyhausen G, Volk J, Geurtsen W. Curcumin in Combination with Piperine Suppresses Osteoclastogenesis In Vitro. *J Endod*. 2015;41:1638-45.
8. Reis MV, Moura CC, Silva MV, Souza MA, Soares PB, Soares CJ. Effect of lectin (ScLL) on fibroblasts stimulated with LPS - an in vitro study. *Braz Oral Res* 2016;30:e140.
9. Souza MA, Carvalho FC, Ruas LP, Ricci-Azevedo R, Roque-Barreira MC. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj J* 2013;30:641-57.
10. Rogerio AP, Cardoso CR, Fontanari C, et al. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. *Glycobiology*. 2007;17:795-804.
11. Afonso-Cardoso SR, Silva CV, Ferreira MS, Souza MA. Effect of the *Synadenium carinatum* latex (ScLL) on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection in murine macrophages. *Exp Parasitol* 2011;128:61-7.

12. Cardoso MR, Mota CM, Ribeiro DP, et al. Adjuvant and immunostimulatory effects of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex (ScLL) in the mouse model of vaccination against neosporosis. *Vet Res* 2012;43:76.
13. Nakamura M, Tsumura H, Satoh T, Matsumoto K, Maruyama H, Majima M, et al. Tumor apoptosis in prostate cancer by PGD(2) and its metabolite 15d-PGJ(2) in murine model. *Biomed Pharmacother* 2013;67:66-71.
14. Napimoga MH, da Silva CA, Carregaro V, Farnesi-de-Assunção TS, Duarte PM, de Melo NF, et al. Exogenous administration of 15d-PGJ2-loaded nanocapsules inhibits bone resorption in a mouse periodontitis model. *J Immunol* 2012;189:1043-52.
15. Wang PL, Oido-Mori M, Fujii T, Kowashi Y, Kikuchi M, Suetsugu Y, et al. Heterogeneous expression of Toll-like receptor 4 and downregulation of Toll-like receptor 4 expression on human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:863-7.
16. Scheres N, Laine ML, de Vries TJ, Everts V, van Winkelhoff AJ. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 2010;45:262-70.
17. Seo T, Cha S, Kim TI, Lee JS, Woo KM. *Porphyromonas gingivalis*-derived lipopolysaccharide-mediated activation of MAPK signaling regulates inflammatory response and differentiation in human periodontal ligament fibroblasts. *J Microbiol* 2012;50:311-9.
18. Lim W, Choi H, Kim J, Kim S, Jeon S, Zheng H et al. Anti-inflammatory effect of 635 nm irradiations on in vitro direct/indirect irradiation model. *J Oral Pathol Med* 2015;44:94-102.
19. Sepet E, Pinar A, Ilhan B, Ulukapi I, Bilir A, Tuna S. Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line in vitro. *Quintessence Int* 2009;40:e55-e61.
20. Urnowey S, Ansai T, Bitko V, Nakayama K, Takehara T, Barik S. Temporal activation of anti- and pro-apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: potential role of bacterial proteases in host signalling. *BMC Microbiol* 2006;6:26.

21. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:701-21.e1-70.
22. Rahimi F, Hsu K, Endoh Y, Geczy CL. FGF-2, IL-1 β and TGF- β regulate fibroblast expression of S100A8. *FEBS J* 2005;272:2811-27.
23. Morandini AC, Sipert CR, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Santos CF. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF- β , interleukin (IL)-8 and IL-10. *Braz Oral Res* 2011;25:157-62.
24. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485-517.
25. Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Junior WM, Rossi MA, et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:1-6.

Figure legends

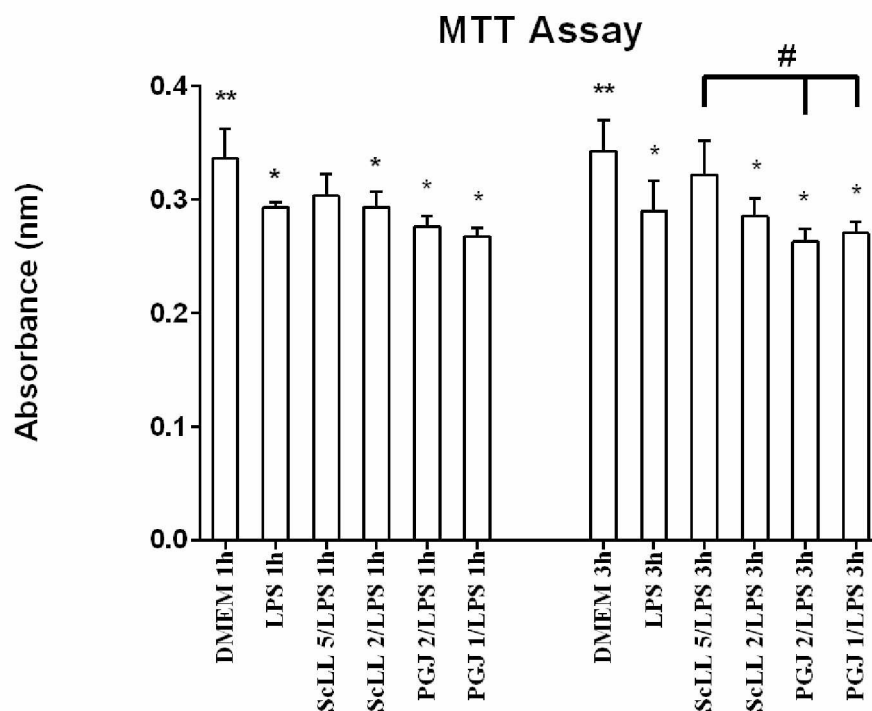


Figure 1. Effect of 15d-PGJ₂ and ScLL on cell viability of HGFs at 1 h and 3 h by MTT assay. Statistical significance was determined using one-way ANOVA and Dunnet's test. #p < 0.05 compared between the experimental groups. *p < 0.05 compared with positive control (DMEM). **p < 0.05 compared with negative control (LPS).

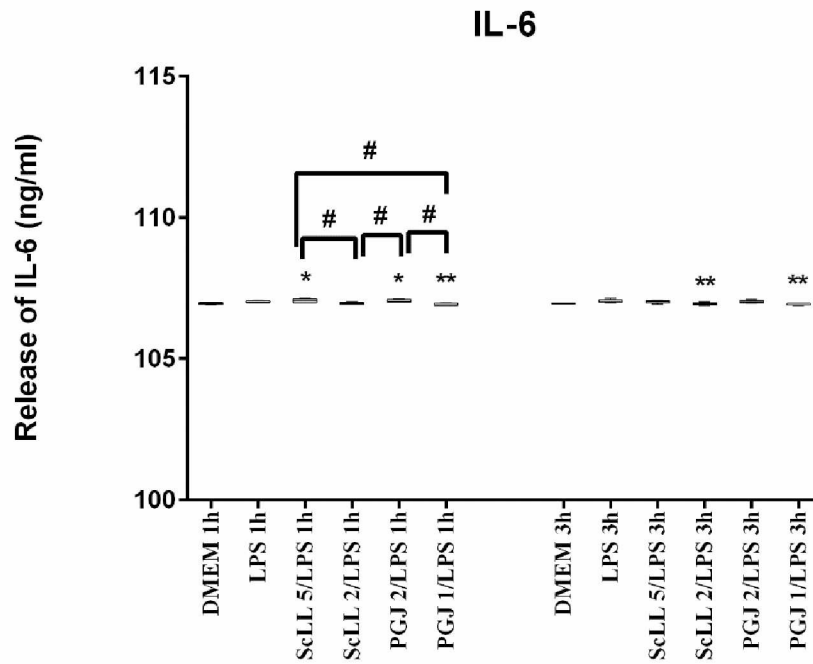


Figure 2. Release of IL-6 in HGFs examined by Elisa at 1 and 3 h. Statistical significance was determined using one-way ANOVA and Dunnet's test. # $p < 0.05$ compared between the experimental groups. * $p < 0.05$ compared with positive control (DMEM). ** $p < 0.05$ compared with negative control (LPS).

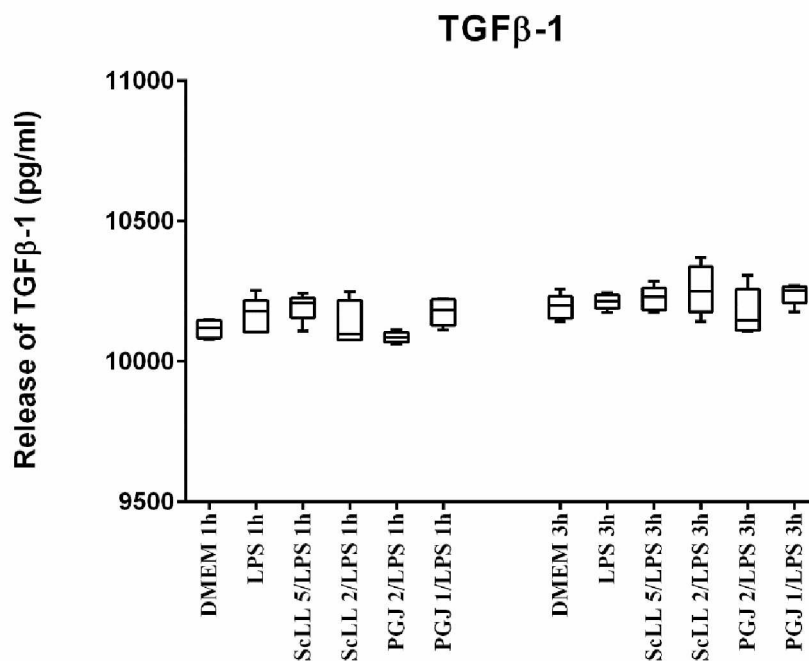


Figure 3. Release of TGFβ-1 in HGFs examined by Elisa at 1 and 3 h. Statistical significance was determined using one-way ANOVA and Dunnet's test.

Capítulos

3.5 CAPÍTULO 5

Effects of Lectin (ScLL) on osteoclast maturation – an in vitro study.

Artigo a ser enviado para publicação no periódico International Endodontic Journal

Effects of Lectin (ScLL) on osteoclast maturation – an *in vitro* study

Manuella Verdinelli de Paula Reis,^a Camilla Christian Gomes Moura,^b Gabriela Leite de Souza,^b Priscilla Barbosa Ferreira Soares,^c Maria Aparecida de Souza,^d Carlos José Soares^{a *}

^a Biomechanics Research Group, Department of Operative Dentistry and Dental Materials, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

^b Biomechanics Research Group, Department of Endodontics, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

^c Biomechanics Research Group, Department of Periodontology and Implantology, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

^d Institute of Biomedical Sciences, Department of Immunology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

Running title: ScLL inhibit osteoclast maturation

***Corresponding Author**

Prof. Carlos José Soares, DDS, MSc, PhD

Biomechanic Reserch Group, Department of Operative Dentistry and Dental Materials,

Federal University of Uberlândia, MG, Brazil

Av Pará 1720, Block 4L, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38408-325, Brazil.

E-mail address: carlosjsoares@ufu.br

Abstract

Introduction: The lectin (ScLL) was recently evaluated in the oral cavity due to their anti-inflammatory activities. Thus, ScLL could be a promising agent to block osteoclast activity and prevent root resorption. This study evaluated the effect of ScLL on viability of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with lipopolysaccharide (LPS), and RAW 264.7 macrophage lineage; its effects on osteoclastogenesis; and release of TNF- α and nitric oxide (NO).

Methods: PBMCs were stimulated with LPS, treated with ScLL 10 and 5 $\mu\text{g/ml}$ for 1 and 5 h, and evaluated by MTT assay. The cell viability in RAW 264.7 was determined by MTT and Alamar Blue assay after ScLL treatment for 24 h. ScLL effects on RANKL-induced osteoclastogenesis of RAW cells were assessed by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining and the F-actin ring formation. The supernatant was collected to detect release of TNF- α by ELISA, and NO using nitrite assay.

Results: ScLL 10 $\mu\text{g/ml}$ had lower viability only in RAW cells by Alamar Blue assay ($p < 0.05$). ScLL suppressed the osteoclastogenesis by decreasing the TRAP activity as well as the F-actin ring formation. ScLL 10 $\mu\text{g/ml}$ showed the highest values of NO release than all the other groups ($p < 0.05$). The lower levels of TNF- α were found for the negative control.

Conclusions: It showed that ScLL 5 $\mu\text{g/ml}$ suppressed the osteoclastogenesis *in vitro* and had no cytotoxic effect on PBMC and RAW cell cultures. These findings suggest its use as a possible antiresorptive agent in avulsed teeth.

Key Words: Cell viability, Lectin, Osteoclastogenesis, PBMC, RAW 264.7, Tooth Avulsion.

Introduction

Traumatic dental injuries has been observed frequently in school-age children (Andreasen *et al.* 2010). The successful of the prognosis in such case is dependent upon immediate replantation (Andreasen & Kristerson 1981). Otherwise, delayed tooth replantation have been associated to increase risk of external root resorption, one of the main complication of tooth avulsion (Trope 2002, Trope 2011). In the avulsion injury, the neurovascular component of the periodontal ligament (PDL) is damaged leading to necrosis, release of biological messengers and macrophage activation. Consequently, osteoclasts precursors are recruited and activated in the presence of inflammatory mediators, leading to root resorption (Trope 2011). Antiresorptive agents such as alendronate (Yang *et al.* 2015), Emdogain (Schjøtt & Andreasen 2005, Yang *et al.* 2015), and odanacatib (Yang *et al.* 2015) have been evaluated *in vitro* and *in vivo* for root surface treatment associated with delayed replantation. However, these agents proving to be partially effective or associated with unacceptable side effects (Schjøtt & Andreasen 2005, Yang *et al.* 2015). Therefore, it could be interesting to look for new substances that could be effective as immunomodulators and that consequently may be effective in blocking dental resorption.

Lectins are proteins involved in several biological events (Rogerio *et al.* 2007) as endocytosis, cell migration, cell regulation and immune defense processes (Sharon & Lis 1993, Rogerio *et al.* 2007, Afonso-Cardoso *et al.* 2011, Cardoso *et al.* 2012). ScLL is D-galactose binding lectin isolated from the latex extracted from the Euphorbiaceae *Synadenium carinatum* plant. Its therapeutic potential in diseases associated with inflammatory and immune responses, including chronic inflammation (Rogerio *et al.* 2007), leishmaniasis (Afonso-Cardoso *et al.* 2011) and neosporosis (Cardoso *et al.* 2012), has been investigated. Recently, ScLL was evaluated in the oral cavity in the presence of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides (LPS), suggesting its potential use in the dentistry as immunomodulator (Reis *et al.* 2016). All these findings provide a promising basis for evaluating the application of ScLL as a possible agent able to inhibit osteoclastogenesis.

Therefore, the aim of this *in vitro* study was to analyze the ScLL viability on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with LPS, and RAW 264.7 lineage, as well as their inhibitory effects of ScLL on osteoclast formation *in vitro*; the release of tumor necrosis factor (TNF) α and nitric oxide (NO). It was hypothesized that

the treatment with different concentrations of ScLL would: 1) not affect the cell viability of monocyte and macrophage cells; 2) reduce the osteoclastogenesis; 3) reduce the release of TNF- α and increased the production of NO in RAW 264.7 stimulated with RANKL, when compared to negative control group (without treatment).

Materials and Methods

PBMC cell culture

PBMCs were isolated from healthy volunteers (Dentistry School of Federal University of Uberlândia), after written informed consent obtained. The study was approved by the Ethics Committee (Protocol No. 1.480.043). Blood was diluted 1:1 in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brazil), layered over Ficoll[®]PM 400 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and centrifuged at 650 \times g, for 20 min. The interface layer was re-suspended in RPMI and then centrifuged (600 \times g) for a further 10 min after which the resultant cells were re-suspended in media supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Vitrocell Embriolife). Isolated cells were plated in 96-well plates at a density of 5×10^5 cells per well to a final volume of 100 μ l of RPMI containing 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin (complete medium) (Vitrocell Embriolife). After 2 h of incubation, cultures were vigorously rinsed RPMI to remove non-adherent cells, and then maintained in complete medium. After 24 h, cells were stimulated with 1 μ g/ml of LPS from *P. gingivalis* (Invivogen, San Diego, CA, USA) in complete medium for 24 h. Then, the medium containing LPS was removed and the cells were treated with 10 and 5 μ g/ml of ScLL (Federal University of Uberlândia Herbarium) in a fresh medium for 1 and 5 h. The positive control group contained the cells maintained in no stimulated culture medium, representing their physiological behavior. The negative control group contained the cells kept in LPS, mimicking the inflammatory condition. After the period of incubation, the cells were prepared for analysis of cell viability by 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The tests were performed with five samples per group.

RAW 264.7 cell culture

Murine RAW 264.7 macrophage cell lineage was obtained from Cell Bank of Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Cells were plated at a density of 2×10^4 cells/well in

96 well plates containing Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (Vitrocell Embriolife) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin, allowed to adhere overnight. Then, the cells were treated with 10 and 5 $\mu\text{g/ml}$ of ScLL in a fresh medium for 24 h. The positive control group contained the cells maintained in 10% DMEM, representing their physiological behavior. The negative control group contained the cells kept in tap water, mimicking the worst clinically occurring situation. After the period of incubation, the cells were prepared for cell viability analysis by MTT and Alamar blue viability assays. Each test was performed with five samples per group

Cell Viability Assays

The cell viability of PBMCs and RAW were accessed by MTT assay. Then, MTT solution (Sigma-Aldrich) (5 mg/ml) was added to each well, and cells were incubated at 37°C for 4 h. The optical density (OD) at 570 nm was measured using a microplate reader (Biochrom, Cambridge, UK).

In another set of experiments, RAW cells (2×10^4 cells/well) were seeded in 96-well plates and treated with ScLL as describe previously, and the cell viability determined using Alamar Blue assay. Then, the 10% Alamar blue solution (Invitrogen, Karlsruhe, BW, Germany) was added, and cells were incubated at 37°C for 24 h. The OD at 570-600 nm was measured using a microplate reader. In both viability assays the results were expressed as absorbance levels.

Osteoclastogenesis Assay

RAW cells (2×10^4 cells/well) were seeded in a 48-well plate on coverslips in Modified Eagle's Medium Alpha (α -MEM) (Vitrocell Embriolife) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin, allowed to adhere overnight. For osteoclast formation, murine RANKL (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) (50 ng/ml) was added, and cells were cultured for a further 5 days. Medium and reagents were replaced on day 3. The positive control group contained the cells maintained in 10% α -MEM (not induced to differentiation), and the negative control group contained the cells kept in RANKL without ScLL tretament. After the incubation period, the culture medium supernatant was collected for dosage of TNF- α and NO by Elisa and Griess method, respectively.

Tartrate-resistant Acid Phosphatase Activity

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity. Cytochemical staining for TRAP was performed with a commercial kit (Sigma-Aldrich) and used to identify the osteoclasts. The test was performed with four samples per group. TRAP-positive cells containing 3 or more nuclei were considered active osteoclasts. Four images of each coverslip were taken at 10x magnification for analysis. Images were taken using a digital camera (DXM-I200, Nikon, Tokyo, Japan) attached to an optical microscope (Nikon Eclipse E200). The results were expressed as total number of TRAP-positive cells identified per camp of each coverslip.

Immunofluorescence analysis of actin ring

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS, and incubated with 1:200 Phalloidin 488 (Invitrogen) for 1 h. After PBS wash, the cells were incubated with Hoechst (Invitrogen) 1:1000 for 5 minutes, washed again in PBS and then analyzed using an EVOS digital microscope Advanced Microscopy Group (AMG) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The test was performed with four samples per treatment group. Four images of each coverslip were taken at 20x magnification for actin rings analysis. The results were expressed as total number of actin rings identified per camp of each coverslip.

TNF- α cytokine assay

The TNF- α cytokine released in the cell culture supernatants was evaluated using a sandwich ELISA kit (PeproTech), according to the manufacturer's instructions. Absorbance was recorded using a microplate reader at 405-650 nm wavelength. The results obtained for absorbance were interpolated into a standard curve, using the Microplate Manager 4.0 software (Bio-rad, Hercules, CA, USA).

Nitrite Assay

The NO production in the cell culture supernatants was evaluated based on measuring nitrite as a stable end product of NO using the Griess reaction in a microplate assay. In this method, nitrite is first treated with sulfanilamide (SA), in acidic media, followed by addition of N-naphthyl-ethylenediamine (NED). The absorbance of this reaction at 540

nm is linearly proportional to the nitrite concentration in the sample. The results obtained for absorbance were interpolated into a standard curve, using the Microplate Manager 4.0 software.

Statistical Analysis

Data of cell viability, TRAP, immunofluorescence analysis of actin ring, release of TNF- α and NO were analyzed for normality and homoscedasticity using Shapiro-Wilk's and Levene's tests. The one-way ANOVA and Tukey tests were used to compare data for TRAP, actin rings, and NO, between the treated groups. Cell viability (MTT and Alamar Blue), and TNF- α release were evaluated using the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). Dunnett's test was used to compare the control groups (positive and negative) with the experimental groups. Statistical significance was set at $\alpha = 0.05$. Statistical analysis was performed using Sigma Plot 12.0 software (Systat Software, San Jose, CA, USA).

Results

Cell viability

Figure 1 shows cell viability and standard deviations. The levels of cell viability in PBMCs were statistically higher for the group treated with ScLL 5 $\mu\text{g/ml}$ at 1 h, compared with all the groups ($p < 0.05$). No significant differences were found between ScLL 10 $\mu\text{g/ml}$ and positive control group (RPMI) ($p > 0.05$). The values of viability for negative control group (LPS) were statistically lower compared with all the groups ($p < 0.05$) at 1 h. No significant differences were found among ScLL treated groups ($p = 0.437$) at 5 h. The levels of cell viability for ScLL 10 $\mu\text{g/ml}$ were statistically higher than the positive control ($p = 0.036$) at 5 h. No significant differences were found between ScLL 5 $\mu\text{g/ml}$ and positive control ($p > 0.05$) at 5 h. All the ScLL treated groups had significantly higher values of viability than the negative control ($p < 0.05$) at 5 h (Fig. 1A).

No significant differences were found among ScLL and positive control groups ($p > 0.05$) for RAW cells by MTT assay (Fig. 1B). The values of viability for negative control group (tap water) were statistically lower compared with all the groups ($p < 0.001$).

The levels of cell viability were statistically higher for the group treated with ScLL 5 $\mu\text{g/ml}$, compared ScLL 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0.012$) by Alamar Blue assay (Fig. 1C). All the

groups had significantly lower values of viability than positive control ($p < 0.05$), except ScLL 5 $\mu\text{g/ml}$, which was similar to positive control ($p > 0.05$). The values of viability for negative control were statistically lower compared with all the groups ($p < 0.001$).

TRAP Staining and Activity

TRAP-positive multinucleated cells - osteoclasts were observed at day 5 in RAW cultures after RANKL stimulation, whereas the osteoclasts was less expressive in the presence of ScLL (Fig. 2A). No significant differences were found among ScLL treatment and positive control groups ($p > 0.05$) for TRAP activity (Fig. 2B). The cells without treatment and exposed to RANKL (negative control) had significantly the highest values of TRAP activity compared with all the groups ($p < 0.05$).

Actin Rings

The formation of the F-actin ring are shown in Figure 3A. The ScLL treatment reduced the F-actin ring formation, when compared with the negative control group ($p < 0.05$) (Fig. 3B). All the groups had significantly higher F-actin ring formation than positive control ($p < 0.05$).

Release of TNF- α and NO

Figure 4 shows means and standard errors for the release of TNF- α and NO. No significant differences were found between the groups treated with ScLL ($p = 0.339$) for release of TNF- α (Fig. 4A). Statistically significant difference was found among the positive control and all the other groups ($p < 0.05$). The negative control had significantly the lower releases of TNF- α than all the groups ($p < 0.05$).

Regarding the release of NO, ScLL 10 $\mu\text{g/ml}$ had significantly the highest values of NO compared to all the other groups ($p < 0.05$) (Fig. 4B). No significant differences were found among ScLL 5 $\mu\text{g/ml}$, positive and negative control groups ($p > 0.05$).

Discussion

The present study shows that ScLL suppressed the RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW 264.7 macrophage lineage. Though, ScLL has been evaluated in the oral cavity

using other cell models (Reis *et al.* 2016), it is the first report regarding the ScLL as potential anticlastogenic agent.

Firstly, it was evaluated the cell viability of ScLL in PBMCs stimulated with LPS and murine macrophage lineage RAW 264.7. The hypothesis about the cell viability was partially accepted, since the treatment with ScLL did not affect cell viability on both cellular models, except in the concentration of 10 µg/ml. In such concentration, the group treated with ScLL presented lower levels of absorbance than positive control in Alamar blue assay. However, this difference was not observed in the MTT assay, which was performed with two types of cells and different experimental periods. Studies using different cell viability parameters increases the chance of detecting any possible cytotoxic effects related to drug concentration in cell culture assays (De-Deus *et al.* 2009, Scelza *et al.* 2012). The principle of MTT assay is convert yellow tetrazolium salt into dark blue formazan crystals by mitochondrial activity of the cells (Silva *et al.* 2015). Compared with other viability assays, the MTT assay is simple, fast, precise, sensitive and reproducible (Sepet *et al.* 2009). The Alamar Blue assay convert the resazurin (oxidized form), a non-fluorescent, blue indicator into resorufin, which is fluorescent and red in color. It is based on concept that live, metabolizing cells maintain a reducing environment within their cytosol, which can be measured spectrophotometrically using REDOX indicators (Madhumathi *et al.* 2014). The association of these methods allows the evaluation of additional parameters and increases the validity of our results (De-Deus *et al.* 2009). Take into consideration these requirements and based on these findings, no significant toxicity was caused by ScLL 5 µg/ml in any of the cells types, viability assays and experimental time.

Furthermore, it was used LPS to stimulate PBMCs in order to induce cell stress, mimicking the condition observed in the inflammatory response (Seo *et al.* 2012). Thus, it was expected that the presence of LPS could negatively interfere on cell viability. In fact, the groups treated with ScLL showed highest viability than negative control group (LPS), which suggest that ScLL can act on any point of the apoptotic pathway, blocking some molecular event in the apoptotic process.

Considering the difficulty in isolating osteoclasts *in vitro* and in order to evaluate the effects of ScLL on osteoclast precursors, it was used RAW 264. 7 cell lineage on the osteoclastogenesis model. These cultures express RANKL and can grow indefinitely as

osteoclast precursors or differentiate into TRAP-positive multinucleated cells, when co-cultured with RANKL. The osteoclasts obtained by RAW 264.7 cell differentiation express the hallmark characteristics of human osteoclasts *in vivo*, and representative properties including TRAP and cathepsin K (Wei *et al.* 2001, Collin-Osdoby *et al.* 2003). The activity of TRAP is based on a resorptive enzyme found in the membrane of the osteoclasts, and the rate of activity is proportional to the synthesis and secretion of the enzyme (Martins *et al.* 2015). The cathepsin K is a lysosomal cysteine protease localized to the ruffled border in actively resorbing osteoclasts, where it degrades the two main types of collagen, I and II, within the acidic microenvironment of resorption lacunae (Sims & Ng 2014). Furthermore, the activity of cathepsin K is essential to initiate the actin ring formation and activation of osteoclasts (Konig *et al.* 1988). Therefore, in the current study the effects of ScLL on osteoclast formation and activation was performed by TRAP activity and the presence of actin rings. Regarding those parameters, our results demonstrate that second tested hypothesis was accepted, since as ScLL inhibited some aspect of the pathway related to maturation and activity osteoclasts.

Another important factor, enrolled on the formation of multinuclear osteoclasts, is the release of cytokines. TNF- α is considered a potent bone-resorbing factor responsible for stimulating osteoclastic bone resorption *in vitro* and *in vivo* (Konig *et al.* 1988). This inflammatory cytokine is known to modulate RANKL expression, which stimulate osteoclast differentiation by activating NF- κ B through intracellular mechanisms overlapping those of RANKL (Zou *et al.* 2001). Thus, lower levels of TNF- α were expected in the treated groups, since this cytokine act on osteoclastogenic process. Surprisingly, the third tested hypothesis was partially rejected, since as the highest levels of TNF- α were found in the ScLL, followed by positive control group. However, it is possible that the type of linker receptor of TNF- α may not function as pro-apoptotic but rather anti-apoptotic (Saile *et al.* 2001). Furthermore the cellular model used, as well as the interaction with the production of other cytokines not evaluated in this study may have influenced the release of TNF- α by RAW 264.7 cells.

In the bone environment a variety of cells, such as macrophages and osteoclast precursors, release the cytotoxic short-lived reactive radical NO in response to inflammatory cytokines and agents (Hibbs *et al.* 1988). NO acts as a cytotoxic agent in the host-defense mechanism (Kasten *et al.* 1994), and their production in osteoclast cultures regulates normal bone remodeling and pathological bone loss in part through affecting the

recruitment, formation, and activity of bone-resorbing osteoclasts (Zheng *et al.* 2006). Considering that dentin is a mineralized tissue with similar characteristics to bone tissue, and that the mechanisms of resorption involved in both tissues also retain some degree of similarity, it is possible that NO production also affects the mechanisms that regulate the activation of clastic cells in dental root resorption models. Therefore, high NO levels were expected in ScLL groups, since NO-generating compounds could inhibit osteoclast formation and bone resorption (Zheng *et al.* 2006). In the current study, the highest level of NO was found in the ScLL 10 µg/ml, which demonstrate to limit osteoclastogenesis concurrently stimulated by RANKL.

Despite the limitations of the present study, the findings suggest an immunoregulatory role of ScLL in the osteoclastogenesis from RAW 264. 7 cells, and reduction of the activity of mature osteoclasts *in vitro*. However, more studies should be performed using primary model cultures, followed by *in vivo* studies to confirm the role of ScLL as an agent for the prevention and treatment of resorption in replanted teeth after avulsion.

Conclusion

Based on the results of the present study, it can be concluded that ScLL 5 µg/ml suppressed the osteoclastogenesis *in vitro*, without causing cytotoxic effects on PBMC and RAW cells, and had no effect on release of TNF-α and NO release. This study is the first step toward assessing the use of ScLL as agent for the prevention of resorption in avulsed teeth.

Acknowledgments

This study was supported by the Research Support FAPEMIG APQ 02145-14, Foundation of the State of Minas Gerais, CNPq 474505/2013-8, and CAPES.

References

1. Afonso-Cardoso SR, Silva CV, Ferreira MS, Souza MA (2011) Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection in murine macrophages. *Experimental Parasitology* **128**, 61-7.

2. Andreasen JO & Kristerson L (1981) The effect of limited drying or removal of the periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Acta Odontologica Scandinavica* **39**, 1–13.
3. Andreasen JO, Lauridsen E, Andreasen FM (2010) Contradictions in the treatment of traumatic dental injuries and ways to proceed in dental trauma research. *Dental Traumatology* **26**, 16–22.
4. Cardoso MR, Mota CM, Ribeiro DP, *et al.* (2012) Adjuvant and immunostimulatory effects of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex (ScLL) in the mouse model of vaccination against neosporosis. *Veterinary Research* **43**, 76.
5. Collin-Osdoby P, Yu X, Zheng H, Osdoby P (2003) RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells. *Methods in Molecular Medicine* **80**, 153–66.
6. De-Deus G, Canabarro A, Alves G, Linhares A, Senne MI, Granjeiro JM (2009) Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. *Journal of Endodontics* **35**, 1387-90.
7. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **157**, 87-94.
8. Kasten TP, Collin-Osdoby P, Patel N, *et al.* (1994) Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* **91**, 3569-73.
9. König A, Muhlbauer RC, Fleisch H (1988) Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 stimulate bone resorption in vivo as measured by urinary [3H] tetracycline excretion from prelabeled mice. *Journal of Bone and Mineral Research* **3**, 621–627.
10. Madhumathi K, Sampath Kumar TS (2014) Regenerative potential and anti-bacterial activity of tetracycline loaded apatitic nanocarriers for the treatment of periodontitis. *Biomedical Materials* **9**, 035002.
11. Martins CA, Leyhausen G, Volk J, Geurtsen W (2015) Curcumin in Combination with Piperine Suppresses Osteoclastogenesis In Vitro. *Journal of Endodontics* **41**, 1638-45.

12. Reis MV, Moura CC, Silva MV, Souza MA, Soares PB, Soares CJ (2016) Effect of lectin (ScLL) on fibroblasts stimulated with LPS - an in vitro study. *Brazilian Oral Research* **30**, e140.
13. Rogerio AP, Cardoso CR, Fontanari C, *et al.* (2007) Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. *Glycobiology* **17**, 795-804.
14. Saile B, Matthes N, El Armouche H, Neubauer K, Ramadori G (2001) The bcl, Nf κ B and p53/p21WAF1 systems are involved in spontaneous apoptosis and in the anti-apoptotic effect of TGF-beta or TNF-alpha on activated hepatic stellate cells. *European Journal of Cell Biology* **80**, 554-61.
15. Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG (2012) A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *International Endodontic Journal* **45**, 12-8.
16. Schjøtt M & Andreasen JO (2005) Emdogain does not prevent progressive root resorption after replantation of avulsed teeth: a clinical study. *Dental Traumatology* **21**, 46-50.
17. Seo T, Cha S, Kim TI, Lee JS, Woo KM (2012) Porphyromonas gingivalis-derived lipopolysaccharide-mediated activation of MAPK signaling regulates inflammatory response and differentiation in human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Microbiology* **50**, 311-9.
18. Sepet E, Pinar A, İlhan B, Ulukapi I, Bilir A, Tuna S (2009) Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line in vitro. *Quintessence International* **40**, e55-e61.
19. Sharon N & Lis H (1993) Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American* **268**, 82-9.
20. Silva EJ, Neves AA, De-Deus G, *et al.* (2015) Cytotoxicity and gelatinolytic activity of a new silicon-based endodontic sealer. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* **13**, e376-80.
21. Sims NA & Ng KW (2014) Implications of osteoblast-osteoclast interactions in the management of osteoporosis by antiresorptive agents denosumab and odanacatib. *Current Osteoporosis Reports* **12**, 98–106.
22. Trope M (2002) Clinical management of the avulsed tooth: present strategies and future directions. *Dental Traumatology* **18**, 1–11.

23. Trope M (2011) Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dental Traumatology* **27**, 281-94.
24. Wei S, Teitelbaum SL, Wang MW, Ross FP (2001) Receptor activator of nuclear factorkappa b ligand activates nuclear factor-kappa b in osteoclast precursors. *Endocrinology* **142**, 1290–5.
25. Yang W, Ko H, Kim H, Kim M (2015) The effect of cathepsin K inhibitor on osteoclastic activity compared to alendronate and enamel matrix protein. *Dental Traumatology* **31**, 202-8.
26. Zheng H, Yu X, Collin-Osdoby P, Osdoby P (2006) RANKL stimulates inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production in developing osteoclasts. An autocrine negative feedback mechanism triggered by RANKL-induced interferon-beta via NF-kappaB that restrains osteoclastogenesis and bone resorption. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 15809-20.
27. Zou W, HakimI, Tschoep K, Endres S, Bar-Shavit Z (2001) Tumor necrosis factor-alpha mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism. *Journal of Cellular Biochemistry* **83**, 70–83.

Figures

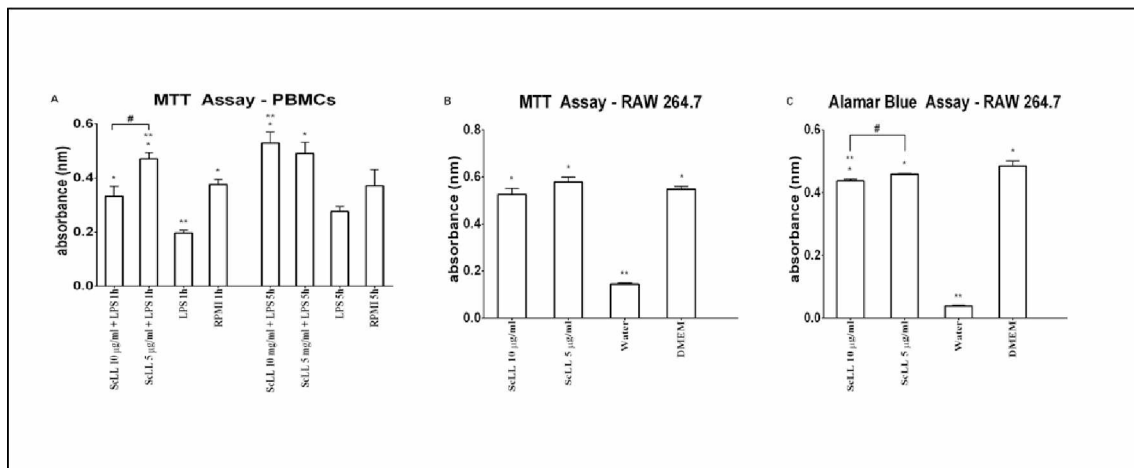


Figure 1. Effect of ScLL on cell viability of PBMCs at 1 h and 5 h (A) by MTT assay, RAW 264.7 at 24 h by MTT assay (B) and Alamar Blue assay (C). Statistical significance was determined using Kruskal-Wallis and Dunnet's test. # $p < 0.05$ compared between the experimental groups. * $p < 0.05$ compared with positive control (RPMI or DMEM). ** $p < 0.05$ compared with negative control (LPS or tap water).

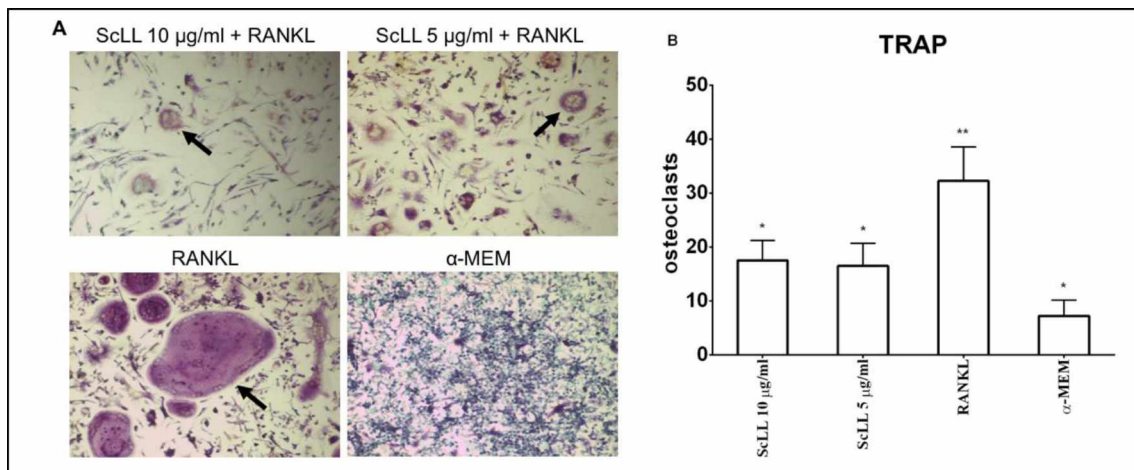


Figure 2. TRAP staining was carried out (A). TRAP-positive multinucleated cells (arrow) of RANK-L treated cells with/without ScLL as well as untreated control cells were photographed (x10 magnification). TRAP activity (B). ** $p < 0.05$ compared with positive control (α -MEM). * $p < 0.05$ compared with negative control (RANKL).

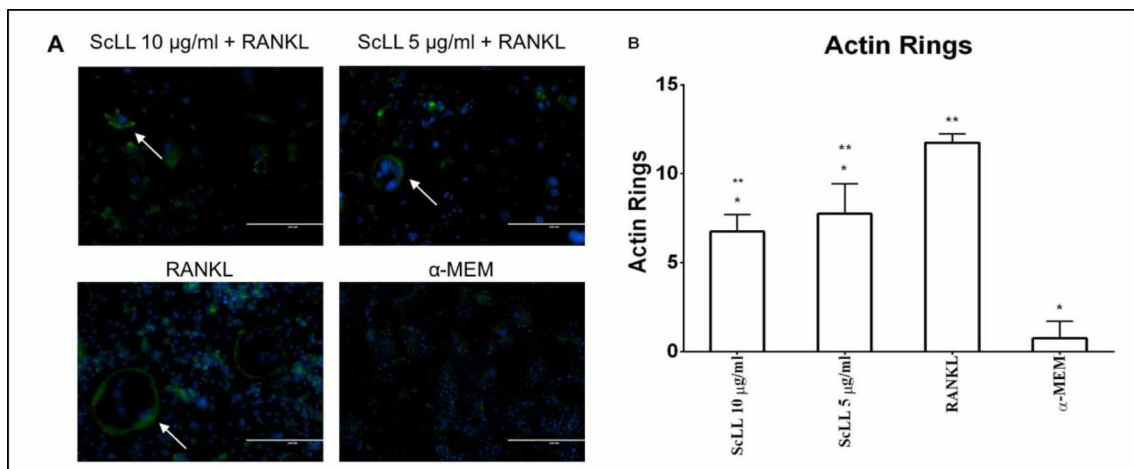


Figure 3. Immunofluorescence was carried out to detect the formation of actin rings (A). The presence of the actin rings of RANK-L treated cells with/without ScLL, and the absence in untreated control cells were photographed (x20 magnification). The number of actin ring formation was confirmed (B). ** $p < 0.05$ compared with positive control (α -MEM). * $p < 0.05$ compared with negative control (RANKL).

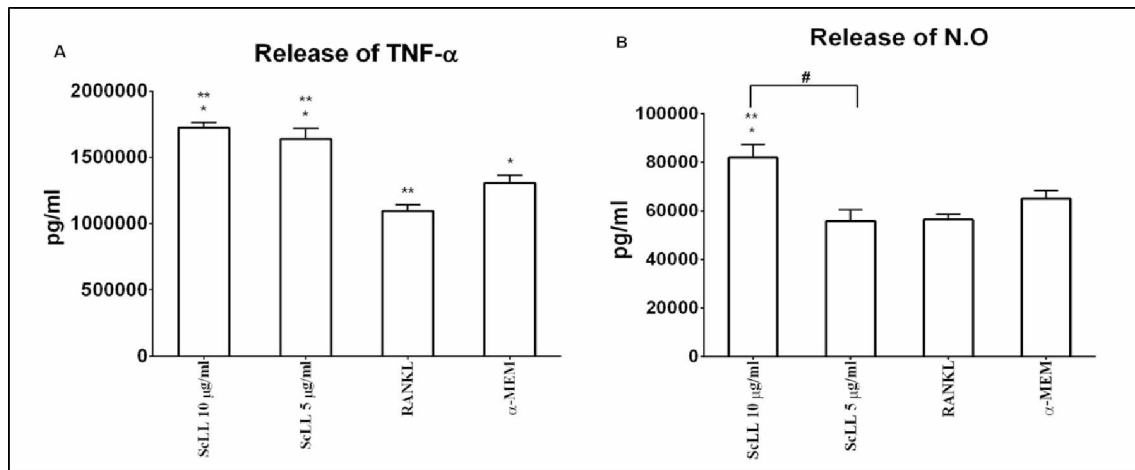


Figure 4. Release of TNF- α (A) and NO (B) in RAW 264.7, examined by Elisa and nitrite assay, respectively. Statistical significance was determined using Kruskal-Wallis, one-way ANOVA and Dunnet's test. # $p < 0.05$ compared between the experimental groups. ** $p < 0.05$ compared with positive control (α -MEM). * $p < 0.05$ compared with negative control (RANKL).

Considerações finais

Na maior parte dos casos de avulsão, o prognóstico está relacionado à resposta inflamatória, o que pode desencadear a reabsorção do dente reimplantado (Roskamp *et al.* 2011). Em busca de minimizar os danos que ocorrem ao ligamento periodontal, é recomendado armazenar o dente em meio ideal que preserve a viabilidade das células. No entanto, os meios de armazenagem recomendados pelas sociedades internacionais, tais como HBSS e leite bovino não possuem capacidade imunomodulatória, não sendo capazes de controlar a resposta inflamatória em reimplantes tardios. Diante disso, substâncias antirreabsortivas têm sido avaliadas *in vitro* e *in vivo* como tratamento radicular previamente ao reimplante tardio. Porém, seus efeitos também não são totalmente efetivos no controle ou prevenção da reabsorção (Panzarini *et al.* 2012). Considerando esses aspectos, o presente estudo que se iniciou com a avaliação de substâncias recomendadas pela comunidade científica, passando posteriormente a avaliar diferentes formulações da água de coco liofilizada, a partir das necessidades observadas por esse grupo, verificou também a necessidade de ir além, e buscar por substâncias que pudessem atuar especificamente nos remanescentes celulares de dentes reimplantados tardiamente, e que, portanto, deveriam ser produtos imunomoduladores. Preferencialmente, seguindo tendência mundial, como observado para a própolis (Pileggi *et al.* 2009), chá verde (Jung *et al.* 2012), curcumina (Martins *et al.* 2015), entre outras, essa nova substância deveria ser obtida a partir de produtos naturais, mas que pudessem atuar na resposta inflamatória e inibir a atividade clástica.

Embora exista diversos estudos *in vitro* e *in vivo* sobre meios de armazenagem para dentes avulsionados, não há consenso na literatura e a cada ano novos e mais consistentes estudos vêm sendo desenvolvido. Isso se deve a variabilidade de novos e promissores modelos experimentais desenvolvidos. Na maioria dos estudos *in vivo*, utiliza-se ratos como modelo experimental. Sabemos que os cães possuem processo de reparo similar aos humanos, conseqüentemente, estudos delineados com este tipo de animal possui maior reprodutibilidade dos resultados. Além disso, a água de coco foi escolhida como substância de eleição no presente estudo, pois é possível manter suas

propriedades quando liofilizada. Na grande parte dos estudos, a água de coco é avaliada sem o ajuste do pH, como demonstrado no estudo *in vivo*, o ajuste do pH é primordial para a manutenção da viabilidade celular. Portanto, estudos *in vivo* são importantes para validar resultados obtidos *in vitro*, e são o primeiro passo para avaliar produtos que precisam ser testados em estudos clínicos.

Os estudos *in vitro* que utilizam modelos celulares para avaliar substâncias anti-inflamatórias são similares ao do presente estudo. A associação de metodologias permite a correlação de diferentes parâmetros o que aumenta a validação dos nossos resultados. Apesar das limitações de um estudo *in vitro*, os resultados deste estudo demonstraram que ScLL na concentração de 5 µg/ml foi a substância com maior efetividade nos principais parâmetros avaliados. Dentre eles, não apresentou citotoxicidade, manteve a proliferação celular, e atuou na inibição da atividade clástica, o que comprova seu potencial como agente imunomodulatório em condições da cavidade oral. Além de suas atividades anti-inflamatórias, ScLL foi a substância de escolha para o presente estudo por ser um produto natural, extraído do látex de uma planta comum na região, e essa lectina é patenteada pela Universidade Federal de Uberlândia. Enquanto que, 15d-PGJ₂ é um produto comercial, vendido em pequenas alíquotas, de difícil manuseio e alto custo, quando comparado a ScLL. Estes fatos justificam a escolha da ScLL para pesquisas futuras em modelos biológicos de maior complexidade, *in vitro* e *in vivo*.

Portanto, frente aos resultados promissores de ACP-404 I e ScLL 5 µg/ml, mais pesquisas serão realizadas usando modelos *in vitro* e *in vivo* para avaliar o potencial dessas substâncias associadas, buscando desenvolver um meio de armazenagem capaz de nutrir as células, mas que também possua potencial imunomodulador para tratamento da superfície radicular de dentes avulsinados. Assim, será possível desenvolver produto comercial que seja de fácil manipulação e acesso para a população.

Conclusões

Dentro das limitações deste estudo que envolveu 4 estudos *in vitro* e 1 *in vivo*, pode-se concluir que clinicamente, o tempo de 1h é fator crucial no prognóstico de dentes reimplantados, pois o dente permanece melhor hidratado, o que contribui para a manutenção da viabilidade celular. Além disso, foi confirmado o potencial da formulação ACP-404 I como possível meio de armazenagem, e ainda, a concentração de ScLL 5 µg/ml demonstrou suprimir a osteoclastogênese *in vitro*, sem causar efeitos na viabilidade celular. Diante do exposto, torna-se possível a associação de ACP-404 I e ScLL 5 µg /ml com intuito de desenvolver um produto comercial para armazenagem de dentes avulsionados que atue na prevenção das reabsorções dentárias, em casos de reimplantes tardios. Porém, enquanto este produto não estiver disponível, ainda recomenda-se o uso do leite integral como meio de armazenagem.

Referências

1. Afonso-Cardoso SR, Silva CV, Ferreira MS, Souza MA. Effect of the Synadenium carinatum latex lectin (ScLL) on Leishmania (Leishmania) amazonensis infection in murine macrophages. **Exp Parasitol.** 2011 May;128(1):61-7.
2. Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, Diangelis AJ et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. **Dent Traumatol.** 2012 Apr;28(2):88-96.
3. Andreasen JO. Etiology and pathogenesis of traumatic dental injuries. **Scand J Dent Res.** 1970;78(4):329-42.
4. Cardoso MR, Mota CM, Ribeiro DP, Noleto PG, Andrade WB, Souza MA, Silva NM, Mineo TW, Mineo JR, Silva DA. Adjuvant and immunostimulatory effects of a D-galactose-binding lectin from Synadenium carinatum latex (ScLL) in the mouse model of vaccination against neosporosis. **Vet Res.** 2012 Oct;43:76.
5. Choi SC, Kwon YD, Kim KC, Kim GT. The effects of topical application on bisphosphonates on replanted rat molars. **Dent Traumatol.** 2010 Dec;26(6):476–80.
6. de Paula Reis MV, Moura CC, Soares PB, Leoni GB, Souza-Neto MD, Barbosa DZ, Soares CJ. Histologic and micro-computed tomographic analyses of replanted teeth stored in different kind of media. **J Endod.** 2014 May;40(5):665-9.
7. aGopikrishna V, Baweja P, Venkateshbabu N, Thomas T, Kandaswamy D. A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2008 Feb;105(2):e61-5.
8. bGopikrishna V, Baweja PS, Venkateshbabu N, Thomas T, Kandaswamy D. Comparison of coconut water, propolis, HBSS, and milk on PDL cell survival. **J Endod.** 2008 May;34(5):587-9.
9. Gunraj MN. Dental root resorption. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1999 Dec;88(6):647-53.
10. Jung IH, Lee DE, Yun JH, Cho AR, Kim CS, You YJ, Kim SJ, Choi SH. Anti-inflammatory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on

- Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-stimulated fibroblasts and stem cells derived from human periodontal ligament. **J Periodontal Implant Sci.** 2012;42(6):185-95.
11. Martins CA, Leyhausen G, Volk J, Geurtsen W. Curcumin in Combination with Piperine Suppresses Osteoclastogenesis In Vitro. **J Endod.** 2015 Oct;41(10):1638-45.
 12. Moreira-Neto JJ, Gondim JO, Raddi MS, Pansani CA. Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. **Int Endod J.** 2009 Sep;42(9):827-30.
 13. Martin MP, Pileggi R. A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. **Dent Traumatol.** 2004 Apr;20(2):85-9.
 14. Moazami F, Mirhadi H, Geramizadeh B, Sahebi S. Comparison of soymilk, powdered milk, Hank's balanced salt solution and tap water on periodontal ligament cell survival. **Dent Traumatol.** 2012 Apr;28(2):132-5.
 15. Moura CCG, Soares PBF, Reis MVP, Fernandes-Neto AJ, Soares CJ. Soy milk as a storage medium to preserve human fibroblast cell viability: an *in vitro* study. **Braz Dent J.** 2012; 23(5):559-63.
 16. Moura CC, Soares PB, de Paula Reis MV, Fernandes Neto AJ, Zanetta Barbosa D, Soares CJ. Potential of coconut water and soy milk for use as storage media to preserve the viability of periodontal ligament cells: an *in vitro* study. **Dent Traumatol.** 2014 Feb;30(1):22-6.
 17. Moura CC, Soares PB, Reis MV, Dechichi P, Salgueiro CC, Sobral MH, Zanetta Barbosa D, Soares CJ. Powdered coconut water as a storage medium to preserve the viability of periodontal ligament cells: a laboratory study. **Int Endod J.** 2017 Jan;50(1):84-89.
 18. Nakamura M, Tsumura H, Satoh T, Matsumoto K, Maruyama H, Majima M, Matsumoto K, Maruyama H, Majima M, Kitasato H. Tumor apoptosis in prostate cancer by PGD(2) and its metabolite 15d-PGJ(2) in murine model. **Biomed Pharmacother.** 2013 Feb;67(1):66-71.
 19. Napimoga MH, da Silva CA, Carregaro V, Farnesi-de-Assunção TS, Duarte PM, de Melo NF, Farnesi-de-Assunção TS, Duarte PM, de Melo NF, Fraceto LF. Exogenous administration of 15d-PGJ2-loaded

- nanocapsules inhibits bone resorption in a mouse periodontitis model. **J Immunol.** 2012 Jul;189(2):1043-52.
20. Panzarini SR, Trevisan CL, Brandini DA, Poi WR, Sonoda CK, Luvizuto ER, Dos Santos CL. Intracanal dressing and root canal filling materials in tooth replantation: a literature review. **Dent Traumatol.** 2012 Feb;28(1):42–8.
 21. Pearson RM, Liewehr FR, West LA, Patton WR, McPherson JC 3rd, Runner RR. Human periodontal ligament cell viability in milk and milk substitutes. **J Endod.** 2003 Mar;29(3):184-6.
 22. Pileggi R, Antony K, Johnson K, Zuo J, Shannon Holliday L. Propolis inhibits osteoclast maturation. **Dent Traumatol.** 2009 Dec;25(6):584-8.
 23. Poi WR, Carvalho RM, Panzarini SR, Sonoda CK, Manfrin TM, Rodrigues TS. Influence of enamel matrix derivative (Emdogain) and sodium fluoride on the healing process in delayed tooth replantation: histologic and histometric analysis in rats. **Dent Traumatol.** 2007 Feb;23(1):35-41.
 24. Quinteiro MS, Napimoga, MH, Mesquita KP, Clemente-Napimoga JT. The indirect antinociceptive mechanism of 15d-PGJ2 on rheumatoid arthritis-induced TMJ inflammatory pain in rats. **Eur J Pain.** 2012 Sep;16(8):1106-15.
 25. Rogerio AP, Cardoso CR, Fontanari C, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, Silva EV, Koyama NS, Basei FL, Soares EG, Calixto JB, Stowell SR, Dias-Baruffi M, Faccioli LH. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology.** 2007 Aug;17(8):795-804.
 26. Roskamp L, Westphalen VP, Carneiro E, Fariniuk LF, Silva Neto UX. The positive influence of atopy on the prognosis of avulsed and replanted teeth despite differences in post-trauma management. **J Endod.** 2011 Apr;37(4):463-5.
 27. Schjott M, Andreasen JO. Emdogain does not prevent progressive root resorption after replantation of avulsed teeth: a clinical study. **Dent Traumatol.** 2005 Feb;21(1):46–50.

28. Silva EJ, Rollemberg CB, de Souza Coutinho-Filho T, Zaia AA. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of soy milk with different storage media. **Dent Traumatol**. 2013 Aug;29(4):319-22.
29. Soares Ade J, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. Relationship between clinical-radiographic evaluation and outcome of teeth replantation. **Dent Traumatol**. 2008 Apr;24(2):183-8.
30. Souza BD, Lückemeyer DD, Reyes-Carmona JF, Felipe WT, Simões CM, Felipe MC. Viability of human periodontal ligament fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and coconut water as storage media. **Int Endod J**. 2011 Feb;44(2):111-5.
31. Souza BDM, Lückemeyer DD, Felipe WT, Simões CM, Felipe MC. Effect of temperature and storage media on human periodontal ligament fibroblast viability. **DentTraumatol**. 2010 Jun;26(3):271-5.
32. Souza MA, Carvalho FC, Ruas LP, Ricci-Azevedo R, Roque-Barreira MC. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconj J**. 2013 Oct;30(7):641-57.
33. Soares PBF, Rocha AM, Reis MVP, Moura CCG, Soares CJ. Evaluation of coconut water neutralized by different agents on the viability of human fibroblasts: an in vitro study. **Rev Odontol UNESP**. 2016;45:234-9.
34. Tuna EB, Yaman D, Yamamoto S. What is the Best Root Surface Treatment for Avulsed Teeth? **Open Dent J**. 2014 Sep;29(8):175-9.
35. Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. **Dent Traumatol**. 2011 Aug;27(4):281-94.
36. Yang W, Ko H, Kim H, Kim M. The effect of cathepsin K inhibitor on osteoclastic activity compared to alendronate and enamel matrix protein. **Dent Traumatol**. 2015 Jun;31(3):202-8.

7.1 - Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais.



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 203/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 101/11

Projeto Pesquisa: "Avaliação da água de coco para armazenagem de dentes
avulsionados. Estudo experimental em cães".

Pesquisador Responsável: Carlos José Soares

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com
animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO
DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE À CEUA PARA FINS DE
ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO.
O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 14 de dezembro de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU

7.2 - Parecer do Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de substâncias moduladoras na preservação de fibroblastos e inibição clástica - Estudo in vitro

Pesquisador: Camilla Christian Gomes Moura

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 49446915.3.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.480.043

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLÂNDIA, 05 de Abril de 2016

Assinado por:
Karine Rezende de Oliveira
(Coordenador)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO HIV-1 NO EIXO DE
SINALIZAÇÃO FPRs/AnxA1 E IMPACTOS NA PROGRESSÃO
DA DOENÇA**

Cláudia Mendonça Rodrigues

Uberlândia-MG

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO HIV-1 NO EIXO DE
SINALIZAÇÃO FPRs/AnxA1 E IMPACTOS NA PROGRESSÃO
DA DOENÇA**

Tese apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Cláudia Mendonça Rodrigues

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Uberlândia-MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R696i
2017 Rodrigues, Cláudia Mendonça, 1985
 Influência da infecção pelo HIV-1 no eixo de sinalização
 FPRs/AnxA1 e impactos na progressão da doença / Cláudia Mendonça
 Rodrigues. - 2017.
 73 f. : il.

 Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Inclui bibliografia.

 1. Imunologia - Teses. 2. AIDS (Doença) - Teses. 3. HIV (Vírus) -
Teses. 4. Infecções por HIV - Teses. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo,
1962. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Cláudia Mendonça Rodrigues

“INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO HIV-1 NO EIXO DE SINALIZAÇÃO FPRs/AnxA1 E IMPACTOS NA PROGRESSÃO DA DOENÇA”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 31 de janeiro de 2017.

Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto

Prof. Dr. Ricardo Ishak

UFPA

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior

ICBIM/UFU

Profa. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim

ICBIM/UFU

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho – orientador

INGEB/UFU

DEDICATÓRIA

A toda minha família que sempre me apoiou durante toda esta jornada, em especial ao meu esposo Cícero e nosso pequeno Theo.

*“O amor só é lindo quando encontramos alguém que
nos transforme no melhor que podemos ser.”*

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me iluminar, proteger e fortalecer durante toda esta jornada.

Ao professor Dr. Luiz Ricardo Goulart, meu orientador, por ter me oferecido esta grande oportunidade, pela confiança em meu trabalho, pelos ensinamentos diários e principalmente por ter me deixado crescer, aprender e amadurecer por meio das minhas próprias decisões, fracassos e conquistas.

Aos meus pais, por acreditarem em meus objetivos e me apoiarem durante a mudança para Uberlândia e durante toda a minha caminhada. À minha mãe em especial, obrigada por abrir mão da sua rotina, por ficar fora de casa por tantos dias para me ajudar durante a finalização da tese. Vocês são meu porto seguro!

Ao meu esposo Cícero, pela compreensão, paciência, companheirismo e o amor imensurável. Com você aprendi a ter garra e a viver um dia de cada vez.

Ao meu anjinho Theo que veio durante a finalização desta tese e me ajudou a passar por tudo com mais calma, paciência e força de vontade.

À minha “maninha” Bruna que me incentivou e foi a responsável pela minha vinda para Uberlândia. Obrigada pelo carinho, pelas longas conversas de apoio, pela troca de conhecimento e pela amizade maravilhosa que contraímos.

Às amigas Jéssica Regina, Izabella Cristina, Larissa Prado, Juliana Franco e Léa Duarte, importantes companheiras de bancada, obrigada pela colaboração, apoio e amizade.

À amiga e professora Dra. Yara Cristina de Paiva Maia, pelo apoio e a importante colaboração na elaboração e correção deste trabalho.

À amiga Angela, pela colaboração, troca de conhecimentos e importante apoio na realização deste estudo.

Ao professor Dr. Jair Pereira da Cunha Junior, pela troca de experiências e apoio durante minha formação como futura docente.

A todos os companheiros do laboratório de Nanobiotecnologia, pelas constantes trocas de conhecimentos, pela amizade e excelente convívio.

Ao Setor de Moléstias Infecciosas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia e ao Dr. Aécio Sebastião Borges, pelo acesso aos pacientes e ajuda na obtenção das amostras.

Aos profissionais do setor de coleta do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, pela ajuda na aquisição das amostras.

À banca examinadora, por aceitarem o convite para avaliar esta tese e pelas importantes contribuições que, com certeza, irão enriquecer bastante o nosso estudo.

A todos do programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas agradeço todo o apoio prestado durante a realização deste doutorado.

Aos voluntários que participaram deste estudo, meus sinceros agradecimentos e respeito.

Aos órgãos de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelos recursos financeiros destinados à realização desta pesquisa.

*“A maior recompensa para o trabalho do homem
não é o que ele ganha com isso,
mas o que ele se torna com isso.”*

John Ruskin

RESUMO

Durante a infecção pelo HIV-1, a imunoativação sistêmica desencadeada por diversos fatores, tem sido uma das principais causas de depleção de células T CD4⁺ e consequente progressão para AIDS. O HIV-1 é capaz de utilizar os receptores de peptídeos formilados (FPRs) como co-receptores não usuais para a infecção. Os FPRs são reguladores importantes da resposta imune e são elementos-chave em muitas condições inflamatórias, mas têm sido marginalmente investigados na infecção pelo HIV-1. Entre os seus ligantes, a Anexina A1 (AnxA1) demonstrou um papel anti-inflamatório significativo em certas condições patológicas, mas funções contraditórias no sangue periférico. Diante disto, por meio da caracterização da expressão gênica e proteica de FPR1, FPR2/ALX, FPR3 e AnxA1 em leucócitos de sangue periféricos, dosagem de AnxA1 em amostras de plasma e estímulo com peptídeo funcional da AnxA1 (Ac2-26), de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de pacientes HIV-1 positivos com carga viral detectável (CVD), não detectável (CVND) e doadores saudáveis (controle), foram investigados os efeitos sistêmicos do HIV-1 sobre a expressão e função dos FPRs, assim como sobre os níveis plasmáticos de AnxA1 e sua translocação. Com isso buscou-se a avaliação da relação existente entre a infecção pelo HIV-1 e o eixo de sinalização FPRs/AnxA1 e quais as consequências para a evolução da doença. O HIV-1 foi capaz de modular os níveis de transcrição e expressão proteica dos FPRs de modo célula específica com aumento da expressão de FPR3 e diminuição de FPR2. A translocação de AnxA1 também foi afetada em todas as populações celulares. AnxA1 foi significativamente detectada em amostras de plasma de pacientes do grupo CVD, o que pode funcionar como um importante marcador prognóstico dos pacientes quanto à eficácia do tratamento. Os estímulos de PBMCs com Ac2-26 induziram uma forte resposta inflamatória em grupos infectados com HIV-1, que foi parcialmente bloqueada pelo seu antagonista BOC-2, sugerindo a sua ação através de FPR1. Este foi o primeiro estudo sobre os efeitos da infecção pelo HIV-1 sobre os FPRs e como a carga viral afeta sua modulação e a translocação da AnxA1. Isto sugere um papel crucial do eixo de sinalização FPRs/ANXA1 na ativação imunológica, inflamação e progressão da doença.

Palavras-chave: AIDS, HIV-1, Imunoativação, FPRs, AnxA1, Inflamação

ABSTRACT

During HIV-1 infection, a systemic immunoactivation triggered by several factors has been a major cause of CD4⁺ T cell depletion and consequent progression to AIDS. HIV-1 is able to use formylated peptide receptors (FPRs) as co-receptors not usual for infection. FPRs are important regulators of immune response and are key elements in many inflammatory conditions, but have been marginally investigated in HIV-1 infection. Among its ligands, Annexin A1 (AnxA1) has demonstrated a significant anti-inflammatory role in certain pathological conditions, but contradictory function in the peripheral blood. Through the characterization of the gene and protein expression of FPR1, FPR2/ALX, FPR3 and AnxA1 in peripheral blood leukocytes, quantification of AnxA1 in plasma samples and stimulation with functional peptide of AnxA1 (Ac2-26) of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HIV-1 positive patients with detectable viral load (DVL), non-detectable (NDVL) and healthy donors (control), we investigated the systemic effects of HIV-1 on the expression and function of FPRs, as well as on plasma levels of AnxA1 and its translocation. The aim of this study was to evaluate the relationship between HIV-1 infection and the FPRs/AnxA1 signaling axis and the consequences for the course of the disease. HIV-1 was able to modulate the levels of transcription and protein expression of FPRs in a cell-specific manner with upregulation of FPR3 and downregulation of FPR2. Translocation of AnxA1 was also affected in all cell populations. AnxA1 was significantly detected in plasma samples from patients of CVD group, which may act as an important prognostic marker of patients regarding the efficacy of the treatment. Stimulation of PBMCs with Ac2-26 induced a strong inflammatory response in HIV-1 infected groups, which was partially blocked by their BOC-2 antagonist, suggesting their action via FPR1. This was the first study about the effects of HIV-1 infection on FPRs and how the viral load affects its modulation and the AnxA1 translocation. This suggests a crucial role for the FPRs/AnxA1 signaling axis in immune activation, inflammation and disease progression.

Key words: AIDS, HIV-1, Immunoactivation, FPRs, AnxA1, Inflammation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Evolução clínica da infecção pelo HIV-1.	18
Figura 2: Representação esquemática da proteína Anexina A1.	23
Figura 3: Translocação da Anexina A1 após ativação celular.	24
Figura 4: Expressão relativa de RNAm de ANXA1 e FPRs em sangue total	36
Figura 5: Níveis de AnxA1 detectados no plasma	37
Figura 6: Citometria de fluxo exibindo o percentual e/ou a mediana da intensidade de fluorescência de células T CD4+ e CD8+ expressando AnxA1 e FPRs.	40
Figura 7: Análises de citometria de fluxo de subpopulações de monócitos e de células dendríticas.	42
Figura 8: Análise de Citometria de Fluxo exibindo o percentual e/ou mediana da intensidade de fluorescência de granulócitos expressando AnxA1 e FPRs.	44
Figura 9: Perfil de citocinas determinado por Cytometry Bead Array (CBA) frente aos estímulos com agonistas e antagonistas de FPRs	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos mecanismos que suportam a ativação imunológica sistêmica crônica no contexto da infecção pelo HIV-1.	19
Tabela 2. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes infectados pelo HIV-1 com carga viral detectável (CVD) e não detectável (CVND).	34
Tabela 3. Histórico de doenças oportunistas e contagem de CD4 de pacientes HIV-1 positivos com carga viral detectável (CVD) e não detectável (CVND).	35
Tabela 4. Coeficientes de correlação de Spearman, Pearson e seus valores de p entre os dados laboratoriais: carga viral (CV), linfócitos T CD4 +, doenças oportunistas (DO), expressão transcricional de ANXA1, FPR3 e níveis plasmáticos de AnxA1.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Transportadores Cassete de ligação a ATP
AF647	Alexa Fluor 647
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALX	Receptor da lipoxina A4
ANXA1	Proteína Anexina A1
ATP	Trifosfato de Adenosina
BOC-2	<i>t-butoxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe</i> , antagonista de FPR1 e FPR2/ALX
BSA	Albumina de Soro Bovino
BV-2	Linhagem de Células Microgliais
Ca	Cálcio
CBA	<i>Cytometry Bead Array</i>
CCR	Receptor de Quimiocinas
CD	Cluster de Diferenciação
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CI	Intervalo de Confiança
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTLs	Linfócitos T Citotóxicos
CV	Carga Viral
CVD	Carga Viral Detectável
CVND	Carga Viral Não Detectável
CXCR	Receptor de Quimiocinas
DCs	Células Dendríticas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico

DO	Doenças Oportunistas
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
ENV	Glicoproteína de Envelope Viral
FcεRI ⁺	Receptor de IgE de Alta Afinidade
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Fmlp	<i>N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine</i> , agonista de FPRs
FPR	Receptor de Peptídeos Formilados
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
gp41	Glicoproteína 41
h	Horas
HAART	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana – 1
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HRP	Enzima Peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleucina
KDa	Kilodalton
LPS	Lipolissacarídeo
MALT	Tecido Linfoide Associado à Mucosa
MIF	Mediana da Intensidade de Fluorescência
min	Minutos
mL	Mililitros
n	Tamanho Amostral
nm	Nanômetros
OGD/R	Privação de Oxigênio-Glicose e Reoxigenação

p	Probabilidade de significância
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS	Tampão Fosfato Salino
PE	Ficoeritrina
PE/CY	Ficoeritrina Cianina
PerCP/Cy5.5	Complexo Peridina - Clorofila – Proteína/ Cianina 5.5
pg	Picograma
PKC	Proteína Quinase C
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
r	Coefficiente de correlação
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI1640	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa
SIV	Vírus da Imunodeficiência Simiana
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TCR	Receptor de células T
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
UV	Ultravioleta
WKYMVm	Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met-NH ₂ , peptídeo agonista de FPRs

WRW4	Trp-Arg-Trp-Tp-Trp-Trp-NH ₂ , peptídeo antagonista de FPR2/ALX e FPR3
------	--

%	Porcentagem
---	-------------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 O paradoxo da resposta imune contra a infecção pelo HIV-1	16
1.2 Receptores de peptídeos formilados (FPRs): co-receptores alternativos para o HIV-1 e moduladores da resposta imune	20
1.3 Anexina A1: ligante de FPRs e moduladora da inflamação	22
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Obtenção de amostras biológicas	28
4.2 Determinação do perfil transcricional de ANXA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3	29
4.3 ELISA <i>in-house</i> para detecção Anexina A1 humana	29
4.4 Citometria de Fluxo para detecção de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 em leucócitos de sangue periférico	30
4.5 Cultura e estímulos de células mononucleares de sangue periférico.....	31
4.6 <i>Cytometry Bead Array (CBA)</i> para detecção de citocinas em culturas de PBMCs.....	32
4.7 Análises Estatísticas	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1 Caracterização dos pacientes infectados pelo HIV-1	33
5.2. Determinação do perfil transcricional de ANXA1, FPR1, FPR2/ALX, FPR3	35
5.3 ELISA <i>in-house</i> para detecção Anexina A1 humana.....	36
5.4 Análise de correlação entre expressão transcricional de FPR3, ANXA1, níveis plasmáticos de AnxA1, contagens de CD4, carga viral e histórico de doenças oportunistas	37
5.5 Análise de Citometria de Fluxo para detecção de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 em leucócitos de sangue periférico	38
5.6 Cultura e estímulos de células mononucleares de sangue periférico.....	45
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO	54
8. PERSPECTIVAS	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE.....	66
ANEXOS	70

1. INTRODUÇÃO

Embora o advento da Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART), a AIDS continuam sendo uma das maiores preocupações de saúde pública em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, desde o início da epidemia que ocorreu por volta de 1980, cerca de 70 milhões de pessoas foram infectadas pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), sendo que 35 milhões de pessoas morreram devido à infecção. Os dados demonstraram ainda que, globalmente, cerca de 36,7 milhões de pessoas viviam com o HIV até o final de 2015 (WHO, 2015). Ainda que esforços continuem sendo lançados em busca da melhor compreensão e cura da doença, diversas lacunas ainda existem no esclarecimento da patogênese da infecção pelo HIV, sobretudo no que diz respeito ao paradoxo da infecção que é caracterizado pela imunodeficiência linfocitária contextualizada à imunoativação sistêmica, fatores extremamente envolvidos na progressão da doença (APPAY; SAUCE, 2008; HAZENBERG et al., 2003).

1.1 O paradoxo da resposta imunológica contra a infecção pelo HIV-1

A resposta imunológica à infecção pelo HIV-1 compreende diversos componentes e mediadores associados tanto à imunidade inata quanto adaptativa. O HIV-1 é capaz de infectar preferencialmente as células T CD4+, embora monócitos/macrófagos e células dendríticas possam também ser alvos. A depleção de células T CD4+ é o evento principal associado à patogênese do HIV-1, sendo que as células presentes nos tecidos linfoides como linfonodos e aqueles associados à mucosa, como o trato gastrointestinal, são as mais acometidas (BRENCHLEY et al., 2004; MACALLAN, 2013).

A fase inicial ou aguda da infecção é marcada principalmente pela ação direta do HIV-1, que induz intensa depleção de células T CD4+ CCR5+ de memória residentes em tecidos linfoides associados à mucosa (MALT) (BRENCHLEY et al., 2004; MEHANDRU et al., 2004) (Figura 1). Nesta fase, o paciente infectado geralmente apresenta apenas sintomas inespecíficos como febre, dor de garganta ou dores no corpo. Cerca de apenas 2 a 3 semanas após a infecção, a replicação do HIV-1 já estabelecida nestas células ocasiona a perda massiva das células T CD4+ CCR5+ de memória. As células T CD4+ residentes nos MALT são integrantes de suma importância na defesa imunológica, funcionando como barreira contra patógenos invasores. Desta forma, a depleção massiva destas células acarreta perda

importante do bom funcionamento da barreira, levando o paciente a uma maior propensão à aquisição de infecções oportunistas, o que induz, como consequência, a um estado de ativação imunológica sistêmica crônica (DERDEYN; SILVESTRI, 2005).

Os eventos que marcam a transição entre fase aguda e crônica ainda são muito pouco compreendidos. No entanto, acredita-se que esta etapa seja marcada pela montagem de respostas efectoras de linfócitos T citotóxicos (CTLs) específicos contra o HIV-1, assim como respostas humorais, ambas atuando no controle da replicação viral (DERDEYN; SILVESTRI, 2005). Contudo, embora a atuação de CTLs seja de grande relevância no controle da replicação viral e progressão da doença, o HIV-1 sofre mutações importantes que funcionam como mecanismo de escape ao reconhecimento por CTLs. O mais importante é que estas mutações geram variantes que podem ser transmitidas para outros indivíduos infectados, o que torna o cenário da resposta imune anti-HIV ainda mais crítico (DERDEYN; SILVESTRI, 2005; JONES et al., 2004).

Como se não bastasse, o HIV-1 ainda é capaz de escapar da ação da resposta imune humoral, tornando a atuação dos anticorpos neutralizantes ineficientes. A glicoproteína de envelope viral (ENV), por exemplo, é extremamente variável principalmente nas regiões que compõem a superfície viral, o que dificulta o reconhecimento por anticorpos neutralizantes (DERDEYN; SILVESTRI, 2005; GASCHEN et al., 2002). Sendo assim, acredita-se que esta falha no combate à infecção proporcione um ambiente marcado por intensa imunoativação sistêmica devido à replicação viral crônica.

Durante a fase crônica, também chamada de latência clínica, o paciente pode não apresentar nenhum sintoma, no entanto, é capaz de transmitir facilmente a infecção para outro indivíduo. Mesmo sem HAART o paciente pode passar anos nesta fase de latência até a progressão para AIDS. A fase crônica é marcada por uma batalha na qual o sistema imune tenta combater a infecção, enquanto o HIV-1 continua lançando mão de mecanismos de escape para burlar a ação do sistema imunológico e prosseguir com sua replicação. Sendo assim, nesta fase a replicação viral continua, porém em menores níveis, enquanto a contagem de células T CD4⁺ no sangue periférico segue em declínio, embora de modo mais lento (DERDEYN; SILVESTRI, 2005) (Figura 1).

Com o passar dos anos, a perda gradual crônica de células T CD4⁺ e o ciclo contínuo de infecção pelo vírus fazem com que o sistema imunológico se torne severamente comprometido. Com isso os pacientes tornam-se predispostos à aquisição de doenças oportunistas mediadas por protozoários, bactérias, fungos e vírus, como por exemplo, *Toxoplasma*, *Mycobacterium avium*, *Pneumocystis* e Citomegalovírus, respectivamente. Estes

eventos caracterizam a fase de AIDS e é marcada também pela contagem de células T CD4⁺ menor que 200 células/ μ L. Com o estabelecimento da AIDS ocorre ainda a síndrome de perda de peso e cânceres relacionados ao HIV, como por exemplo, Sarcoma de Kaposi, Carcinoma cervical e alguns tipos de linfomas (BOULOUGOURA; SERETI, 2016; SCHNEIDER et al., 2008) (Figura 1).

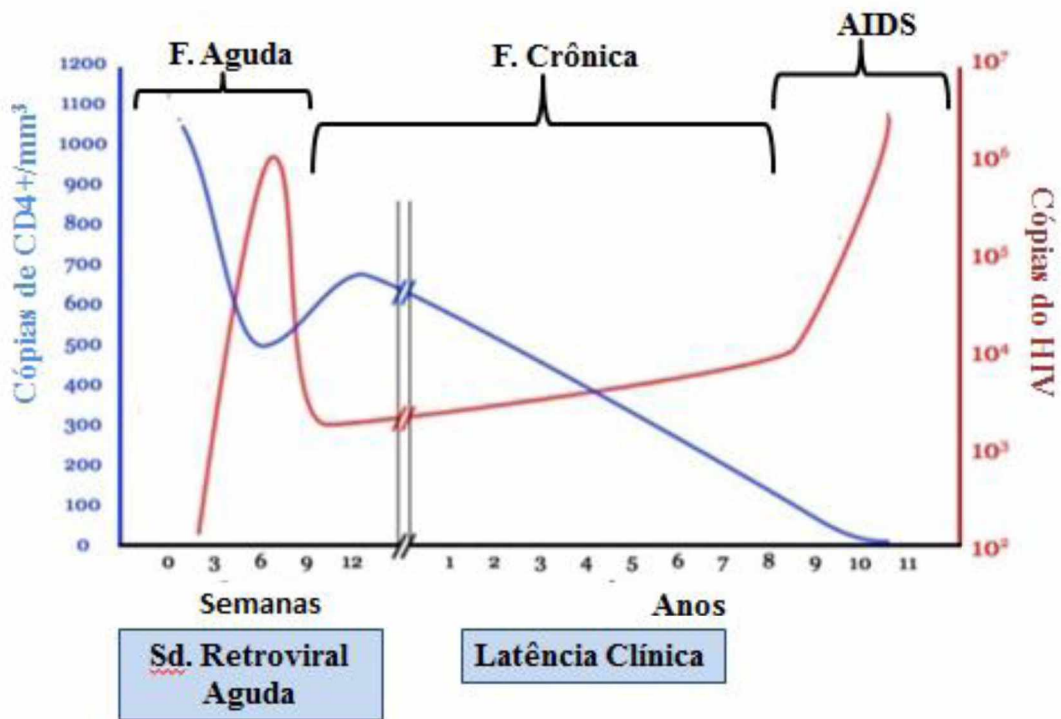


Figura 1: Evolução clínica da infecção pelo HIV-1. A intensa replicação viral determina o curso clínico da doença por meio da massiva depleção de células CD4⁺ e consequente colapso do sistema imunológico. O processo de infecção caracteriza-se pela existência de uma fase aguda (Síndrome Retroviral Aguda) marcada por intensa depleção de células CD4⁺ e forte replicação viral que duram algumas semanas, uma fase crônica (Latência Clínica) que pode durar anos e é caracterizada pela manutenção da replicação viral e depleção de células CD4⁺, porém de modo mais lento. Com a progressão da infecção, instala-se a fase de AIDS propriamente dita, definida por depleção de células CD4⁺ abaixo de 200 células /mm³, altos níveis de carga viral e descontrole do sistema imunológico. Fonte: adaptado (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014).

Com a evolução do processo de infecção, a ativação imunológica sistêmica crônica é instalada, sendo apontada como a principal causa da depleção de células T CD4⁺. Desta forma, a constante perda de células T CD4⁺ determina a imunodeficiência linfocitária e marca o paradoxo da resposta imune anti-HIV. Neste contexto, a ativação imunológica sistêmica crônica pode ser dirigida por diversos mecanismos como descritos na tabela abaixo.

Tabela 1. Descrição dos mecanismos que suportam a ativação imunológica sistêmica crônica no contexto da infecção pelo HIV-1.

Mecanismos	Descrições	Ref.
Replicação do HIV-1 e Resposta Imune Antiviral	<ul style="list-style-type: none"> A interação direta do HIV-1 com o receptor CD4 e seus co-receptores durante o processo de infecção induz a ativação de células alvos. O HIV-1 é capaz de ativar células pela ligação a TLR7, 8 e 9. Excessiva produção de citocinas pró-inflamatórias estimula a expressão de moléculas pro apoptóticas e induz disfunção de células Tregs aumentando a ativação celular. A infecção causa intenso <i>turnover</i> de células T, caracterizando-se pela presença de células T CD4⁺ e CD8⁺ intensamente diferenciadas que se tornam disfuncionais na produção de citocinas, na diversidade de repertório de receptores de células T e maior suscetibilidade a morte induzida pela ativação. Com isso a defesa torna-se prejudicada, há maior suscetibilidade a aquisição de doenças oportunista, acelerando o processo de ativação imune crônica. 	(APPAY et al., 2007; BIRX et al., 1990; COOPER et al., 2013; HERBEUVAL et al., 2005; HO et al., 1995; MEIER et al., 2007; PAIARDINI; MULLER-TRUTWIN, 2013; WEISS et al., 1989)
Reconhecimento de proteínas virais	<ul style="list-style-type: none"> Proteína codificada pelo gene Nef do HIV-1 contribui diretamente para a ativação imune tornando as células T CD4⁺ infectadas sensíveis à nova estimulação por meio do receptor de células T (TCR). 	(MUNCH et al., 2007; SCHINDLER et al., 2006)
Resposta imune a infecções reativas	<ul style="list-style-type: none"> Indivíduos que já apresentavam infecções latentes crônicas por outros tipos virais como Citomegalovírus, Epstein-Baar vírus, dentre outros, podem apresentar reativação da infecção e assim maior ativação imunológica. 	(BOULOUGO URA; SERETI, 2016; DOISNE et al., 2004)
Perda de células Th17	<ul style="list-style-type: none"> A depleção preferencial de células do perfil Th17 corrobora com a perda da integridade da barreira de mucosa, que é acompanhada da detecção de produtos microbianos na circulação e indução de imunoativação sistêmica. 	(CECCHINATO et al., 2008; PRENDERGAS T et al., 2010)
Disfunção e depleção de células Tregs	<ul style="list-style-type: none"> A infecção marca a intensa disfunção e depleção de células Tregs, o que induz o aumento da ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ e de marcadores plasmáticos de translocação bacteriana. 	(CHASE et al., 2007; EGGENA et al., 2005; EPPLER et al., 2006)
Translocação de produtos bacterianos	<ul style="list-style-type: none"> A depleção severa de células T CD4⁺ CCR5⁺ no trato gastrointestinal durante a fase aguda da doença, compromete a integridade da barreira de mucosa intestinal, favorecendo a translocação bacteriana. Produtos bacterianos como LPS, flagelina, dentre outros, são detectados na circulação sistêmica e desencadeia ativação imunológica com alta produção de citocinas pró-inflamatórias. 	(BRECHLEY et al., 2006; BRECHLEY et al., 2004; VEAZEY et al., 1998)
Produção de mediadores pró-inflamatórios	<ul style="list-style-type: none"> Mediadores inflamatórios tais como interferons (IFN) do tipo I, IL-6, IL-1β e TNF-α, são produzidos por células da imunidade inata após o reconhecimento viral por meio de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs), o que contribui para ativação imune crônica. 	(BIRX et al., 1990; MOLINA et al., 1989; WEISS et al., 1989)

Como descrito, durante este processo de ativação imunológica crônica é possível detectar o aumento de biomarcadores solúveis de inflamação (citocinas e mediadores) produzidos pelas células ativadas, principalmente por macrófagos. Muitos biomarcadores inflamatórios, como TNF- α , IL-6 e IFN- α , aumentam durante a infecção aguda, refletindo a ativação do sistema imune inato e coincidindo com o pico de viremia, e diminuem na infecção crônica, mas ainda permanecendo em níveis elevados (SANDLER; SERETI, 2014; STACEY et al., 2009). A detecção destes marcadores inflamatórios tem sido identificada como preditora independente de progressão da doença e eventos clínicos (SANDLER; SERETI, 2014; TENORIO et al., 2014).

Sendo assim, a ativação do sistema imunológico frente à infecção pelo HIV-1 deveria ser encarada como um processo comum e positivo, assim como se observa quando o organismo entra em contato com outros patógenos. No entanto, observa-se que esta defesa do organismo funciona contraditoriamente, podendo tanto atuar na limitação da replicação viral e progressão da doença, como estimular ainda mais a depleção de células T CD4+, instalando o caos na resposta imune anti-HIV e conduzindo à imunodeficiência severa e progressão para AIDS. Desta forma, este paradoxo da resposta imune anti-HIV parece envolver diversas vias de sinalizações e mediadores ainda desconhecidos que precisam ser elucidados.

1.2 Receptores de peptídeos formilados (FPRs): co-receptores alternativos para o HIV-1 e moduladores da resposta imune

Os receptores de peptídeos formilados (FPRs) apresentam sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G e foram identificados em 1976 como um sítio de ligação de alta afinidade para o peptídeo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) na superfície de neutrófilos (LE; MURPHY; WANG, 2002; MIGEOTTE; COMMUNI; PARMENTIER, 2006). Três membros desta família já foram identificados em humanos, os quais são codificados por diferentes genes e denominados de FPR1, FPR2/ALX e FPR3 (LE et al., 2002; MURPHY et al., 1992). Estes receptores estão amplamente distribuídos em diferentes tipos de células, incluindo células da resposta imunológica, como monócitos, neutrófilos e linfócitos, e também em células endoteliais ou epiteliais. Os neutrófilos humanos expressam FPR1 e FPR2 / ALX, mas não FPR3 (DORWARD et al., 2015; MOCSAI; WALZOG; LOWELL, 2015), monócitos apresentam todos os três receptores (CROUSER et al., 2009; LE; OPPENHEIM; WANG, 2001), e linfócitos expressam apenas FPR1 e FPR2 / ALX, porém em níveis mais baixos em comparação aos neutrófilos e monócitos (MIGEOTTE

et al., 2006). O FPR2/ALX é o receptor de baixa afinidade para fMLP, sendo que sua ativação *in vitro* é realizada a partir de altas concentrações de fMLP. O FPR3 não responde a peptídeos formilados, mas se liga a alguns peptídeos não formilados que se associam ao FPR2/ALX (LE et al., 2002).

Os FPRs são ainda vulgarmente conhecidos como receptores promíscuos, justamente devido à existência de uma variedade de diferentes classes de ligantes que são capazes de ativá-los induzindo distintas consequências funcionais (MIGEOTTE et al., 2006). Estes receptores foram descritos como moduladores importantes da resposta imunológica, atuando de modo eficiente na defesa do hospedeiro, podendo ligar-se a diferentes agonistas, incluindo peptídeos N-formilados e não-N-formilados (VANCOMPERNOLLE et al., 2003; YANG, D. et al., 2002). Existem evidências de que ligantes de FPRs, agindo como agonistas ou antagonistas, podem servir como agentes terapêuticos úteis na defesa do hospedeiro, e como imunomoduladores seletivos para aumentar as respostas imunitárias inatas, de modo a reduzir os efeitos adversos associados à inflamação, doenças infecciosas e câncer (SCHEPETKIN et al., 2014).

Embora já esteja bem descrito os receptores e co-receptores comuns que estão envolvidos na invasão das células pelo HIV-1, sob determinadas condições, o vírus pode associar-se a outros co-receptores não usuais para o processo de infecção (CALADO et al., 2010). O FPR2/ALX foi descrito como um co-receptor alternativo e eficiente para o HIV-1, desvendando uma nova via de entrada em células T CD4⁺ (COETZER et al., 2011; NEDELLEC et al., 2009; SHIMIZU et al., 2008). Além disso, a ativação de FPR2/ALX pelo seu agonista WKYMVm é capaz de induzir a dessensibilização heteróloga de CCR5 e CXCR4, o que prejudicaria a infecção pelo HIV-1 (LI et al., 2001).

Além disso, existem relatos de que durante a infecção pelo HIV-1, peptídeos como T20/DP 178, T21/DP 107 derivados da proteína gp41 do HIV-1 podem atuar como agonistas de FPR1 e FPR2/ALX (SU; GAO; et al., 1999; SU; GONG; et al., 1999), assim como outros domínios antigênicos das proteínas do envelope viral da gp120 do HIV-1 também já foram relatados como potentes estimuladores quimiotáticos desses receptores (DENG et al., 1999).

Ao mesmo tempo, outro estudo onde se considerou os efeitos de vários peptídeos também derivados de gp41 sobre a quimiotaxia de basófilos e a liberação de histaminas e citocinas, foi possível perceber que os peptídeos sintéticos 2019 e 2021 promoveram a migração de células FcεRI⁺ (receptor de IgE de alta afinidade) e foram capazes de inibir a síntese de IL-13 através da interação com FPRs (DE PAULIS et al., 2002).

Além de considerado um novo e competente co-receptor para infecção pelo HIV-1, o FPR2/ALX pode ainda atuar como um fator bifuncional na infecção pelo HIV-1, promovendo ou prevenindo a infecção frente a determinadas condições. Um fator interessante é que o FPR2/ALX encontra-se geneticamente próximo aos receptores de quimiocinas (CKRs) e apresenta certa similaridade estrutural a estes, contendo dois resíduos de tirosinas e ácidos glutâmicos em sua região N-terminal (SHIMIZU et al., 2008).

Como já descrito, a atuação dos FPRs como co-receptores não usuais para a infecção pelo HIV-1 tem sido intensamente explorada, no entanto, não existem relatos dos efeitos da infecção sobre a expressão dos FPRs nos vários subtipos celulares envolvidos na resposta imune e quais as consequências desta modulação dos receptores na inflamação, imunoativação sistêmica e progressão da doença.

1.3 Anexina A1: ligante de FPRs e moduladora da inflamação

A AnxA1 é uma proteína descrita como ligante e agonista de FPRs e por meio destes desempenha funções relevantes em diversos processos patológicos e fisiológicos. É uma proteína de 37 KDa anteriormente denominada como macrocortina, renocortina, lipomodulina ou lipocortina-1. Foi descrita no final dos anos 70 como uma proteína induzida por glicocorticoide, com potente atividade inibidora de fosfolipase (BLACKWELL et al., 1980; LIM; PERVAIZ, 2007; ROTHHUT et al., 1983) e, portanto, com potencial ação anti-inflamatória. (D'ACUNTO et al., 2014).

Estruturalmente as anexinas apresentam um domínio principal (C-terminal) altamente conservado contendo quatro dobras repetidas de uma sequência de 70 aminoácidos, responsável pela ligação Ca^{2+} -dependente aos fosfolipídios e uma região N-terminal responsável pelas propriedades específicas de cada anexina (ROSENGARTH; GERKE; LUECKE, 2001) (Figura 2).

A AnxA1 é encontrada em diversas células e tecidos, sendo que em células do sangue periférico é encontrada principalmente em grânulos de neutrófilos, eosinófilos e monócitos e em menores níveis em linfócitos (GOULDING et al., 1998; MORAND et al., 1995; PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009).

Esta proteína tem sido descrita como bioativa em diversos mecanismos celulares e sistêmicos, fazendo interações com uma variedade de moléculas, o que permite que a mesma auxilie em diversos processos patológicos (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009). A AnxA1 pode atuar, por exemplo, na maquinaria de proliferação celular, na modulação do processo

inflamatório, na regulação da sinalização de morte celular, na fagocitose de células apoptóticas e no processo de carcinogênese (LIM; PERVAIZ, 2007).

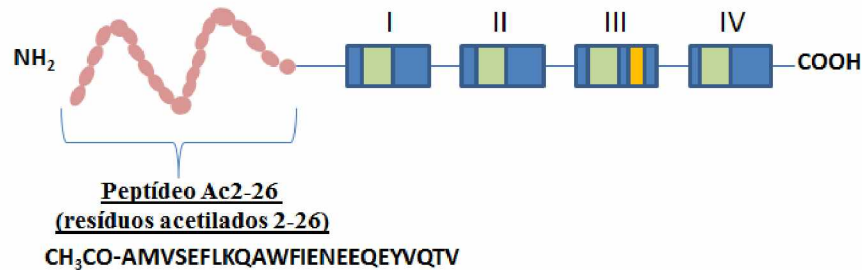


Figura 2: Representação esquemática da proteína Anexina A1. Representação esquemática da proteína Anexina A1 com destaque para seu sítio ativo com possíveis ações anti-inflamatórias (peptídeo Ac2-26).

A AnxA1 é uma proteína solúvel que em repouso é predominantemente encontrada no citoplasma, porém pode ser translocada para o núcleo ou para fora da célula, sendo que este processo de translocação parece depender da sinalização via tirosinas-quinases (D'ACUNTO et al., 2014). A partir da ativação celular e especialmente em condições inflamatórias, a AnxA1 é translocada para a membrana celular, e assim secretada para o meio extracelular, apresentando funções autócrinas, parácrinas e justácrinas (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009). Esta proteína pode ser translocada via transportador ABC-ligante de ATP (WEIN et al., 2004), via serino-fosforilação da região terminal (SOLITO et al., 2006) ou pela externalização através de vesículas derivadas da membrana plasmática (LEONI et al., 2015) (Figura 3).

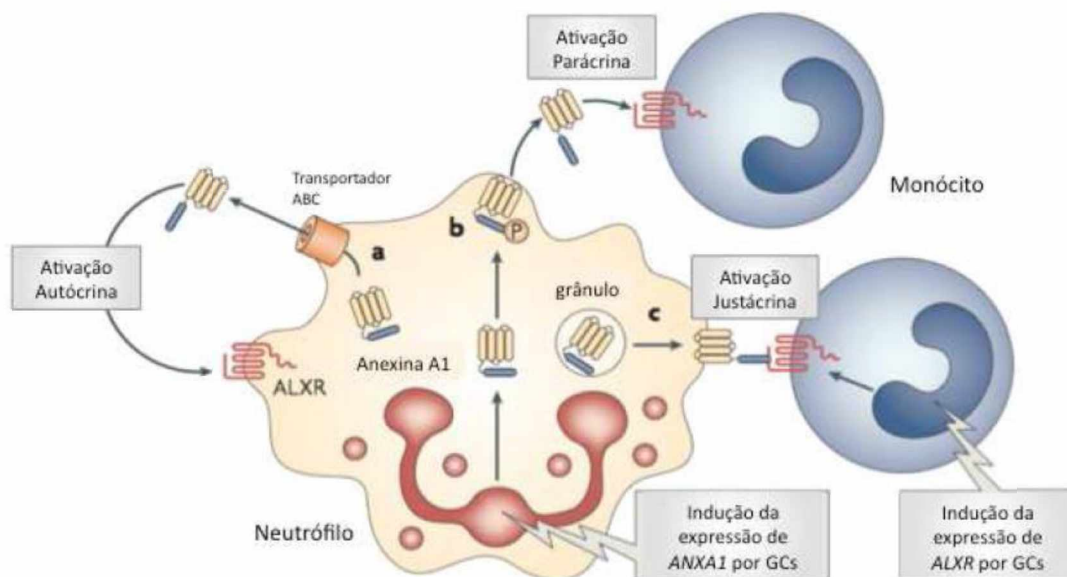


Figura 3: Translocação da Anexina A1 após ativação celular. A partir da ativação celular desencadeada por diversos fatores, a anexina A1 intracelular pode ser translocada para a membrana plasmática, podendo ser secretada por meio de três principais mecanismos: via transportador ABC-ligante de ATP (a), via serino-fosforilação da região terminal (b) ou pela externalização através de grânulos contendo a proteína ou vesículas derivadas da membrana plasmática (c). Uma vez externalizada, a anexina A1 é capaz de agir de forma autócrina, parácrina ou justácrina ativando seu receptor ALXR (FPR2/ALX). Os glicocorticoides (GCs) são os principais indutores da produção da anexina A1, assim como da expressão de FPR2/ALX. Fonte: adaptado (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009).

Estudos demonstram que a atividade anti-inflamatória da AnxA1 é desempenhada pela sua região N-terminal e seu processo de sinalização externa realizado a partir da sua associação a receptores específicos (LIM; PERVAIZ, 2007). Os FPRs foram descritos como receptores sensíveis à ligação da AnxA1, sendo que esta apresenta maior afinidade ao FPR1 e FPR2/ALX. Entretanto, experimentos *in vitro* demonstraram que um peptídeo mimético da proteína AnxA1 derivado da sua região N-terminal, Ac1-25, pode ativar todos os três FPRs em concentrações similares e dessensibilizá-los, modulando, assim, a migração de leucócitos (ERNST et al., 2004). Além disso, o peptídeo Ac2-26 (Figura 2) tem sido descrito como o principal responsável pelas ações anti-inflamatórias da AnxA1, podendo atuar tanto via FPR1, quanto FPR2/ALX (GAVINS et al., 2003; PERRETTI, 1998).

Embora seja extremamente descrita a ação anti-inflamatória da AnxA1 em diversos processos patológicos, o seu real papel funcional é dependente da sua localização, tipo celular e microambiente em que esta inserida. Em células da imunidade inata, principalmente em

fagócitos, a AnxA1 está associada à inibição do recrutamento destas células e resolução do processo inflamatório (DALLI et al., 2012). Já em células da imunidade adaptativa, como linfócitos, sua atividade parece oposta. Estudos demonstraram que esta proteína foi capaz de induzir ativação e proliferação de linfócitos pré-ativados, porém não daqueles em repouso (D'ACQUISTO; PASCHALIDIS; et al., 2007). Isto sugere uma atuação pró-inflamatória da AnxA1 especialmente via FPR2/ALX. As ações pró-inflamatórias da AnxA1 também já foram descritas em outros tipos celulares. Tagoe e colaboradores (2008), demonstraram que a AnxA1 é capaz de mediar a secreção de metaloproteinase – 1 a partir de fibroblastos sinoviais de artrite reumatoide, frente a ativação via TNF- α (TAGOE et al., 2008). Por outro lado, após ser fosforilada por PKC e translocada para o núcleo de células microgliais BV-2 que sofreram lesão de OGD/R (privação de oxigênio-glucose e reoxigenação), a AnxA1 é capaz de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (ZHAO et al., 2016).

O papel da AnxA1 tem sido retratado em diversos processos patológicos, no entanto, é escassamente explorada durante a infecção pelo HIV-1. Um estudo detectou o aumento da expressão transcricional da ANXA1 sistêmica em macacos sob infecção crônica por SIV (vírus da imunodeficiência símia), porém não detalhou sua importância funcional (GEORGE et al., 2005). Nosso grupo também avaliou a expressão da ANXA1 em macacos frente à infecção pelo SIV e observou que a sinalização da AnxA1 é disfuncional na infecção por SIV e pode contribuir para a inflamação crônica na periferia e disfunção imune na mucosa intestinal (SENA et al., 2016). Sendo assim, frente aos interessantes relatos da participação da AnxA1 na modulação da inflamação em diversos processos patológicos, é de suma importância uma avaliação mais apurada de sua expressão e função durante a infecção pelo HIV-1. Acredita-se que esta proteína possa ter um papel significativo na patogênese do HIV-1, principalmente no que diz respeito ao paradoxo da resposta imune neste contexto infeccioso.

2. JUSTIFICATIVA

Embora o advento da HAART, a AIDS continua apresentando um forte impacto na saúde, merecendo atenção de toda a comunidade científica. Sendo assim, nossa investigação baseou-se especialmente no importante paradoxo da infecção pelo HIV-1, já descrito anteriormente, o qual determina a progressão da doença. Além disso, frente aos papéis já descritos da via de sinalização dos FPRs e as importantes funções da AnxA1, consideramos que seja de suma importância avaliar quais os efeitos da infecção pelo HIV-1 sobre o eixo de sinalização FPRs/AnxA1, e quais os impactos sobre a progressão da doença.

Portanto, acreditamos que o eixo de sinalização FPRs/AnxA1 possa se eleger como potencial candidato a participar dos mecanismos de modulação da ativação imune sistêmica e inflamação que persistem na infecção pelo HIV-1. Assim, o estudo dessas moléculas pode abrir caminhos promissores para o potencial uso terapêutico das mesmas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da infecção pelo HIV-1 sobre o eixo de sinalização FPRs/Anexina A1 e quais os impactos sobre a progressão da doença.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil transcricional de ANXA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 em leucócitos de sangue periférico de indivíduos HIV-1 positivos com carga viral detectável, não detectável e controles HIV-1 negativos.
- Caracterizar a expressão proteica de FPR1, FPR2/ALX, FPR3 e AnxA1 em linfócitos, monócitos, células dendríticas e granulócitos de sangue periférico de indivíduos HIV-1 positivos com carga viral detectável, não detectável e controles HIV-1 negativos.
- Quantificar os níveis da proteína AnxA1 em amostras de plasma de indivíduos HIV-1 positivos com carga viral detectável, não detectável e controles HIV-1 negativos.
- Avaliar o perfil de citocinas produzidos por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos HIV-1 positivos com carga viral detectável, não detectável e controles HIV-1 negativos, estimulados com peptídeo funcional da AnxA1 (Ac 2-26) e bloqueadores de FPRs (BOC2, WRW4).
- Correlacionar os resultados laboratoriais obtidos com dados clínicos presentes nos prontuários (contagem de CD4, relação CD4/CD8, carga viral, doenças oportunistas).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção de amostras biológicas

Amostras de sangue periférico foram obtidas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFU (CEP N. 198,897) (Anexo A) e um consentimento informado (Apêndice B) foi obtido de todos os participantes. As amostras de sangue periférico foram obtidas a partir de 56 pacientes HIV-1-positivos com carga viral não detectável (CVND), 23 pacientes HIV-1-positivos com carga viral detectável (CVD) e 32 doadores de sangue saudáveis (controle). Deste total amostral coletado, utilizou-se aleatoriamente amostras de alguns pacientes e controles para executar a citometria de fluxo, o estímulo em cultura e a quantificação de AnxA1 no plasma, tal como descrito abaixo.

Para integrar o grupo controle, foram incluídos doadores de sangue de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que apresentavam resultados negativos para o HIV-1, sífilis, vírus T-linfotrópicos humano (HTLV), hepatites B/C e doença de Chagas. Foram excluídos do grupo doadores em uso de corticosteroides, ou que apresentavam qualquer tipo de câncer ou doenças autoimunes. O grupo CVD incluiu pacientes infectados pelo HIV-1 com carga viral detectável, que nunca realizaram a HAART ou que estavam sem tratamento (por abandono ou dificuldades na adaptação aos efeitos colaterais) a pelo menos 2 anos e que não estavam sob o uso de corticosteroide. O grupo CVND consistiu de pacientes infectados pelo HIV-1 em HAART regular por pelo menos seis meses, com carga viral não detectável e sem uso de corticosteroide. Foram excluídos dos grupos HIV-1 positivos indivíduos que haviam realizado transfusão de sangue recente e que apresentavam outras doenças não relacionadas ao HIV-1. As mulheres grávidas foram excluídas de todos os grupos.

Para a realização dos experimentos coletou-se 18 mL de sangue periférico utilizando tubos *BD Vacutainer*® contendo os anticoagulantes heparina ou EDTA de todos os indivíduos integrantes dos grupos acima citados.

As informações presentes nos prontuários e os exames laboratoriais também foram analisados para posterior correlação com os resultados experimentais. A descrição das características principais dos indivíduos HIV-1 positivos encontram-se na tabela 2 e 3.

4.2 Determinação do perfil transcricional de ANXA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3

Amostras de sangue total foram coletadas de 56 pacientes HIV-1 positivos do grupo CVND, 21 pacientes HIV-1 positivos do grupo CVD e 31 doadores saudáveis do grupo controle. O RNA total foi extraído utilizando o método *Trizol LS Reagent* (Life Technologies, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro de alta sensibilidade Nanodrop ND-1000 3.5.2 (*NanoDrop Technologies*) a 260nm e 280nm. Analisou-se a qualidade do RNA por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL, submetido à voltagem de 100 volts por aproximadamente 50 minutos em tampão TBE (Tris-borato 45 mM, pH 8,3 e EDTA 1 mM). Após a resolução do gel, o perfil eletroforético foi visualizado em luz UV e documentado no sistema *Digimage System* (*Major Science*). O DNA complementar (cDNA) foi gerado por transcrição reversa (MMLV, Life Technologies, EUA), utilizando 0,5 µg de RNA, de acordo com o protocolo do fabricante. RT-qPCR foi realizada em um ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, EUA) utilizando TaqMan PCR Master Mix Universal para quantificar os níveis de RNAm de ANXA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3. O volume da reação foi de 12 µl, incluindo 6 µl de Master Mix (Applied Biosystems, EUA), 5 µl de cDNA molde, 0,2 µl de sonda e 0,8 µl de água. Foram utilizadas as seguintes sondas: ANXA1: Hs00167549_m1, FPR1: Hs04235426_s1, FPR2/ALX: Hs02759175_s1, FPR3: Hs01574392_m1, e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase GAPDH: Hs03929097_g1 (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado como o controle endógeno. As condições de amplificação foram de 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15s e 60°C durante 1 min. Todas as reações foram realizadas em duplicata. A expressão dos transcritos dos genes alvo foi normalizada com o endógeno GAPDH, e a quantificação relativa realizada usando o método 2- $\Delta\Delta C_t$, usando o grupo de controle como calibrador.

4.3 ELISA *in-house* para detecção Anexina A1 humana

Os níveis da proteína AnxA1 foram determinados em amostras de plasma de 9 pacientes do grupo CVND, 8 pacientes do grupo CVD e 16 doadores do grupo controle, utilizando o ensaio ELISA quantitativo *in-house*. Resumidamente, o anticorpo de captura (anticorpo policlonal de coelho anti-Anexina A1, Nuvem-Clone Corp., Houston, TX, EUA) foi diluído para uma concentração final de 10 µg/mL em tampão de bicarbonato, pH 9,6 e incubado *overnight* a 4 °C. O bloqueio foi realizado utilizando uma solução de tampão fosfato salino

(PBS) a 2% de BSA durante 1 h a 37 °C. A proteína recombinante humana AnxA1 (Nuvem-Clone Corp) foi utilizada para produzir uma curva padrão entre 0 e 3200 pg/mL. Amostras de plasma e padrões foram analisadas em duplicata em placas de ELISA de 96 poços, e foram incubadas overnight a 4 °C. Anticorpo policlonal anti-AnxA1 conjugado à biotina (Nuvem-Clone Corp) foi utilizado para detecção (concentração final 2ug/mL em PBS/Tween-20, pH 7,4) com incubação durante 1 h a 37°C. Em seguida incubou-se a estreptavidina conjugada com peroxidase (HRP 1: 500, GE Healthcare) durante 30 min. Por fim, a reação foi incubada com o substrato TMB (BD Bioscience) durante 15 min à temperatura ambiente, e as amostras foram quantificadas em um leitor de placas (Thermo Placa) no comprimento de onda de 450 nm.

4.4 Citometria de Fluxo para detecção de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 em leucócitos de sangue periférico

Para realização do ensaio de Citometria de Fluxo realizou-se inicialmente a lise de hemácias presentes em alíquotas de 100ul de sangue total de 9 pacientes do grupo CVND, 8 pacientes do grupo CVD e 7 controles saudáveis, utilizando a solução *BD Pharm Lyse* (*BD Biosciences*, EUA) de acordo com protocolo do fabricante.

Para os ensaios diretos, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais (mAbs) identificadores de superfície celular específicos para leucócitos humanos: linfócitos [anti-CD3 (AF647), anti-CD4 (PE), anti-CD8 (PE/CY7)], monócitos (anti-CD14 (PE ou PE/CY7), anti-CD16 (AF647)] e granulócitos [anti-CD66b (PerCP/Cy5.5)]. Para a identificação de células dendríticas circulantes totais [células dendríticas mielóides (CD11c⁺ CD123^{low}) e células dendríticas linfóides (CD11c⁻CD123^{hi})] foi utilizado o ensaio de 3 cores com base em descrições da *BD Bioscience*. Para isso, utilizou-se os seguintes marcadores: células dendríticas [coquetel anti-Lin1 FITC (contendo anti-CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 e CD56)], anti-HLA (PE/CY7), anti-CD11c e anti-CD123 (AF647) (*BioLegend*, San Diego, CA, EUA).

Além da marcação de superfície para a identificação dos tipos celulares, realizou-se a marcação de FPR1 (anti-FPR1 FITC), FPR2/ALX (anti-FPR2/ALX PE), FPR3 (anti-FPR3 PE) e AnxA1 (anti-AnxA1 FITC) na superfície destas mesmas células. Para a identificação da AnxA1 utilizou-se o ensaio indireto onde as células foram marcadas nas mesmas condições com o anticorpo primário anti-AnxA1 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e anticorpo

secundário conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Para a identificação intracelular da AnxA1, as células foram permeabilizadas após marcação extracelular utilizando 200ul de BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, EUA) durante 20 min, e realizado a marcação indireta como anteriormente descrito.

As células também foram marcadas com anticorpos *Isotype Control* adequados. Para cada tubo, 60.000 eventos correspondentes aos leucócitos viáveis foram adquiridos no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). As análises das subpopulações celulares foram realizadas de acordo com a estratégia de *gating* distintas (Apêndice A) usando o software FlowJo 7.6.5 (TreeStar Inc, Ashland, OR, EUA). Os dados foram apresentados como percentagem do valor absoluto de subpopulações de células e mediana da intensidade de fluorescência de marcadores específicos. A mediana da intensidade de fluorescência (MIF) determina a densidade de receptores e/ou a concentração da proteína encontradas nas células avaliadas.

4.5 Cultura e estímulos de células mononucleares de sangue periférico

Amostras de sangue total foram coletadas com anticoagulante heparina para realizar a separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 9 pacientes do grupo CVND, 8 pacientes do grupo CVD e 7 controles saudáveis. A separação de PBMC foi realizada utilizando a solução *Ficoll-Paque PREMIUM* (GE Healthcare, Milwaukee, WI, EUA), de acordo com as descrições do fabricante. Após a separação, foram plaqueadas 1×10^5 células em meio de cultura RPMI1640 (Cell) contendo 0,1% de antibiótico gentamicina em duplicata em placas de 24 poços e incubadas a 37°C, a 5% de CO₂ durante 2 horas, para estabilização da cultura e produção natural de seu perfil de citocinas. As células foram estimuladas com as seguintes moléculas: o peptídeo funcional N-terminal da AnxA1, Ac2-26 (A, 20μM, como padronizado em ensaio piloto), na presença ou ausência de incubação prévia durante 30 min com os seguintes antagonistas de FPRs: BOC2 (B, 10 μM, bloqueador de FPR1 e FPR2/ALX) e WRW4 (W, 10 μM, bloqueador de FPR2/ALX e FPR3). A incubação com Ac2-26 foi mantida durante 3,5 h, e o sobrenadante da cultura foi coletado para a quantificação e determinação do perfil de citocinas. Como controle negativo, utilizou-se células incubadas somente em meio de cultura RPMI1640 contendo 0,1% de antibiótico gentamicina.

4.6 Cytometry Bead Array (CBA) para detecção de citocinas em culturas de PBMCs

Para avaliar a possível ação anti-inflamatória da AnxA1 frente ao contexto da infecção pelo HIV-1, por meio do kit *BD™ CBA Human Inflammatory Cytokines*, quantificou-se em pg/mL os níveis das seguintes citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura de PBMCs: interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-12p70 (IL-12p70). Resumidamente, incubaram-se amostras e citocinas recombinantes humanas (curva padrão) durante 3 horas à temperatura ambiente com uma suspensão de esferas de captura e o reagente de detecção conjugado à ficoeritrina (PE). Após a incubação, a mistura foi lavada e as amostras adquiridas no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences, EUA). A obtenção dos níveis de citocinas presentes nos sobrenadantes foi realizada utilizando o software FCAP (BD Biosciences, EUA).

4.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Inicialmente o teste de normalidade dos dados (Kolmogorov-Smirnov) foi realizado e em seguida foram aplicados testes paramétricos para variáveis com distribuição normal e testes não paramétricos para variáveis sem distribuição normal. Os testes utilizados foram ONE-Way ANOVA, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Fisher, teste t não-pareado e para significância o intervalo de confiança (CI) de 0,95 e $p < 0,05$ foram considerados. Além disso, as correlações entre os dados clínicos obtidos a partir da análise dos prontuários médicos (carga viral, contagem de CD4 e histórico de doenças oportunistas) e dados laboratoriais foram determinadas. Para dados paramétricos e não paramétricos foram utilizadas as correlações de Spearman e Pearson, respectivamente, e os resultados foram descritos como coeficientes de correlação e valores de p .

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização dos pacientes infectados pelo HIV-1

As principais características clínicas e laboratoriais dos pacientes infectados pelo HIV-1, com base em dados obtidos de prontuários médicos, estão resumidas nas tabelas 2 e 3. A tabela 2 descreve a idade dos pacientes e o tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV-1. O grupo CVND apresentou tempo de diagnóstico significativamente maior comparado ao grupo CVD. Em relação à duração do tratamento, todos os pacientes do grupo CVND encontravam-se sob uso regular de HAART. Além disso, a média de duração do tratamento desses pacientes foi de aproximadamente seis anos, um período relevante para avaliar o desempenho da HAART. Com relação aos níveis de carga viral detectados no grupo CVD, todos os pacientes apresentaram carga viral ativa, com grande variabilidade entre os pacientes (média = 292.500 ± 641.600 desvio padrão). Na avaliação da contagem de células CD4+ o grupo CVND apresentou níveis significativamente mais elevados comparados ao grupo CVD. Nenhuma diferença foi observada na contagem de células CD8+, embora o grupo CVND tenha apresentado maiores níveis da relação CD4 / CD8 quando comparado ao grupo CVD.

Tabela 2. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes infectados pelo HIV-1 com carga viral detectável (CVD) e não detectável (CVND).

Características dos Pacientes	CVND n = 56		N	CVD n = 23		Valor de p
	n	Média ± DP (Min-Max)		Média ± DP (Min-Max)		
Idade (anos)	56	42.12 ± 6.35 (26 – 58)	23	35.39 ± 11.68 (17 – 57)	0.002**	
Tempo de diagnostic (anos)	56	8.48 ± 5.90 (0.25 – 21)	21	4.39 ± 5.91 (0 – 17)	0.002**	
Tempo de HAART regular (anos)	54	6.52 ± 4.73 (0.33 – 17)	23	-	-	
Carga Viral (cópias/mL)	56	-	23	292500 ± 641600 (40 – 2407000)	-	
Leucócitos (células/mm ³)	38	5943 ± 1184 (4200 – 8600)	21	4710 ± 1503 (2000 – 7400)	0.001**	
CD4 (células/μl)	56	630.7 ± 264.3 (73.49 – 1283)	23	322.3 ± 247.3 (2 – 848)	<0.0001***	
CD8 (células/μl)	56	1017 ± 381.8 (322 – 2156)	23	1398 ± 1012 (65 – 3363)	0.262	
CD4/CD8	56	0.72 ± 0.41 (0.08 – 1.74)	23	0.27 ± 0.21 (0.03 – 0.81)	<0.0001***	

DP = Desvio Padrão; HAART = terapia antirretroviral altamente ativa; CD4 = linfócitos T CD4+; CD8 = linfócitos T CD8+; CD4/CD8 = razão entre linfócitos T CD4 + e linfócitos T CD8 +. * P <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001

A tabela 3 apresenta o histórico de doenças oportunistas nos grupos infectados pelo HIV-1 e a classificação dos níveis de CD4. O grupo CVD (78,3%) apresentou percentual significativamente maior de acometimentos por doenças oportunistas entre seus membros quando comparado ao grupo CVND (41,1%). Entre as doenças oportunistas em curso, o grupo CVD (43,5%) apresentou maior incidência comparada ao grupo CVND (8,9%) e a tuberculose, sífilis, citomegalovírus e herpes foram as doenças mais comuns encontradas entre os pacientes. Quanto à contagem de células CD4+, o grupo CVD apresentou maior percentual de pacientes com CD4 <200 (30,4%, p <0,001), enquanto que o grupo CVND apresentou CD4 > 500 em 73,2% dos pacientes (p <0,0001). É importante notar que todos os pacientes do grupo CVND estavam sob regime regular de HAART.

Tabela 3. Histórico de doenças oportunistas e contagem de CD4 de pacientes HIV-1 positivos com carga viral detectável (CVD) e não detectável (CVND).

VARIÁVEIS	CVND n = 56		CVD n = 23		Valor de p
	N	%	n	%	
Histórico de Doenças Oportunistas	23	41.1	18	78,3	<0.005**
Doenças Oportunistas em Curso	5	8.9	10	43.5	<0.0001***
Toxoplasmose	1	1.8	2	8.7	0.2016
Criptococcose	0	0	0	0	-
Pneumocistose	1	1.8	0	0	1.0000
Citomegalovírus	0	0	2	8.7	0.0821
Herpes	3	5.3	3	13.0	0.3496
Sífilis	0	0	1	4.3	0.2911
Tuberculose	0	0	2	8.7	0.0821
Doenças Oportunistas Tratadas	18	32.1	8	34.8	1.0000
Toxoplasmose	9	16.1	1	4.3	0.2659
Criptococcose	2	3.6	0	0	1.0000
Pneumocistose	4	7.1	1	4.3	1.0000
Citomegalovírus	1	1.8	2	8.7	0.2016
Herpes	1	1.8	3	13.0	0.0719
Sífilis	2	3.6	4	17.4	0.0562
Tuberculose	6	10.7	1	4.3	0.6666
CD4<200	1	1.8	7	30.4	<0.0001***
CD4 200-499	14	25	10	43.8	0.1857
CD4>500	41	73.2	6	26.1	<0.0001***

CD4 = Linfócitos T CD4+. Teste exato de Fisher. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

5.2. Determinação do perfil transcricional de ANXA1, FPR1, FPR2/ALX, FPR3

As análises da expressão transcricional de ANXA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 não revelaram diferenças significativas para os genes ANXA1 e FPR1 entre os grupos infectados e controle, embora o grupo CVD tenha uma ligeira diminuição da expressão de FPR1 quando comparado aos demais grupos (Figuras 4a e 4b). Em relação ao gene FPR2/ALX, o grupo CVND apresentou níveis de RNAm duas vezes mais baixos do que o observado no grupo controle (p <0,001), enquanto que o grupo CVD apresentou nível uma vez mais baixo comparado ao controle (Figura 4c). Para o gene FPR3, o grupo CVND apresentou níveis

cinco vezes mais elevados ($p < 0,001$) e o grupo CVD níveis quatro vezes mais elevados ($p < 0,01$) em relação ao controle (Figura 4d).

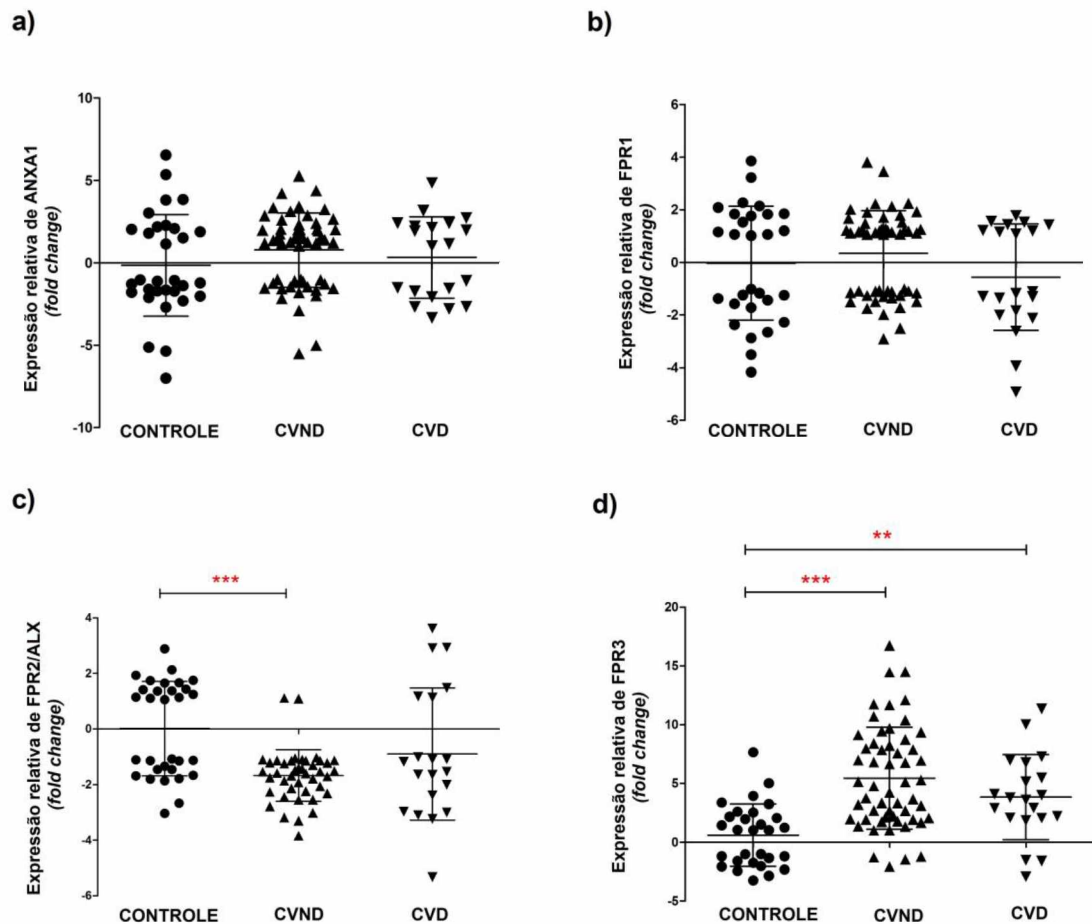


Figura 4: Expressão relativa de RNAm de ANXA1 e FPRs em sangue total. Expressão relativa de RNAm de ANXA1 (a), FPR1 (b), FPR2/ALX (c) e FPR3 (d) dos grupos HIV+ CVND (carga viral não detectável), HIV+ CVD (carga viral detectável) e controle. Os níveis de transcrição foram normalizados com o gene GAPDH e calibrados com o grupo controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.3 ELISA *in-house* para detecção Anexina A1 humana

A quantificação dos níveis plasmáticos de AnxA1 detectados pelo método de ELISA *in-house*, demonstraram que a presença do vírus ativo encontrado no grupo CVD foi significativamente associada aos níveis plasmáticos de AnxA1 quando comparados aos grupos CVND e controle ($p < 0,01$) (Figura 5).

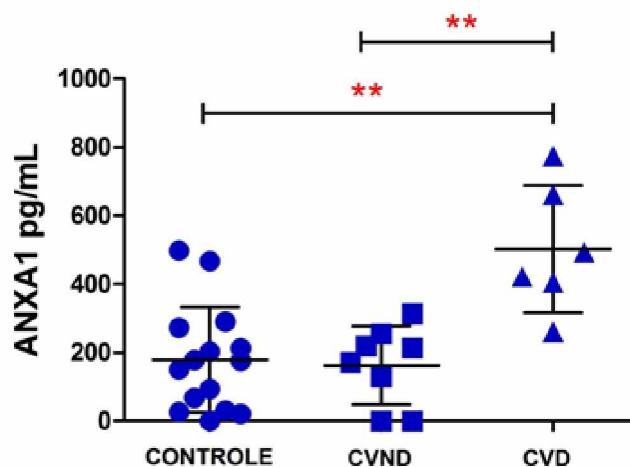


Figura 5: Níveis de AnxA1 detectados no plasma. Níveis de AnxA1 detectados em pg/mL no plasma dos grupos HIV+ CVND (carga viral não detectável), HIV+ CVD (carga viral detectável) e controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.4 Análise de correlação entre expressão transcricional de FPR3, ANXA1, níveis plasmáticos de AnxA1, contagens de CD4, carga viral e histórico de doenças oportunistas

Observou-se correlação negativa significativa entre carga viral e contagem de CD4 ($n = 23$, grupo CVD, $r = -0,5174$), assim como entre contagem de CD4 e presença de doenças oportunistas [$n = 79$ (CVD grupo $n = 23$, CVND Grupo $n = 56$), $r = -0,3361$]. Curiosamente, encontrou-se ainda uma correlação positiva entre a carga viral e os níveis plasmáticos de AnxA1 [$n = 17$ (grupo CVD $n = 8$, grupo CVND $n = 9$), $r = 0,7823$], enquanto uma correlação inversa entre contagem de CD4 e níveis plasmáticos de AnxA1 [$n = 17$ (grupo CVD $n = 8$, grupo CVND $n = 9$), $r = -0,7273$]. Correlações positivas entre os níveis transcricionais de FPR3 e ANXA1 [$n = 77$ (grupo CVD $n = 21$, grupo CVND $n = 56$), $r = 0,5068$], e com a presença de doenças oportunistas [$n = 77$ (grupo CVD $n = 21$, grupo CVND $n = 56$); $r = 0,20$] também foram detectadas (Tabela 4).

Tabela 4. Coeficientes de correlação de Spearman, Pearson e seus valores de p entre os dados laboratoriais: carga viral (CV), linfócitos T CD4 +, doenças oportunistas (DO), expressão transcricional de ANXA1, FPR3 e níveis plasmáticos de AnxA1.

	CD4	Níveis de AnxA1 no plasma	FPR3 (qPCR)
CV	-0.51*	0.78**	-
CD4	-	-0.72**	-
DO	-0.33**	-	0.20*
ANXA1 (qPCR)	-	-	0.50***

* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001

5.5 Análise de Citometria de Fluxo para detecção de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 em leucócitos de sangue periférico

Avaliando a presença de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 em linfócitos T CD4+ observamos que os grupos CVND e CVD demonstram tendência de aumento do percentual de células T CD4+/AnxA1+, bem como um aumento na concentração desta AnxA1 associado à superfície celular, com resultado significativo para o grupo CVD comparado ao grupo controle p <0,01 (Figuras 6a, 6b).

Para a concentração de AnxA1 intracelular presente em linfócitos T CD4+, o grupo CVND apresentou níveis significativamente maiores que o grupo CVD (p <0,05). Por outro lado, o grupo CVD exibiu tendência de diminuição da AnxA1 intracelular (Fig. 6c). Observou-se também que os grupos infectados pelo HIV-1 apresentaram percentual aumentado de células T CD4+/FPR1+ e células T CD4+/FPR2/ALX+. Entretanto, o grupo CVND apresentou o percentual mais significativo em relação ao controle (p <0,01 e p <0,05, respectivamente) (Figuras 6d, 6f). Ao mesmo tempo, a densidade de FPR1 na superfície das células T CD4+ tiveram níveis significativamente mais elevados no grupo CVD em comparação ao controle (p <0,05) (Figura 6e).

Por outro lado, não foram observadas diferenças no percentual de células T CD8+/AnxA1+ (Fig. 6h). A concentração de AnxA1 foi significativamente maior no grupo CVD em relação ao controle (p <0,01) (Fig. 6i). Entretanto, os níveis de AnxA1 intracelular nessas células foram maiores no grupo CVND quando comparados aos grupos controle e CVD (p <0,05) (Figura 6j). Somente o grupo CVD apresentou maior percentual de células T CD8+/FPR1+ (Fig. 6k), mas a densidade de FPR1 nestas células foi significativamente maior no grupo CVND quando comparado aos grupos controle e CVD (p <0,05) (Figura 6l). Ambos

os grupos CVND e CVD tenderam a apresentar um percentual aumentado de células T CD8+/FPR2/ALX+ (Fig. 6m), porém suas densidades nestas células não diferiram (Fig. 6n).

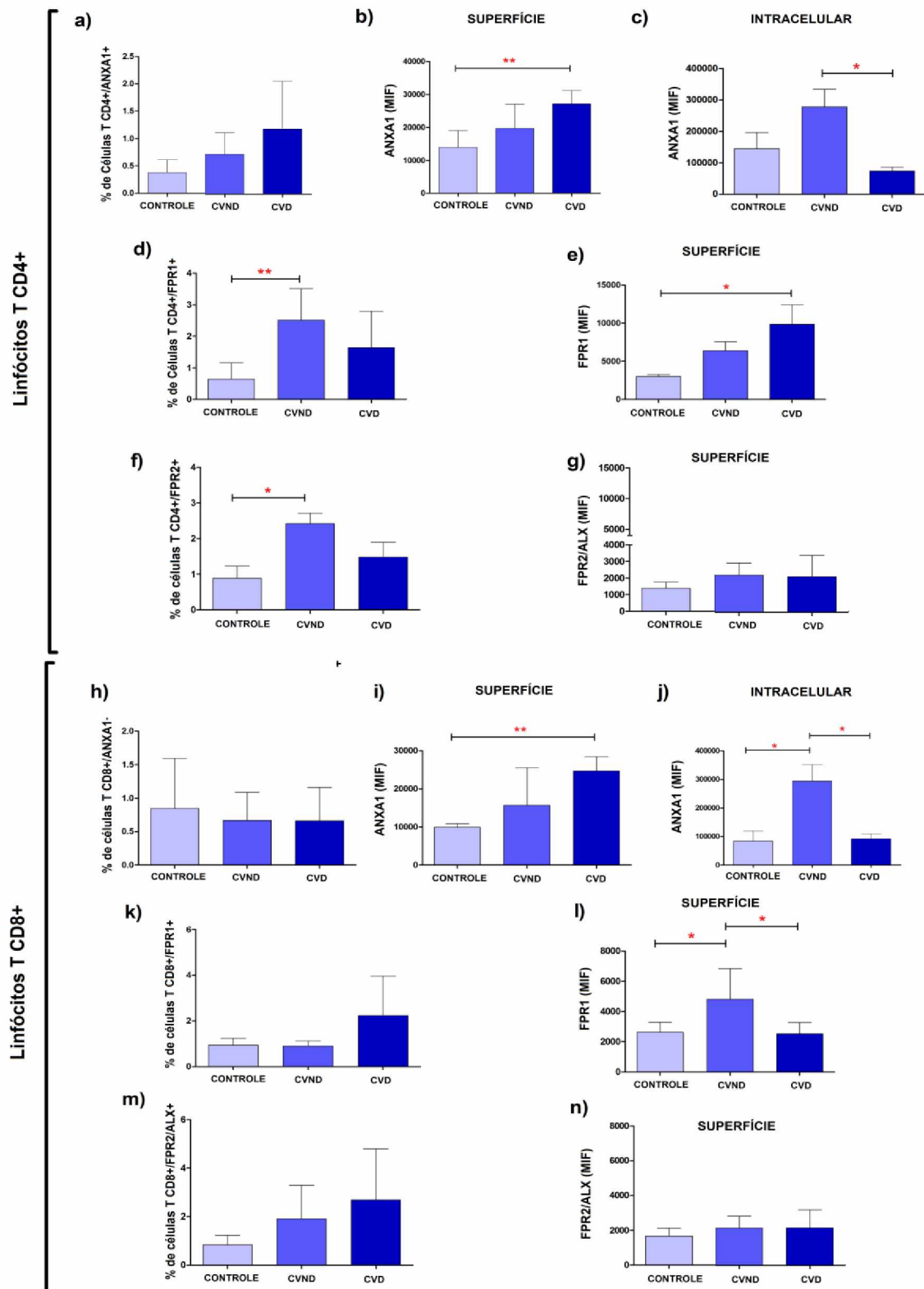


Figura 6: Citometria de fluxo exibindo o percentual e/ou a mediana da intensidade de fluorescência de células T CD4+ e CD8+ expressando AnxA1 e FPRs. Citometria de fluxo de leucócitos de sangue periférico de doadores saudáveis (controle), pacientes HIV-1 positivos com carga viral não detectável (CVND) e detectável (CVD). Percentual (%) de células T CD4+ expressando AnxA1 (a), FPR1 (d) e FPR2 / ALX (f) na superfície. Mediana da intensidade de fluorescência (MIF) de AnxA1 (b), FPR1 (e), FPR2/ALX (g) na superfície e

AnxA1 intracelular (c). Percentual de células T CD8⁺ expressando AnxA1 (h), FPR1 (k) e FPR2/ALX (m) na superfície. Mediana da intensidade de fluorescência (MIF) de AnxA1 (i), FPR1 (l) e FPR2/ALX (n) na superfície e AnxA1 intracelular (j). Os dados estão expressos como médias \pm DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Para descrever o perfil das diferentes subpopulações de monócitos na presença deste contexto infeccioso induzido pelo HIV-1, foram utilizados anticorpos anti-CD14 e anti-CD16 para análise de citometria de fluxo. Ambos os grupos CVND e CVD apresentaram uma tendência de maior percentual de monócitos com perfil intermediário (CD14⁺⁺/CD16⁺), conforme observado na figura 7a.

Considerando que a população de monócitos intermediários foi mais frequente entre os grupos infectados pelo HIV-1, avaliou-se a expressão de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 nesta população celular. O percentual de monócitos CD14⁺⁺/CD16⁺/AnxA1⁺ apresentou tendência a diminuição no grupo CVND (Figura 7b), enquanto a concentração da AnxA1 ligada à superfície celular aumentou nos grupos CVND e CVD (Figura 7c), que foram significativamente diferente comparados ao controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Os níveis de AnxA1 intracelular foram significativamente maiores no grupo CVND quando comparado ao controle ($p < 0,05$) (Figura 7d). Não houve diferença significativa no percentual de monócitos CD14⁺⁺/CD16⁺ expressando FPR1 e FPR2/ALX, assim como na densidade destes receptores entre os grupos (Figuras 7e, 7f, 7g, 7h). Contudo, o percentual de monócitos CD14⁺⁺/CD16⁺/FPR3⁺ foi significativamente maior no grupo CVD em comparação aos grupos CVND e controle ($p < 0,001$) (Figura 7i). Um ligeiro aumento nos níveis de FPR3 nestas células foi também observado no grupo CVND (Figura 7j).

A expressão de FPR3 também foi investigada em células dendríticas circulantes totais. O grupo CVD apresentou um aumento significativo no percentual de células dendríticas que expressam FPR3 (Figura 7k), enquanto que ambos os grupos CVND e CVD apresentaram alta densidade deste receptor na superfície celular ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 7l).

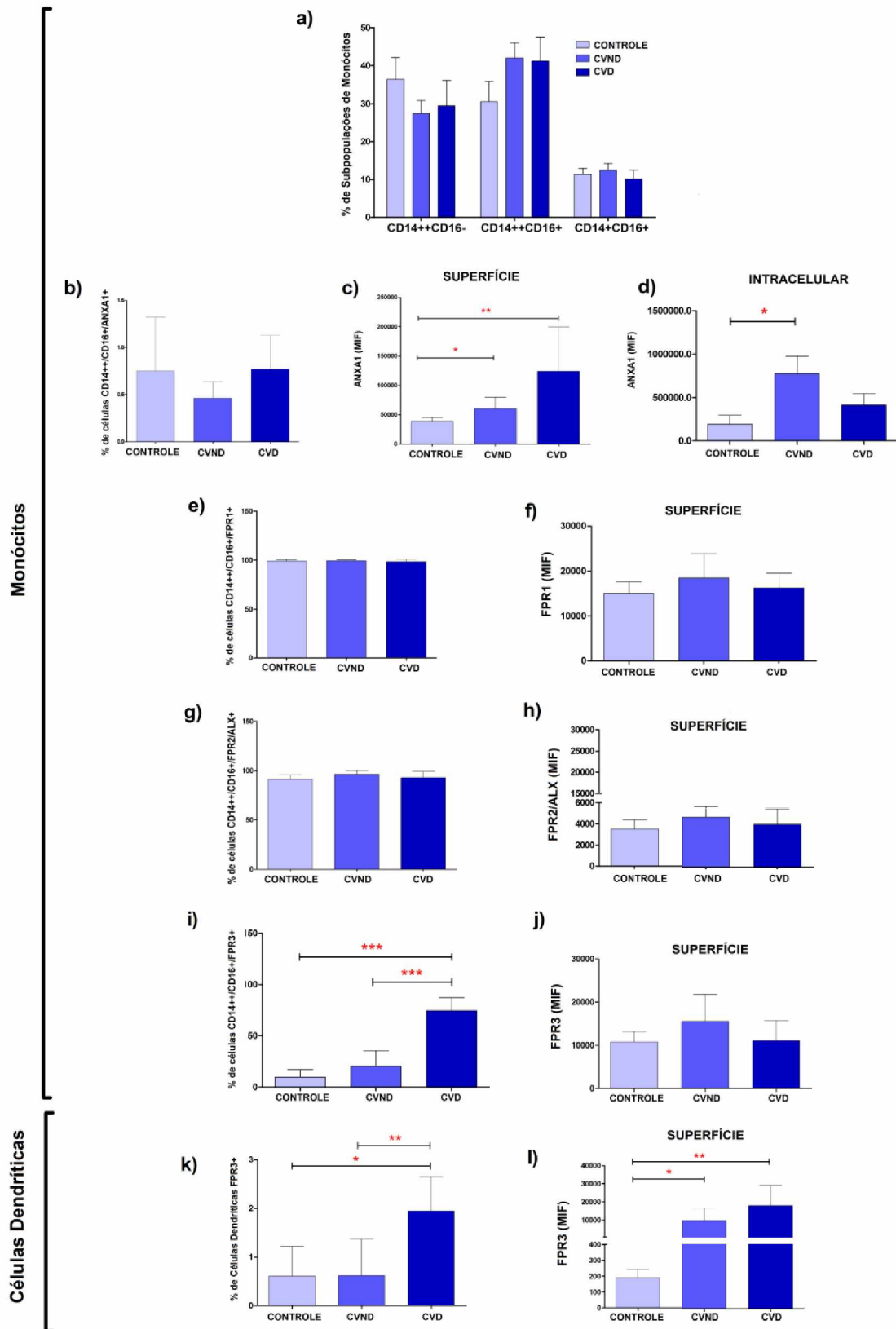


Figura 7: Análises de citometria de fluxo de subpopulações de monócitos e de células dendríticas. Análises de citometria de fluxo determinando a expressão de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 em monócitos e FPR3 em células dendríticas de doadores saudáveis

(controle), pacientes HIV-1 positivos com carga viral não detectável (CVND) e HIV-1 positivos com carga viral detectável (CVD). Avaliação das subpopulações de monócitos: clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) (a). O percentual de monócitos CD14⁺⁺CD16⁺ expressando AnxA1 (b), FPR1 (g), FPR2/ALX (e) e FPR3 (i) na superfície. Mediana da intensidade de fluorescência (MIF) de AnxA1 (c), FPR1 (f), FPR2/ALX (h) e FPR3 (j) na superfície e ANXA1 intracelular (d). O percentual de células dendríticas expressando FPR3 (k) na superfície e mediana da intensidade de fluorescência (MFI) de FPR3 (l) na superfície. Os dados foram expressos como médias \pm DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

A expressão de FPRs e AnxA1 também foi avaliada em granulócitos CD66b⁺. Não houve diferença estatisticamente significativa no percentual de granulócitos CD66⁺/AnxA1⁺ entre os grupos (Figura 8a), porém o grupo CVD apresentou aumento significativo na concentração de AnxA1 ligado à superfície celular em comparação aos outros grupos ($p < 0,05$) (Figura 8b). Os níveis de AnxA1 intracelular foram maiores no grupo CVND comparado aos grupos CVD e controle (Figura 8c). Em relação à expressão de FPR1, o grupo CVD apresentou percentual significativamente menor em relação aos grupos CVND e controle ($p < 0,001$) (Figura 8d), no entanto, não houve diferença na densidade desse receptor entre os grupos (Figura 8e). Na avaliação da expressão de FPR2/ALX em granulócitos CD66⁺, ambos os grupos HIV-1⁺ apresentaram diminuição significativa no seu percentual ($p < 0,05$) (Figura 8f), porém o grupo CVD demonstrou aumento significativo na densidade de FPR2/ALX nestas células quando comparado ao controle ($p < 0,05$) (Figura 8g).

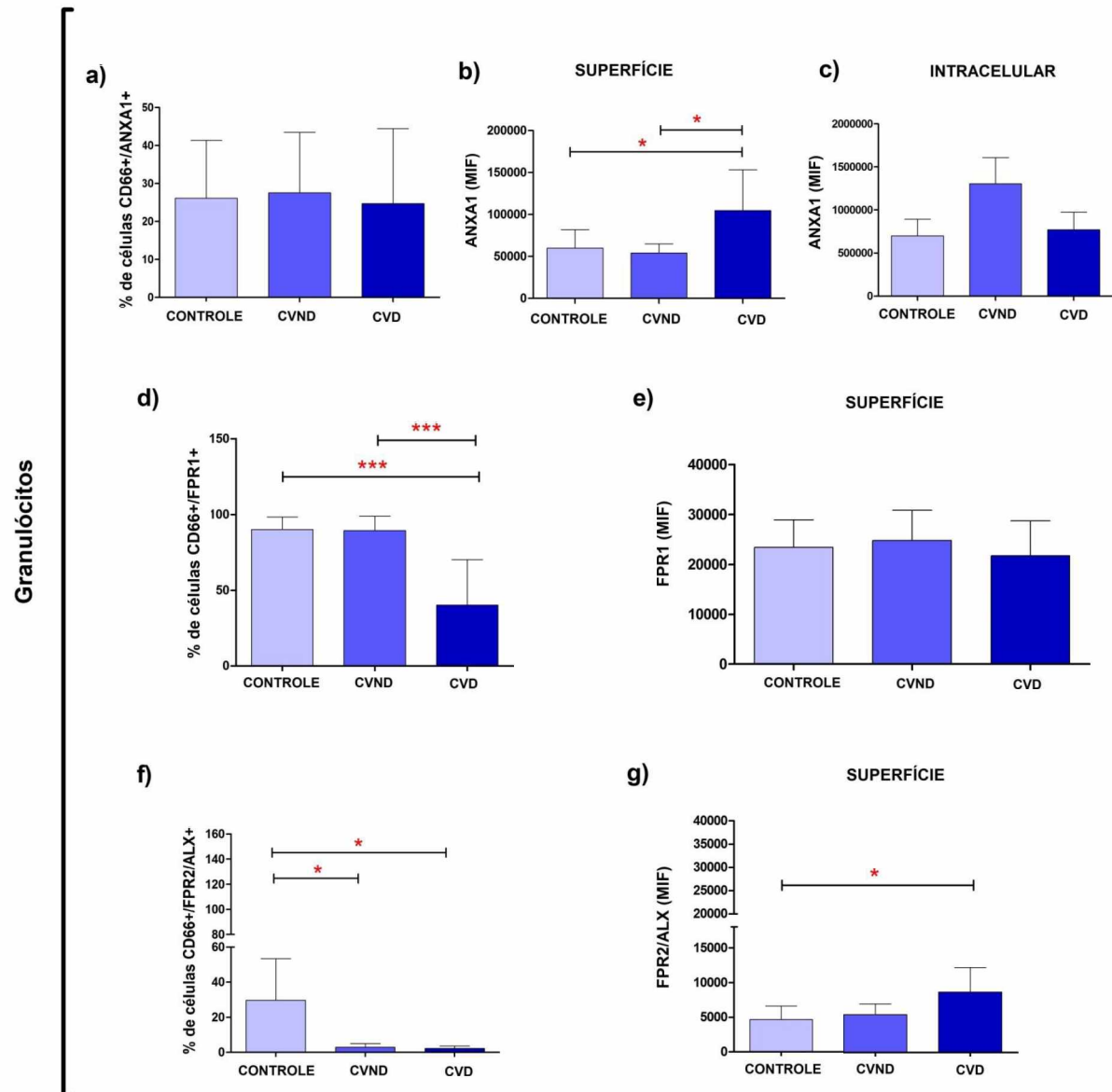


Figura 8: Análise de Citometria de Fluxo exibindo o percentual e/ou mediana da intensidade de fluorescência de granulócitos expressando AnxA1 e FPRs. Citometria de fluxo de leucócitos de sangue total de doadores saudáveis (Controle), pacientes HIV-1 positivos com carga viral não detectável (CVND) e HIV-1 positivos com carga viral detectável (CVD). Percentual de granulócitos CD66b+ expressando AnxA1 (a), FPR1 (d) e FPR2/ALX (f) na superfície. Mediana da intensidade de fluorescência (MIF) de AnxA1 (b), FPR1 (e) e FPR2/ALX (g) na superfície e AnxA1 intracelular (c). Os dados foram expressos como médias \pm DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.6 Cultura e estímulos de células mononucleares de sangue periférico

Para avaliar o papel funcional da sinalização externa da AnxA1 em PBMC de indivíduos dos grupos CVND, CVD e controle, estímulos foram realizados utilizando o peptídeo funcional da AnxA1, o Ac2-26, e os antagonistas de FPRs, BOC-2 e WRW4. Houve aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, sobretudo IL-8, IL-6 e TNF- α , após o estímulo com Ac2-26 em todos os grupos (figuras 9a, 9b, e 9c). Os níveis basais de produção de IL-8 foram significativamente maiores nos grupos CVND e CVD quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) e sua liberação foi significativamente exacerbada após o estímulo com Ac2-26 em todos os grupos, especialmente nos grupos CVND e CVD em comparação ao controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) (figura 9a). Após o bloqueio preferencial de FPR2/ALX e bloqueio parcial de FPR1 por meio do estímulo com BOC-2, observou-se diminuição significativa na produção de IL-8 quando comparado ao estímulo com Ac2-26 ($p < 0,01$). O bloqueio de FPR2/ALX e FPR3 por WRW4 levou a um ligeiro aumento desta citocina em relação ao estímulo com Ac2-26. Contudo, este aumento na produção de IL-8 pelo antagonista WRW4 foi significativamente mais elevado nos grupos CVND e CVD em comparação ao controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 9a).

A produção de IL-6 também foi detectada em condições basais entre os grupos, mas níveis mais elevados foram observados em grupos HIV-1 positivos, especialmente no grupo CVD. Além disso, após os estímulos Ac2-26, os níveis de IL-6 foram fortemente aumentados em todos os grupos e significativamente diferentes entre os grupos infectados pelo HIV-1 e entre os grupos CVD e controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Após o bloqueio por BOC-2 ou WRW4, a produção de IL-6 foi ligeiramente diminuída em todos os grupos, mas com uma redução significativa no CVND em comparação com o grupo CVD sob bloqueio WRW4 ($p < 0,05$) (Figura 9b). Da mesma forma, a produção de TNF- α também aumentou após os estímulos Ac2-26, com diferenças significativas entre os controles ($p < 0,05$) e entre CVD versus controle ($p < 0,05$), seguido de uma pequena diminuição após o bloqueio com BOC-2 ou WRW4. A ação de BOC-2 demonstrou-se ligeiramente mais eficaz do que WRW4 (Fig. 9c).

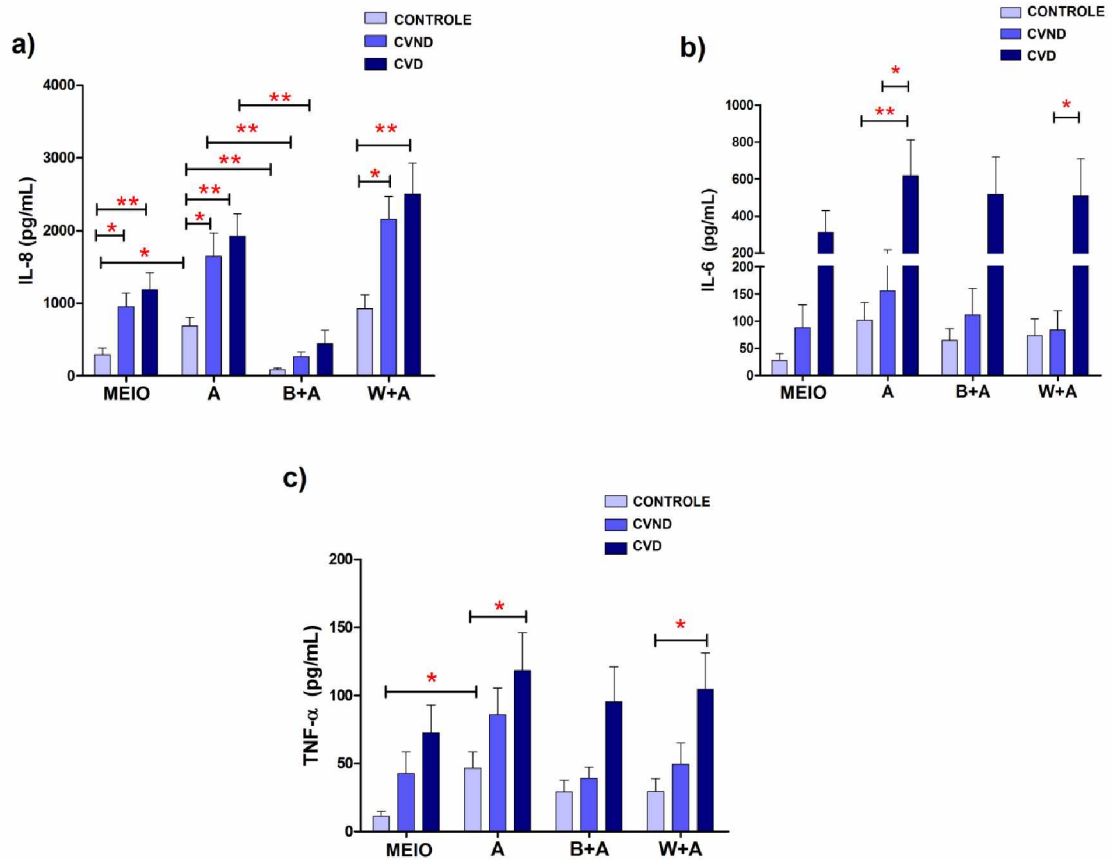


Figura 9: Perfil de citocinas determinado por Cytometry Bead Array (CBA) frente aos estímulos com agonistas e antagonistas de FPRs. Ensaio de CBA (pg/mL) para a detecção de IL-8 (a), IL-6 (b) e TNF-α (c) no sobrenadante de cultura de PBMC de doadores saudáveis (controle), pacientes HIV-1 positivo com carga viral não detectável (CVND) e pacientes HIV-1 positivo com carga viral detectável (CVD), após estímulo com Ac2-26 e antagonistas de FPRs. Meio de cultura (Meio); Ac2-26 (A); BOC-2 (B); WRW4 (W). Os dados foram expressos como médias \pm DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

6. DISCUSSÃO

O polêmico cenário imunológico desencadeado pela infecção pelo HIV-1, o qual é marcado pela depleção de células T CD4⁺ e intensa imunoativação sistêmica, eventos críticos para a progressão e desenvolvimento da AIDS, ainda encontra-se sob intensa investigação (APPAY; SAUCE, 2008). Neste estudo, descrevemos pela primeira vez o envolvimento dos FPRs e AnxA1 durante a ativação celular desencadeada pela infecção pelo HIV-1. Observamos que o vírus é capaz de modular a translocação da AnxA1 com maior liberação para a membrana e meio extracelular em leucócitos de sangue periférico, que juntamente com sua sinalização externa exacerba a inflamação sistêmica e crônica neste cenário infeccioso. Além disso, a detecção do vírus circulante parece induzir alterações significativas nos FPRs de maneira célula específica, com significativo aumento de expressão de FPR3 em monócitos intermediários e células dendríticas e diminuição de FPR2/ALX em granulócitos possivelmente disfuncionais. A modulação dos receptores foi ainda associada a diferentes perfis funcionais.

Nossos resultados foram obtidos de grupos heterogêneos de indivíduos que representam os dois principais perfis de pacientes infectados pelo HIV-1: pacientes HIV-1⁺ com carga viral detectável (CVD) sem HAART e pacientes HIV-1⁺ com carga viral não detectável (CVND) sob intenso e regular regime de HAART. Detectamos que aquele primeiro grupo foi marcado por contagens baixas de leucócitos, baixos níveis de células T CD4⁺, baixa relação CD4/CD8, e histórico significativo de doenças oportunistas (DO). Estes achados foram acompanhados por correlações significativas observadas entre CV, CD4 e DO, mostrando o curso natural da doença, com redução crônica da contagem de células T CD4⁺ nos pacientes sem tratamento (MAARTENS et al., 2014; SIMON; HO; ABDOL KARIM, 2006). Esta reduzida contagem de células T CD4⁺ provavelmente foi condicionada pelo aumentando da carga viral que causa efeitos citopáticos direto e perda de células CD4⁺, uma característica crítica para o prognóstico dos pacientes. Contrariamente, observamos que o uso regular de HAART pode reduzir a carga viral, suprimir a replicação do vírus, aumentando a contagem de células T CD4⁺, diminuindo o aparecimento de doenças oportunistas e melhorando a condição geral dos pacientes do grupo CVND (SIMON et al., 2006).

Frente a este intrigante paradoxo da resposta imune anti-HIV, assim como frente à descoberta de que o FPR2/ALX é um co-receptor alternativo do HIV-1 (COETZER et al., 2011; NEDELLEC et al., 2009; SHIMIZU et al., 2008) nos levou a investigar, em

populações de leucócitos de sangue periférico, a influência do HIV-1 na expressão de FPRs e na translocação e função da AnxA1, a qual é intensamente descrita com papel anti-inflamatório em outras condições patológicas (DALLI et al., 2012; KAMAL; FLOWER; PERRETTI, 2005; SUGIMOTO et al., 2016). Embora não tenham sido detectadas alterações nos níveis de transcrição de ANXA1 entre os grupos, observou-se a liberação desta proteína para o meio extracelular, a qual foi dependente da ativação celular induzida pelo HIV-1, provavelmente afetando o seu papel funcional (PERRETTI et al., 2000; PERRETTI et al., 1996). Curiosamente, este comportamento específico foi um perfil comum em todos os tipos de células avaliadas sob a infecção pelo HIV-1. Portanto, acreditamos que a presença de ativação imune induzida pelo vírus ativo determinou a translocação da AnxA1, evidenciado por sua baixa concentração intracelular e maior detecção na superfície celular e no plasma de pacientes HIV-1 + do grupo CVD. Um perfil distinto e oposto foi verificado no grupo CVND, possivelmente mediado pela terapia antirretroviral efetiva, que apontou diminuição da liberação de AnxA1 para o meio extracelular, evidenciada pelos baixos níveis plasmáticos e níveis crescentes no compartimento intracelular. Além disso, embora HAART tenha um papel decisivo no prognóstico de pacientes HIV-1+, não foi capaz de redirecionar a condição imunológica geral do paciente para um perfil semelhante ao de indivíduos saudáveis. É importante notar que o grupo controle apresentou maior equilíbrio dos níveis de AnxA1 tanto no meio intracelular, como no meio extracelular e membrana. A correlação positiva entre os níveis plasmáticos de AnxA1 e a carga viral, bem como a correlação negativa entre os níveis plasmáticos de AnxA1 e a contagem de CD4+, sugerem uma dependência direta da presença de vírus ativos neste processo e associação com pior prognóstico para o paciente.

Além da interferência na translocação de AnxA1, a infecção também modula seus receptores alvo, os FPRs. A interação dos FPRs com vários ligantes pró e anti-inflamatórios faz com que estes receptores adquiram a capacidade reguladora de múltiplas condições patológicas, incluindo a inflamação (KAO et al., 2014), os processos infecciosos (SHIMIZU et al., 2008) e a tumorigênese (CHEN et al., 2013; GASTARDELO et al., 2014). Em nosso estudo, observamos que os FPRs foram modulados de forma célula específica, provavelmente ocasionando o comprometimento de diferentes populações celulares, com diferentes papéis funcionais dentro do sistema imunológico, particularmente no processo infeccioso.

O papel dos FPRs nas populações de linfócitos ainda é pouco descrito. Assim, a expressão de FPRs em linfócitos T CD4+ foi caracterizada frente à infecção por HIV-1 e, embora uma depleção grave destas células tenha sido especialmente observada no grupo CVD, ambos os grupos HIV-1+ apresentaram um aumento no percentual de células que

expressam FPR1 e FPR2/ALX em comparação ao grupo controle, sugerindo que a modulação de ambos os FPRs é diretamente influenciada pela infecção viral. Curiosamente, o grupo CVND apresentou a maior expressão dos dois FPRs, indicando uma possível associação com a ação da HAART. Além disso, a densidade de FPR1 nas células T CD4⁺ foi extremamente superior ao FPR2/ALX. No grupo CVD isto foi acompanhado de perda da AnxA1 endógena, aumento da sua translocação para a membrana e liberação para o meio extracelular. Interessantemente, a literatura demonstrou o envolvimento da AnxA1 em três diferentes modelos de inflamação mediada por células T CD4⁺ confirmando que a deficiência de AnxA1 está associada com a exacerbação da inflamação dependente de células T (YANG, Y. H. et al., 2013). Sendo assim, sugerimos que, sob a infecção pelo HIV-1, a AnxA1 transloca para a superfície das células T CD4⁺, principalmente no grupo CVD, preferencialmente agindo via FPR1, apresentando um perfil pró-inflamatório.

Interessantemente, foi demonstrado que a exportação de AnxA1 para a membrana plasmática externa de linfócitos apoptóticos co-localizados com fosfatidilserina é um requisito para a depuração eficiente de células apoptóticas, sugerindo um papel da AnxA1 como sinal apoptótico de células CD4⁺ para a atuação de fagócitos (ARUR et al., 2003). Portanto, a translocação de AnxA1 pode funcionar como um sinal apoptótico ativo quando combinada com células T CD4⁺ infectadas, permitindo a depuração de células apoptóticas mediadas por fagócitos, provavelmente explicando parte de sua grave depleção durante a progressão da doença. Este fato é ainda corroborado pelo comportamento oposto da expressão de FPRs em linfócitos T CD8⁺, que apresentou o maior percentual de expressão de ambos os receptores no grupo CVD e maior densidade de FPR1 no grupo CVND, provavelmente apoiando a expansão das células T CD8⁺ devido à presença de ambos os receptores. Portanto, levantamos a hipótese de que, sob alta carga viral, AnxA1 é secretada e se torna um sinal apoptótico quando o receptor FPR1 é altamente expresso. Assim, a presença de ambos os receptores pode estar associada à proliferação de células T, enquanto a depleção de FPR2 e expressão de FPR1 estão provavelmente relacionadas com sinais de morte.

Nossos dados também demonstraram que a infecção pelo HIV-1 não apenas influenciou o perfil dos linfócitos, como também determinou a mudança do fenótipo dos monócitos, exibindo maiores níveis de monócitos intermediários CD14⁺⁺CD16⁺ durante a infecção. Isto é corroborado pelo aumento das subpopulações de monócitos de CD14⁺CD16⁺⁺ (não clássicos) e CD14⁺⁺CD16⁺ (intermediários) em doenças cardiovasculares e inflamatórias e durante a infecção pelo HIV-1, sendo que a subpopulação de monócitos intermediários pode atingir 10-50% da população total de monócitos durante a

infecção pelo HIV-1 (CAMPBELL et al., 2014; YANG, J. et al., 2014). Além disso, na infecção pelo HIV-1, a proporção desta subpopulação está diretamente relacionada aos níveis de viremia, ativação das células T (HLA-DR e CD38), aumento dos níveis de IL-6 e, portanto, está relacionado à pior prognóstico (CAMPBELL et al., 2014; FUNDERBURG et al., 2012; YANG, J. et al., 2014). A literatura ainda demonstra que esta subpopulação de monócitos exibe altos níveis de CCR2 e CCR5, tornando-se não só mais suscetível à infecção pelo HIV-1, mas também sustentando a replicação do vírus. Ao mesmo tempo, os monócitos intermediários apresentam atividade inflamatória significativa, que estão de acordo com os nossos resultados. Sabe-se também que monócitos expressando CD16+ têm um fenótipo imunológico mais maduro, que é consistente com o perfil de macrófagos, explicando parcialmente a sua capacidade de migrar e de se infectar (CAMPBELL et al., 2014).

Investigando o perfil de FPRs nesta subpopulação de monócitos CD14++CD16+, observou-se que o HIV-1 não afetou os níveis de FPR1 e FPR2/ALX; no entanto, apresentou aumento significativo na expressão de FPR3. Esta alta expressão de FPR3 também ocorreu em células dendríticas circulantes, especialmente no grupo CVD. Estes achados também são corroborados pelo fato de que os monócitos CD16+ encontrados em níveis mais elevados nos grupos HIV-1 são os principais precursores de DCs na circulação (QU et al., 2014; RANDOLPH et al., 2002). Yang e colaboradores (2002) descreveram a expressão de FPR3 em populações de monócitos, bem como em DCs derivadas destes monócitos. Além disso, os autores relataram que as DCs mantêm a expressão funcional deste receptor mesmo após a sua maturação, o que pode estar envolvido na regulação do tráfico de células durante a captura e processamento de antígenos na periferia, bem como na estimulação de células T durante a resposta imune (YANG, D. et al., 2002).

Propomos que a mudança fenotípica da população de monócitos para um perfil mais inflamatório (CD14++CD16+) durante a infecção pelo HIV-1 possa estimular a expressão de FPR3, provavelmente atuando sobre o tráfico de células por meio da associação a ligantes endógenos disponíveis no microambiente (KAO et al., 2014). Sugerimos que os monócitos intermediários funcionam como reservatórios virais à medida que se tornam mais suscetíveis à infecção pelo HIV-1 devido ao aumento da expressão de CCR5 na superfície. Além disso, tanto os monócitos como as células dendríticas apresentam maior capacidade de migração tornando-se carreadoras da infecção, o que determinaria a disseminação do vírus e possível progressão da doença.

Tem sido relatado que a AnxA1 presente nos exsudatos inflamatórios, bem como liberada pelas células apoptóticas, é capaz de sinalizar via FPR2/ALX presente em monócitos

direcionando-os para locais de inflamação e estimulando a depuração de células apoptóticas (MCARTHUR et al., 2015). Além disso, um ligante de alta afinidade ao FPR3, o F2L (peptídeo acetilado de 21 aminoácidos derivado da região N terminal da proteína intracelular de ligação a heme, HEBP1), é altamente liberado após dano e morte celular (DEVOSSE et al., 2011; MIGEOTTE et al., 2005). Portanto, sugerimos que os monócitos intermediários que expressam FPR2/ALX são capazes de manter e provavelmente estimular a expressão de FPR3, que também pode estar envolvido na depuração de neutrófilos e células T CD4+ apoptóticas sob intensa replicação viral. Além disso, a liberação de F2L também pode contribuir para a expressão aumentada de FPR3 em monócitos intermediários e DCs, os quais podem estar envolvidos na tentativa de resolução da inflamação crônica, sugerindo outra atuação para estas células.

A correlação positiva entre os níveis de transcrição de FPR3, a presença de doenças oportunistas e os níveis de transcrição de ANXA1, sustentam ainda mais os nossos resultados, sugerindo uma participação direta ou indireta de AnxA1 na ativação imune crônica e seu possível envolvimento como sinalizadora para *clearance* de células apoptóticas. A AnxA1 pode ainda contribuir para eventos que culminam com a liberação de mais ligantes ativadores de FPR3. No entanto, sua associação com doenças oportunistas ainda precisa ser melhor avaliada. Não podemos descartar a possibilidade de ativação de FPR3 por produtos microbianos circulantes, no entanto, a associação com a perda de células T CD4+ é a hipótese mais plausível para explicar a predisposição dos pacientes à aquisição de infecções oportunistas.

Durante o curso da infecção pelo HIV-1, os indivíduos tornam-se mais susceptíveis a infecções oportunistas devido à sua imunodeficiência grave. Os granulócitos, especialmente os neutrófilos, têm um papel importantíssimo na defesa imunológica contra infecções oportunistas, porém durante a patogênese do HIV-1, uma redução no número de granulócitos, perda de função e altas taxas de morte celular são observadas (DOBMEYER et al., 1995). É interessante notar que o papel anti-inflamatório de FPR2/ALX nos neutrófilos é bastante conhecido, o qual é regulado no sítio inflamatório para a resolução adequada da inflamação (NATHAN, 2006), porém a expressão dos FPRs nos granulócitos durante a infecção pelo HIV-1 ainda não foi explorado. Nesta investigação, avaliamos os perfis de expressão de FPR1 e FPR2/ALX em granulócitos durante a infecção pelo HIV-1, o que revelou uma significativa diminuição de ambos os receptores no grupo CVD, enquanto que o grupo CVND apresentou níveis diminuídos apenas de FPR2/ALX. Estes achados são corroborados por outros estudos que demonstraram que o HIV-1 pode induzir disfunção de neutrófilos, especialmente em

pacientes com carga viral detectável (DOBMEYER et al., 1995). Isto ainda é reforçado por resultados que mostraram neutrófilos menos responsivos em indivíduos HIV positivos comparados a indivíduos HIV-1 negativos após a estimulação *in vitro* com N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), um agonista de FPR1 (MOORE; HENDERSON; GAZZARD, 1998).

Portanto, FPR1 tem um papel extremamente importante na indução da migração de neutrófilos na defesa contra processos infecciosos (DORWARD et al., 2015). Assim, a perda parcial da sua expressão no grupo CVD pode prejudicar diretamente a migração dos neutrófilos para locais de inflamação e, portanto, os processos infecciosos não podem ser contidos durante a progressão da doença. Levando em consideração os perfis de expressão de FPRs em outras células imunes, podemos afirmar que a redução mais significativa nos níveis de transcrição de FPR2/ALX detectada em ambos os grupos HIV-1 positivos foi devido à intensa perda nos granulócitos. Portanto, sugerimos ainda que a expressão muito baixa de FPR2/ALX é capaz de prejudicar a resolução da inflamação, que pode ainda ser dependente da translocação de AnxA1 para o meio extracelular, explicando o perfil circulante inflamatório e a ativação crônica em indivíduos HIV-1 positivos. Além disso, observou-se que o grupo CVND não apresentou baixa expressão de FPR1, e também não apresentou alta concentração de AnxA1 na superfície. É possível que a ausência de partículas virais circulantes controladas pela terapia antirretroviral no grupo CVND não desencadeie a liberação de AnxA1 para o meio e também pode ter impedido a perda da expressão de FPR1, que sem estímulos virais não se internaliza. Esta hipótese é sustentada pelo fato de que a proteína do envelope gp41 do HIV-1 pode ativar especificamente o FPR1 (SU; GAO; et al., 1999; SU; GONG; et al., 1999), e após a ligação de um ligante específico de FPR1, a célula torna-se rapidamente não responsiva à estimulação subsequente, devido à internalização e dessensibilização do receptor. Além disso, a expressão de FPR1 nos leucócitos também pode servir como um marcador para a inflamação sistêmica (STOCKLEY et al., 1994). Nossos resultados são ainda corroborados por relatos que demonstram que a diminuição da carga viral controlada por HAART foi associada a uma recuperação parcial da função dos neutrófilos (MASTROIANNI et al., 1999).

Além da caracterização de AnxA1 em várias populações celulares envolvidas na resposta imune contra o HIV-1, avaliou-se ainda qual seria o seu papel na sinalização extracelular por meio do estímulo de PBMCs com seu peptídeo funcional Ac2-26. Estudos têm demonstrado que AnxA1 aumenta a proliferação e ativação de células T *in vitro*, e ainda induz a diferenciação de células Th0 em fenótipo Th1 (D'ACQUISTO; MERGHANI; et al.,

2007). Além disso, os monócitos e macrófagos são fontes importantes de AnxA1 endógena, que atua facilitando a fagocitose de células apoptóticas (D'ACQUISTO; PERRETTI; FLOWER, 2008). No entanto, o estímulo de macrófagos com AnxA1 recombinante ou seu peptídeo Ac2-26 inibe a liberação de prostanóides, a geração de superóxido e a fagocitose (D'ACQUISTO et al., 2008). O paradoxo entre a sinalização interna e externa de AnxA1 coloca uma interrogação sobre como ocorre a sinalização da apoptose, que parece ser dependente da translocação de AnxA1. Dado os papéis distintos de AnxA1, nossos resultados demonstram que a estimulação com Ac2-26 induziu aumento significativo de citocinas inflamatórias (IL-8, IL-6 e TNF- α) em todos os grupos, incluindo os controles. No entanto, nos grupos HIV-1 positivos a inflamação torna-se extremamente exacerbada pela presença deste peptídeo. Quando o bloqueio de FPRs é feito com BOC-2 (bloqueio FPR1 ou FPR2 / ALX) ou WRW4 (bloqueio FPR2/ALX ou FPR3), observou-se uma redução significativa da produção de IL-8 frente ao antagonismo de BOC-2, mas não com WRW4. Isto sugere que uma maior liberação de IL-8 é modulada através de FPR1, o que justifica a quimiotaxia de neutrófilos na presença de IL-8 com aumento do perfil inflamatório mediado por FPR1 na ausência de antagonistas, tal como descrito em outro estudo (DORWARD et al., 2015). No entanto, o mesmo efeito não foi observado na produção de IL-6 e TNF- α com o uso de bloqueadores de FPRs, que apresentaram perfis semelhantes com uma ligeira redução sob estímulos dos antagonistas. Portanto, as vias de ativação para ambas as citocinas pró-inflamatórias não são diretamente dependentes de FPRs, embora possam ser parcialmente moduladas sob a sinalização de AnxA1.

7. CONCLUSÃO

Por meio deste estudo concluímos que:

- A ativação imunológica desencadeada pelo vírus altera a translocação da Anxa1 com maior liberação para a superfície e meio extracelular em todos os tipos celulares avaliados, marcando sua possível participação na inflamação, ativação imunológica e na sinalização para *clearance* de células apoptóticas.
- A presença do vírus ativo é capaz de modular a expressão dos FPRs de modo célula específica, com foco no aumento da expressão de FPR3 em monócitos de perfil intermediário e células dendríticas, assim como diminuição de FPR2/ALX em granulócitos possivelmente disfuncionais.
- Houve mudança fenotípica de monócitos para um perfil intermediário que caracteriza um papel funcional mais inflamatório, e juntamente com as células dendríticas são apontados como possíveis reservatórios virais.
- A sinalização externa induzida pelo peptídeo funcional da AnxA1 (Ac2-26) está associado à exacerbação da inflamação, com aumento da produção de IL-8, IL-6 e TNF- α . A produção de IL-8 é abortada pelo uso do bloqueador BOC-2, sugerindo sinalização via FPR1.

Sendo assim, descrevemos, pela primeira vez, os efeitos da infecção pelo HIV-1 sobre a modulação de FPRs, a translocação de AnxA1 e a possível participação deste eixo de sinalização FPRs/AnxA1 na ativação celular desencadeada pela infecção e os impactos sob progressão da doença. Além disso, nossos resultados trazem evidências relevantes sobre a complexidade e a diversidade de fatores que podem estar contribuindo para a manutenção do paradoxo da resposta imune anti-HIV.

8. PERSPECTIVAS

Dando continuidade ao estudo, pretende-se confirmar as principais hipóteses levantadas neste estudo, por meio de investigações baseadas na utilização da infecção *in vitro*.

REFERÊNCIAS

APPAY, V. et al. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. **Exp Gerontol**, v. 42, n. 5, p. 432-7, May 2007.

APPAY, V.; SAUCE, D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. **J Pathol**, v. 214, n. 2, p. 231-41, Jan 2008.

ARUR, S. et al. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. **Dev Cell**, v. 4, n. 4, p. 587-98, Apr 2003.

BIRX, D. L. et al. Induction of interleukin-6 during human immunodeficiency virus infection. **Blood**, v. 76, n. 11, p. 2303-10, Dec 01 1990.

BLACKWELL, G. J. et al. Macro cortin: a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids. **Nature**, v. 287, n. 5778, p. 147-9, Sep 11 1980.

BOULOUGOURA, A.; SERETI, I. HIV infection and immune activation: the role of coinfections. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 11, n. 2, p. 191-200, Mar 2016.

BRECHLEY, J. M. et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. **Nat Med**, v. 12, n. 12, p. 1365-71, Dec 2006.

BRECHLEY, J. M. et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. **J Exp Med**, v. 200, n. 6, p. 749-59, Sep 20 2004.

CALADO, M. et al. Coreceptor usage by HIV-1 and HIV-2 primary isolates: the relevance of CCR8 chemokine receptor as an alternative coreceptor. **Virology**, v. 408, n. 2, p. 174-82, Dec 20 2010.

CAMPBELL, J. H. et al. The importance of monocytes and macrophages in HIV pathogenesis, treatment, and cure. **AIDS**, v. 28, n. 15, p. 2175-87, Sep 24 2014.

CECCHINATO, V. et al. Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques. **Mucosal Immunol**, v. 1, n. 4, p. 279-88, Jul 2008.

CHASE, A. J. et al. Severe depletion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells from the intestinal lamina propria but not peripheral blood or lymph nodes during acute simian immunodeficiency virus infection. **J Virol**, v. 81, n. 23, p. 12748-57, Dec 2007.

CHEN, K. et al. Formylpeptide receptor-2 contributes to colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. **J Clin Invest**, v. 123, n. 4, p. 1694-704, Apr 2013.

COETZER, M. et al. Extreme genetic divergence is required for coreceptor switching in HIV-1 subtype C. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 56, n. 1, p. 9-15, Jan 1 2011.

COOPER, A. et al. HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration. **Nature**, v. 498, n. 7454, p. 376-9, Jun 20 2013.

CROUSER, E. D. et al. Monocyte activation by necrotic cells is promoted by mitochondrial proteins and formyl peptide receptors. **Crit Care Med**, v. 37, n. 6, p. 2000-9, Jun 2009.

D'ACQUISTO, F. et al. Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 1095-102, Feb 01 2007.

D'ACQUISTO, F. et al. Impaired T cell activation and increased Th2 lineage commitment in Annexin-1-deficient T cells. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 11, p. 3131-42, Nov 2007.

D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. **Br J Pharmacol**, v. 155, n. 2, p. 152-69, Sep 2008.

D'ACUNTO, C. W. et al. The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation. **Cell Signal**, v. 26, n. 1, p. 173-8, Jan 2014.

DALLI, J. et al. Annexin A1 N-terminal derived Peptide ac2-26 exerts chemokinetic effects on human neutrophils. **Front Pharmacol**, v. 3, p. 28, 2012.

DE PAULIS, A. et al. HIV-1 envelope gp41 peptides promote migration of human Fc epsilon RI+ cells and inhibit IL-13 synthesis through interaction with formyl peptide receptors. **J Immunol**, v. 169, n. 8, p. 4559-67, Oct 15 2002.

DENG, X. et al. A synthetic peptide derived from human immunodeficiency virus type 1 gp120 downregulates the expression and function of chemokine receptors CCR5 and CXCR4 in monocytes by activating the 7-transmembrane G-protein-coupled receptor FPRL1/LXA4R. **Blood**, v. 94, n. 4, p. 1165-73, Aug 15 1999.

DERDEYN, C. A.; SILVESTRI, G. Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 4, p. 366-73, Aug 2005.

DEVOSSE, T. et al. Processing of HEBP1 by cathepsin D gives rise to F2L, the agonist of formyl peptide receptor 3. **J Immunol**, v. 187, n. 3, p. 1475-85, Aug 1 2011.

DOBMEYER, T. S. et al. Decreased function of monocytes and granulocytes during HIV-1 infection correlates with CD4 cell counts. **Eur J Med Res**, v. 1, n. 1, p. 9-15, Oct 16 1995.

DOISNE, J. M. et al. CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. **J Immunol**, v. 173, n. 4, p. 2410-8, Aug 15 2004.

DORWARD, D. A. et al. The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function during acute inflammation. **Am J Pathol**, v. 185, n. 5, p. 1172-84, May 2015.

EGGENA, M. P. et al. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. **J Immunol**, v. 174, n. 7, p. 4407-14, Apr 01 2005.

EPPLER, H. J. et al. Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 3072-8, Nov 01 2006.

ERNST, S. et al. An Annexin 1 N-Terminal Peptide Activates Leukocytes by Triggering Different Members of the Formyl Peptide Receptor Family. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 12, p. 7669-7676, June 15, 2004 2004.

FUNDERBURG, N. T. et al. Shared monocyte subset phenotypes in HIV-1 infection and in uninfected subjects with acute coronary syndrome. **Blood**, v. 120, n. 23, p. 4599-608, Nov 29 2012.

GASCHEN, B. et al. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. **Science**, v. 296, n. 5577, p. 2354-60, Jun 28 2002.

GASTARDELO, T. S. et al. Inflammation and cancer: role of annexin A1 and FPR2/ALX in proliferation and metastasis in human laryngeal squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e111317, 2014.

GAVINS, F. N. et al. Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4140-7, May 15 2003.

GEORGE, M. D. et al. Early antiretroviral therapy for simian immunodeficiency virus infection leads to mucosal CD4⁺ T-cell restoration and enhanced gene expression regulating mucosal repair and regeneration. **J Virol**, v. 79, n. 5, p. 2709-19, Mar 2005.

GOULDING, N. J. et al. Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation. **Inflamm Res**, v. 47 Suppl 3, p. S158-65, Oct 1998.

HAZENBERG, M. D. et al. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. **AIDS**, v. 17, n. 13, p. 1881-8, Sep 5 2003.

HERBEUVAL, J. P. et al. Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4⁺ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 39, p. 13974-9, Sep 27 2005.

HO, D. D. et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. **Nature**, v. 373, n. 6510, p. 123-6, Jan 12 1995.

JONES, N. A. et al. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response. **J Exp Med**, v. 200, n. 10, p. 1243-56, Nov 15 2004.

KAMAL, A. M.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100 Suppl 1, p. 39-47, Mar 2005.

KAO, W. et al. A formyl peptide receptor agonist suppresses inflammation and bone damage in arthritis. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 17, p. 4087-96, Sep 2014.

LE, Y.; MURPHY, P. M.; WANG, J. M. Formyl-peptide receptors revisited. **Trends Immunol**, v. 23, n. 11, p. 541-8, Nov 2002.

LE, Y.; OPPENHEIM, J. J.; WANG, J. M. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 12, n. 1, p. 91-105, Mar 2001.

LEONI, G. et al. Annexin A1-containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. **J Clin Invest**, v. 125, n. 3, p. 1215-27, Mar 02 2015.

LI, B. Q. et al. The synthetic peptide WKYMVm attenuates the function of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 through activation of formyl peptide receptor-like 1. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 2941-7, May 15 2001.

LIM, L. H.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **FASEB J**, v. 21, n. 4, p. 968-75, Apr 2007.

MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. **Lancet**, v. 384, n. 9939, p. 258-71, Jul 19 2014.

MACALLAN, D. C. Immune responses to HIV and vaccination. **Medicine**, v. 41, n. 8, p. 425-429, 2013.

MASTROIANNI, C. M. et al. Improvement in neutrophil and monocyte function during highly active antiretroviral treatment of HIV-1-infected patients. **AIDS**, v. 13, n. 8, p. 883-90, May 28 1999.

MCARTHUR, S. et al. Definition of a Novel Pathway Centered on Lysophosphatidic Acid To Recruit Monocytes during the Resolution Phase of Tissue Inflammation. **J Immunol**, v. 195, n. 3, p. 1139-51, Aug 01 2015.

MEHANDRU, S. et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. **J Exp Med**, v. 200, n. 6, p. 761-70, Sep 20 2004.

MEIER, A. et al. MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. **J Virol**, v. 81, n. 15, p. 8180-91, Aug 2007.

MIGEOTTE, I.; COMMUNI, D.; PARMENTIER, M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 17, n. 6, p. 501-19, Dec 2006.

MIGEOTTE, I. et al. Identification and characterization of an endogenous chemotactic ligand specific for FPRL2. **J Exp Med**, v. 201, n. 1, p. 83-93, Jan 3 2005.

MOCSAI, A.; WALZOG, B.; LOWELL, C. A. Intracellular signalling during neutrophil recruitment. **Cardiovasc Res**, v. 107, n. 3, p. 373-85, Aug 1 2015.

MOLINA, J. M. et al. Production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta by monocytic cells infected with human immunodeficiency virus. **J Clin Invest**, v. 84, n. 3, p. 733-7, Sep 1989.

MOORE, D. A.; HENDERSON, D.; GAZZARD, B. G. Neutrophil adhesion molecules in HIV disease. **Clin Exp Immunol**, v. 114, n. 1, p. 73-7, Oct 1998.

MORAND, E. F. et al. Detection of intracellular lipocortin 1 in human leukocyte subsets. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 76, n. 2, p. 195-202, Aug 1995.

MUNCH, J. et al. Nef-mediated enhancement of virion infectivity and stimulation of viral replication are fundamental properties of primate lentiviruses. **J Virol**, v. 81, n. 24, p. 13852-64, Dec 2007.

MURPHY, P. M. et al. A structural homologue of the N-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome mapping of a peptide chemoattractant receptor family. **J Biol Chem**, v. 267, n. 11, p. 7637-43, Apr 15 1992.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 3, p. 173-82, Mar 2006.

NEDELLEC, R. et al. Virus entry via the alternative coreceptors CCR3 and FPRL1 differs by human immunodeficiency virus type 1 subtype. **J Virol**, v. 83, n. 17, p. 8353-63, Sep 2009.

PAIARDINI, M.; MULLER-TRUTWIN, M. HIV-associated chronic immune activation. **Immunol Rev**, v. 254, n. 1, p. 78-101, Jul 2013.

PERRETTI, M. Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation. **Gen Pharmacol**, v. 31, n. 4, p. 545-52, Oct 1998.

PERRETTI, M. et al. Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. **Cell Biol Int**, v. 24, n. 3, p. 163-74, 2000.

PERRETTI, M. et al. Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. **Nat Med**, v. 2, n. 11, p. 1259-62, Nov 1996.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 1, p. 62-70, Jan 2009.

PRENDERGAST, A. et al. HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161⁺ Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells. **AIDS**, v. 24, n. 4, p. 491-502, Feb 20 2010.

QU, C. et al. Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. **Int J Infect Dis**, v. 19, p. 1-5, Feb 2014.

RANDOLPH, G. J. et al. The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. **J Exp Med**, v. 196, n. 4, p. 517-27, Aug 19 2002.

ROSENGARTH, A.; GERKE, V.; LUECKE, H. X-ray structure of full-length annexin 1 and implications for membrane aggregation. **J Mol Biol**, v. 306, n. 3, p. 489-98, Feb 23 2001.

ROTHHUT, B. et al. Further characterization of the glucocorticoid-induced antiphospholipase protein "renocortin". **Biochem Biophys Res Commun**, v. 117, n. 3, p. 878-84, Dec 28 1983.

SANDLER, N. G.; SERETI, I. Can early therapy reduce inflammation? **Curr Opin HIV AIDS**, v. 9, n. 1, p. 72-9, Jan 2014.

SCHEPETKIN, I. A. et al. Development of small molecule non-peptide formyl peptide receptor (FPR) ligands and molecular modeling of their recognition. **Curr Med Chem**, v. 21, n. 13, p. 1478-504, 2014.

SCHINDLER, M. et al. Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. **Cell**, v. 125, n. 6, p. 1055-67, Jun 16 2006.

SCHNEIDER, E. et al. Revised surveillance case definitions for HIV infection among adults, adolescents, and children aged <18 months and for HIV infection and AIDS among children aged 18 months to <13 years--United States, 2008. **MMWR Recomm Rep**, v. 57, n. RR-10, p. 1-12, Dec 05 2008.

SENA, A. A. et al. Divergent Annexin A1 expression in periphery and gut is associated with systemic immune activation and impaired gut immune response during SIV infection. **Sci Rep**, v. 6, p. 31157, Aug 03 2016.

SHIMIZU, N. et al. A formylpeptide receptor, FPRL1, acts as an efficient coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus. **Retrovirology**, v. 5, p. 52, Jun 25 2008.

SIMON, V.; HO, D. D.; ABDOOL KARIM, Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. **Lancet**, v. 368, n. 9534, p. 489-504, Aug 5 2006.

SOLITO, E. et al. Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. **FASEB J**, v. 20, n. 9, p. 1498-500, Jul 2006.

STACEY, A. R. et al. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. **J Virol**, v. 83, n. 8, p. 3719-33, Apr 2009.

STOCKLEY, R. A. et al. Neutrophil formyl-peptide receptors. Relationship to peptide-induced responses and emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 149, n. 2 Pt 1, p. 464-8, Feb 1994.

SU, S. B. et al. T21/DP107, A synthetic leucine zipper-like domain of the HIV-1 envelope gp41, attracts and activates human phagocytes by using G-protein-coupled formyl peptide receptors. **J Immunol**, v. 162, n. 10, p. 5924-30, May 15 1999.

SU, S. B. et al. T20/DP178, an ectodomain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41, is an activator of human phagocyte N-formyl peptide receptor. **Blood**, v. 93, n. 11, p. 3885-92, Jun 1 1999.

SUGIMOTO, M. A. et al. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. **J Immunol Res**, v. 2016, p. 8239258, 2016.

TAGOE, C. E. et al. Annexin-1 mediates TNF-alpha-stimulated matrix metalloproteinase secretion from rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **J Immunol**, v. 181, n. 4, p. 2813-20, Aug 15 2008.

TENORIO, A. R. et al. Soluble markers of inflammation and coagulation but not T-cell activation predict non-AIDS-defining morbid events during suppressive antiretroviral treatment. **J Infect Dis**, v. 210, n. 8, p. 1248-59, Oct 15 2014.

VANCOMPERNOLLE, S. E. et al. Expression and function of formyl peptide receptors on human fibroblast cells. **J Immunol**, v. 171, n. 4, p. 2050-6, Aug 15 2003.

VEAZEY, R. S. et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4⁺ T cell depletion and viral replication in SIV infection. **Science**, v. 280, n. 5362, p. 427-31, Apr 17 1998.

WEIN, S. et al. Mediation of annexin 1 secretion by a probenecid-sensitive ABC-transporter in rat inflamed mucosa. **Biochem Pharmacol**, v. 67, n. 6, p. 1195-202, Mar 15 2004.

WEISS, L. et al. HIV infection is associated with the spontaneous production of interleukin-1 (IL-1) in vivo and with an abnormal release of IL-1 alpha in vitro. **AIDS**, v. 3, n. 11, p. 695-9, Nov 1989.

WHO. **HIV/AIDS - Global Health Observatory (GHO) data**, 2015.

YANG, D. et al. Human dendritic cells express functional formyl peptide receptor-like-2 (FPR2) throughout maturation. **J Leukoc Biol**, v. 72, n. 3, p. 598-607, Sep 2002.

YANG, J. et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomark Res**, v. 2, n. 1, p. 1, Jan 07 2014.

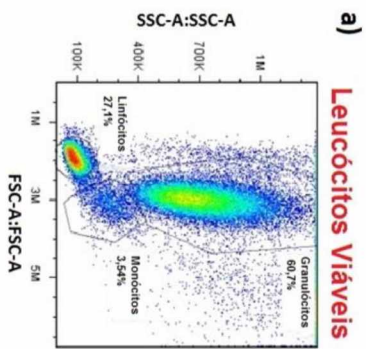
YANG, Y. H. et al. Deficiency of annexin A1 in CD4⁺ T cells exacerbates T cell-dependent inflammation. **J Immunol**, v. 190, n. 3, p. 997-1007, Feb 1 2013.

ZHAO, B. et al. Annexin A1 translocates to nucleus and promotes the expression of pro-inflammatory cytokines in a PKC-dependent manner after OGD/R. **Sci Rep**, v. 6, p. 27028, Jul 18 2016.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 81, n. 3, p. 584-92, Mar 2007.

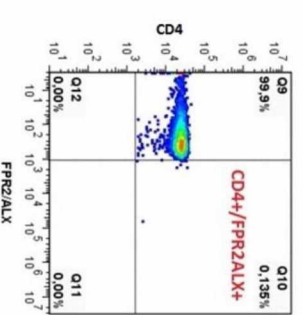
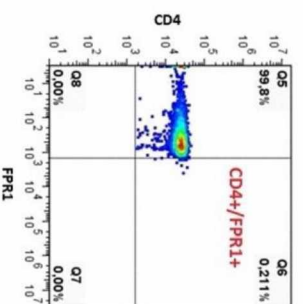
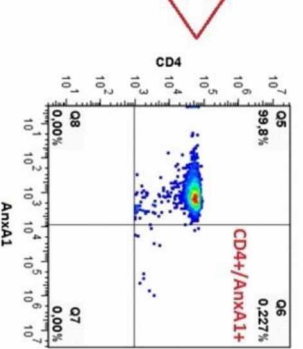
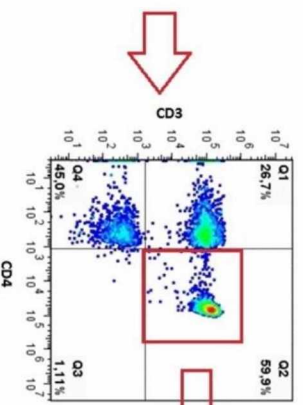
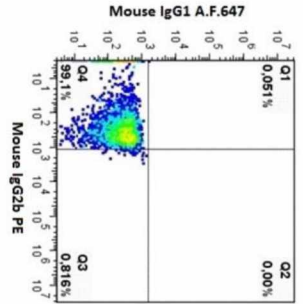
APÊNDICE

APÊNDICE A: Estratégia de *Gating* da Citometria de Fluxo. Gráficos representativos de um doador saudável (grupo controle) demonstrando a estratégia de *gating* utilizada para a análise de citometria de fluxo. As análises das subpopulações foram realizadas de acordo com estratégias de *gating* distintas utilizando o software FlowJo v7.6.5. Um limite de aquisição foi estabelecido de tal modo que quaisquer eventos indesejáveis tais como plaquetas, hemácias e debris celulares não fossem registrados. A compensação espectral foi realizada e os quadrantes foram definidos utilizando *Isotype control* específicos. Em primeiro lugar, os leucócitos foram visualizados num gráfico de dispersão direta (FSC) versus dispersão lateral (SSC), pelo qual foram identificados três subpopulações de leucócitos: linfócitos, monócitos e granulócitos (a). Em seguida, para a identificação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ considerou-se as populações CD3⁺/CD4⁺ (a) e CD3⁺/CD8⁺ (b), respectivamente. Com base nestas populações selecionadas, determinou-se a expressão de AnxA1, FPR1 e FPR2/ALX. Utilizando o *gating* de monócitos, determinou-se as subpopulações de monócitos clássicos (CD14⁺⁺ CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺ CD16⁺) e não clássicos (CD14⁺ CD16⁺⁺). Em seguida, utilizando a população de monócitos intermediários, identificou-se a expressão de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 individualmente (d). Por meio do *gating* de granulócitos identificou-se o marcador específico para esta população de células, o CD66b, juntamente com a expressão de AnxA1, FPR1 ou FPR2 / ALX (e). Para identificar as populações de células dendríticas, inicialmente detectou-se as subpopulações de células viáveis e, em seguida, selecionou-se a população de células Lin⁺/HLA⁺ para excluir outras populações de células que não eram as dendríticas. Em seguida, detectou-se células HLA⁺/CD11cCD123⁺ como a população de células dendríticas. Finalmente, determinou-se a expressão de FPR3 a partir desta última população selecionada (f). Os dados foram apresentados como percentagem do valor absoluto das subpopulações.



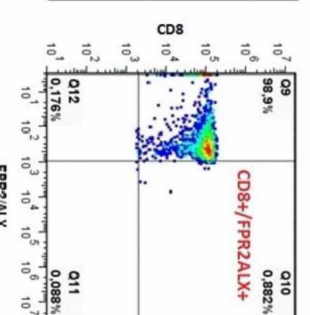
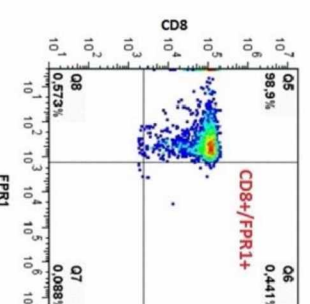
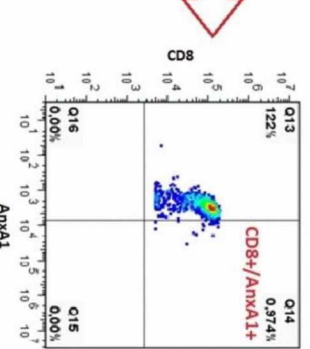
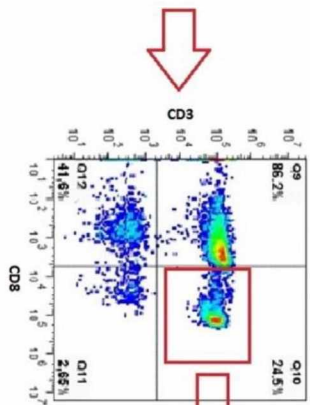
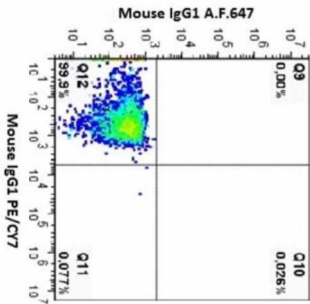
b)

Linfócitos T CD4+



c)

Linfócitos T CD8+



APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Laboratório de Nanobiotecnologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada “Estudo do papel das bactérias lácticas na resposta inflamatória modulada via receptores de peptídeos formilados (FPRs) em indivíduos HIV-1 positivos” sob a responsabilidade dos pesquisadores Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia, Dr. Aécio Sebastião Borges, Msc. Cláudia Mendonça Rodrigues e Dra. Angela Aparecida S. de Sena Priuli. Nesta pesquisa nós estamos buscando entender qual a função da bactéria *Lactococcus lactis* e de uma proteína naturalmente presente nas células do sangue, a Anexina A1, na regulação da inflamação presente em determinados momentos no paciente HIV-1 positivo e também se esta bactéria e esta proteína são capazes de utilizar os receptores chamados FPRs (presentes nas células do sangue) para realizar seu papel. Para isso será necessário realizar a coleta de dois tubos (cerca de 15mL) do sangue periférico. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pela pesquisadora e Biomédica Cláudia Mendonça Rodrigues durante o atendimento no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. Na sua participação você será submetido a uma rápida entrevista, será convidado a assinar este termo e em seguida será realizada a coleta do sangue. Você poderá fazer parte de um dos três grupos envolvidos no estudo, o grupo dos indivíduos HIV-1 positivos em tratamento, o grupo dos HIV-1 positivos sem tratamento ou grupo controle dos indivíduos saudáveis, sem infecção pelo HIV-1. Estas amostras serão processadas no laboratório e em seguida serão submetidas ao tratamento com a bactéria citada, um similar da proteína Anexina A1 e outros ligantes associados aos FPRs. Posteriormente será realizada a extração de RNA e proteínas para análise final do estudo. Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa. Os riscos consistem na possibilidade do aparecimento de um pequeno hematoma e o desconforto ocasionado pela picada necessária para a realização da coleta de sangue. Os benefícios serão a possibilidade de descobrirmos um novo microorganismo que está presente em alimentos e identificar atividades de uma proteína naturalmente presente nas células do sangue e que podem ser benéficos no tratamento de imunodeficiências (como AIDS) ou de outras doenças que induza a perda do equilíbrio imunológico sistêmico e local. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia e Cláudia Mendonça Rodrigues: Universidade Federal de Uberlândia – Av. Amazonas s/n Bloco 2E, Campus Umuarama, Uberlândia – Fone: 3218-2478. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131.

Uberlândia, de de 20.....

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

ANEXOS

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DO PAPEL DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA MODULADA VIA RECEPTORES DE PEPTÍDEOS FORMILADOS (FPRs) EM INDIVÍDUOS HIV-1 POSITIVOS

Pesquisador: Luiz Ricardo Goulart Filho

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 05903312.9.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 198.897

Data da Relatoria: 01/02/2013

Apresentação do Projeto:

A AIDS ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), causada pela Infecção do HIV-1, é caracterizada pela Imunodeficiência Infecciosa contextualizada ao descontrole da ativação imunológica generalizada. As estatísticas descritas até o momento são consequências da perda das células T CD4+, que deixam os indivíduos infectados totalmente susceptíveis a infecções oportunistas, levando a imunocativação sistêmica aliada a anergia da imunidade das mucosas. Apesar da alta eficiência das poli-terapias anti-retrovirais, a busca por tratamentos inovadores e com menos efeitos adversos tem sido foco de investigações. Neste ponto, vale comentar que as bactérias lácticas (BL), presentes em alimentos com alegações de propriedades funcionais, podem estar envolvidas em mecanismos de resposta anti e pró-inflamatória da mucosa intestinal. Os receptores de peptídeos formilados (FPRs) são receptores capazes de receber mensagens e viabilizar a sinalização de uma ampla variedade de ligantes, incluindo moléculas derivadas de bactérias Gram-positivas, como as *L. lactis*, e proteínas do envelope do vírus HIV-1. Por meio desta família de receptores, são regulados processos que favorecem ou previnem a resposta inflamatória, de acordo com o ligante disponível à superfície celular, sendo mais abundante ou com maior afinidade aos FPRs. Sendo assim, este estudo busca investigar o papel da bactéria láctica, *L. lactis* NCDO2118, na regulação da resposta inflamatória mediadas por leucócitos do sangue periférico de indivíduos HIV-1 positivos e negativos e em células epiteliais intestinais, via

Endereço: Av. João Neves de Ávila, 2121- Bloco "1A", sala 234 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



Receptores de Peptídeos Formilados (FPRs).

Objetivo da Pesquisa:

Investigar o papel da L. lactis NCC02118 na regulação da resposta inflamatória mediadas por leucócitos do sangue periférico e em células epiteliais intestinais frente à Infecção por HIV-1, via Receptores de Peptídeos Formilados (FPRs).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo não oferecerá risco considerável, garantirá o sigilo dos dados coletados e os indivíduos envolvidos apenas serão identificados por meio de códigos (números). Um leve desconforto poderá ocorrer apenas devido a possibilidade de formação de um pequeno hematoma no local de punção venosa e devido a picada necessária para o procedimento de coleta de sangue dos pacientes, contudo poderá ser amenizado pela realização do mesmo pela profissional habilitada. Serão respeitadas as orientações do Ministério da Saúde do Brasil, resolução 196/96 para a pesquisa de seres humanos.

Benefícios:

Os resultados deste estudo são de extremo interesse clínico, visto que a descrição das atividades e vias imunobiológicas dos micro-organismos presentes nos alimentos com potencial terapêutico, pode ser uma estratégia simples e eficiente no tratamento de imunodeficiências e doenças que envolvem a perda da homeostasia imunológica sistêmica e de mucosa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de alto nível científico e de grande interesse clínico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos adequados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pendência apontada no parecer 177.133 foi respondida.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. João Neves de Ávila, 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3238-4131 Fax: (34)3238-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA/MG



Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatórios Parciais: maio de 2014; maio de 2015.

Data para entrega de Relatório Final: maio de 2016.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

¿ O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

¿ O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

¿ O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária ¿ ANVISA ¿ junto com seu posicionamento.

¿ Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de

Endereço: Av. João Neves de Ávila, 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo Inicial (Res.251/97, Item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma.

UBERLÂNDIA, 18 de Fevereiro de 2013

Assinador por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3236-4131 Fax: (34)3236-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE LETRAS E LINGUÍSTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DO MESTRADO PROFISSIONAL EM
LETRAS**



PROFLETRAS

ÉLLIS MÁRCIA BATISTA RODRIGUES

**A NASALIDADE NA ESCRITA DE ALUNOS DO QUARTO E QUINTO ANOS DO
ENSINO FUNDAMENTAL I – DESCRIÇÃO
E INTERVENÇÃO PEDAGÓGICA**

**UBERLÂNDIA
2016**

ÉLLIS MÁRCIA BATISTA RODRIGUES

**A NASALIDADE NA ESCRITA DE ALUNOS DO QUARTO E QUINTO ANOS DO
ENSINO FUNDAMENTAL I – DESCRIÇÃO
E INTERVENÇÃO PEDAGÓGICA**

Dissertação, como trabalho de conclusão final, apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Letras, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do Título de Mestre em Letras.

Área de concentração: Linguagens e Letramentos.

Linha de Pesquisa: Teorias da Linguagem e Ensino.

Orientador: Prof. Dr. José Magalhães.

**UBERLÂNDIA
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R696n
2016 Rodrigues, Éllis Márcia Batista, 1976-
A nasalidade na escrita de alunos do quarto e quinto anos do ensino
fundamental I : descrição e intervenção pedagógica / Éllis Márcia Batista
Rodrigues. - 2016.
151 f. : il.

Orientador: José Sueli de Magalhães.
Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Letras -
PROFLETRAS.
Inclui bibliografia.

1. Linguística - Teses. 2. Língua portuguesa - Estudo e ensino -
Teses. 3. Fonologia - Teses. 4. Nasalidade (Fonética) - Teses. I.
Magalhães, José Sueli de, 1967-. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Letras -
PROFLETRAS. III. Título.

CDU: 801

ÉLLIS MÁRCIA BATISTA RODRIGUES

**A NASALIDADE NA ESCRITA DE ALUNOS DO QUARTO E QUINTO
ANOS DO ENSINO FUNDAMENTAL I – DESCRIÇÃO E
INTERVENÇÃO PEDAGÓGICA**

Dissertação, como trabalho de conclusão final,
apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em
Letras, da Universidade Federal de Uberlândia, como
exigência parcial para obtenção do Título de Mestre
em Letras.

Uberlândia,...../...../2016

Prof. Dr. José Sueli Magalhães – UFU
Orientador- Presidente

Prof. Dr. Pedro André da Silva – UFRPE

Prof^a. Dr^a. Camila Leite – UFU

AGRADECIMENTOS

A Deus por se fazer presente em todos os momentos e por usar o curso de mestrado para me transformar em uma pessoa renovada e melhor.

Aos meus pais, João Rodrigues da Silva Filho e Diva Batista Rezende Rodrigues, por serem a minha inspiração na escolha da minha carreira e da minha paixão pela Língua Portuguesa.

Ao meu esposo, amigo, companheiro, Alessandro Oliveira da Silva, amor da minha vida, por dividir comigo as alegrias e angústias dessa caminhada, demonstrando ser incondicionalmente o meu maior incentivador e fã.

Às minhas filhas Ellisannara Lis Rodrigues Soares, Manuella Alexandrina Rodrigues Oliveira e Maria Elisa Rodrigues Oliveira pelos momentos de alegria que serviam como bálsamo para continuar a caminhada.

Ao meu sogro e minha sogra, Francisco da Chagas Ferreira e Miramar Limira de Oliveira por abdicarem de vários momentos de suas vidas para auxiliar minha família na minha ausência.

Às minhas irmãs Anna Lara Batista Rodrigues e Nara Flávia Batista Rodrigues Freire que por várias vezes me apoiaram nesses dois anos de estudos.

Aos amigos que contribuíram de alguma forma: Dona Julieta Freire, Maria da Paz Bezerra, Nelma Chaves, Otoniel Urano, Anercílio Dias Crescêncio, Sandra Diniz Costa, Dirlei de Araújo Diunizio e tantos outros que dividiram os fardos do caminho até aqui.

Aos colegas de turma, dos quais sempre ouvi palavras de conforto e entusiasmo, em especial, Adriana Santos de Oliveira, Maria das Mercês Cardoso de Assis, Sandra Lopes de Sousa e Wânia Elias Vieira de Oliveira, com as quais dividi muito mais que dois anos de estudo.

Aos professores maravilhosos do PROFLETRAS por tantos conhecimentos compartilhados.

Ao meu orientador, José Sueli Magalhães por ter me aceitado como sua orientanda e não ter medido esforços para que eu conquistasse êxito nesse trabalho.

À coordenação e secretaria do PROFLETRAS-UFU.

À Capes pela bolsa concedida.

*A minha filha Manuella, motivo pelo qual iniciei esse trabalho.
A todas as crianças que puderem se beneficiar dele.*

“Se o ensino for lúdico e desafiador, a aprendizagem prolonga-se fora da sala de aula, fora da escola, pelo cotidiano, em um crescimento muito mais rico do que algumas informações que o aluno decora”.

Carlos Alberto Ferreira Neto

RESUMO

Neste trabalho, apresentamos um estudo sobre a representação da nasalidade em textos escritos de alunos do quarto e quinto anos do Ensino Fundamental I de uma escola pública da cidade de Trindade - GO. Ocorrências de palavras como *bobeiro* para *bombeiro*; *aconteceu* para *aconteceu*; *muinto* para *muito* caracterizam os processos fonológicos, denominados, respectivamente, como apagamento, troca e inserção da nasalidade. Um *corpus* constituído por 417 textos foi descrito e analisado com o objetivo de encontrar as causas dos desvios de escrita da nasalidade, bem como propor uma intervenção pedagógica pautada no estudo fonético e fonológico da Língua Portuguesa para melhorar o desempenho de alunos. Entre as discussões teóricas que nos embasaram, encontram-se a visão de Matzenauer (2005) e a de Callou e Leite (2003) sobre a Fonética e a Fonologia. Depois, apresentamos o quadro vocalíco e consonantal do Português, bem como as noções de sílaba e de nasalidade, reportando-nos a Camara Jr (1998), Silva (2002), Alves (2012) e Seara, Nunes e Lazzarotto-Volcão (2015). Para o estudo dos processos fonológicos, pautamo-nos em Zorzi (2003) e em Othero (2015). Outro aporte importante neste trabalho são as pesquisas relacionadas à consciência fonológica e à alfabetização, para as quais retomamos estudos de Bisol (1974), Morais (1990), Signorini (1998), Lemle (2000), Callou e Leite (2003), Moojen (2003), Scliar-Cabral (2003), Freitas (2004), Morais e Leite (2005), Adams (2006), Bortoni (2006), Santos (2012) e Queiroba, Zorzi e Garcia (2015). Nossa metodologia foi elaborada com base em estudos sobre: i) a concepção de escrita segundo Oliveira (2005); ii) os níveis de hipótese da escrita, de acordo com Ferreiro e Teberosky (1985); iii) pressupostos vigotskianos sobre a zona de desenvolvimento proximal, os jogos e a ludicidade; e, por fim, iv) a visão de Lamprecht (2012) e Piaget (1976) dos jogos para desenvolvimento cognitivo. A análise das produções iniciais dos alunos revelou um número significativo de trocas, apagamentos e de inserções da nasalidade. Em virtude disso, propusemos uma intervenção pedagógica formada por quatorze aulas, teóricas e práticas sobre vogais, consoantes e sílabas, além de utilizar o kit alfabeto móvel e quatro jogos pedagógicos (caça-palavras nasal, memória nasal, bingo da nasalidade e baralho de sílabas) produzidos com palavras utilizadas pelos próprios alunos em suas produções iniciais ou da lista de pares mínimos nasal/não-nasal. Conclui-se que aulas teóricas e jogos pedagógicos embasados nos estudos fonético-fonológicos podem diminuir consideravelmente as ocorrências de processos fonológicos de troca, apagamento e inserção da nasalidade na escrita de textos de alunos do quarto e quinto anos do Ensino Fundamental I.

Palavras-chave: Fonética. Fonologia. Processos Fonológicos. Nasalidade. Ensino.

ABSTRACT

In this paper, we present a study about the representation of nasality in texts written by fourth and fifth grade students from the Elementary Education of a municipal public school. Occurrences of words like *bobeiro* to *bombeiro*; *aconteceu* to *aconteceu*; *muinto* to *muito* characterizes the phonological processes, respectively erasure, swap and insertion of nasality. A *corpus* with 417 texts was described and analysed in order to find the causes of the nasality writing deviations, as well as to propose a pedagogical intervention based on phonetic and phonological study of the Portuguese Language to improve students performance. Among the theoretical discussions we underpin, there are the vision of Matzenauer (2005) and the vision of Callou and Leite (2003) on the phonetics and phonology. Then, we present the Portuguese vowels and consonants, along with the syllable and nasality, taking as reference Camara Jr (1998), Silva (2002), Alves (2012) and Seara, Nunes e Lazzarotto-Volcão (2015). For the phonological processes study we relied on Zorzi (2003) and Othero (2015). Another important contribution in this paper are the researches related to phonological awareness and literacy, for which we used as reference studies from Bisol (1974), Morais (1990), Signorini (1998), Lemle (2000), Callou and Leite (2003), Moojen (2003), Scliar-Cabral (2003), Freitas (2004), Morais;Leite (2005), Adams (2006), Bortoni (2006), Santos (2012) and Queiroba, Zorzi e Garcia (2015). Our methodology was developed based on studies about: i) the writing conception, according to Oliveira (2005); ii) the hypothesis levels of writing, according to Ferreiro e Teberosky (1985); iii) Vigotskys's assumptions about zone of proximal development, games and playfulness; and lastly, iv) the Lamprecht (2012) and Piaget's (1976) perspective about cognitive development games. The initial results obtained with the analysis of the students initial productions revealed the significant number of swap, erasure and nasality insertion. Because of that, we proposed a pedagogical intervention consisting of fourteen classes, theoretical and practical classes about vowels, consonants as syllables, besides using four educational games (nasal hunting words, nasal memory, nasality bingo and syllables cards) produced with words that were used by the students in their initial productions or with words from the nasal/ non nasal minimal pair list. The analysis of the final productions and the comparison of these with the initial numbers revealed that the theoretical classes and the pedagogical games based on the phonetic and phonological studies can reduce substantially the occurrences of the phonological processes of erasure, swap and nasality insertion in the writing of fourth and fifth grade students from the Elementary Education.

Keywords: Phonetic. Phonology. Phonological processes. Nasality. Education.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Atividade do livro didático no primeiro ano	18
FIGURA 2	Atividade do livro didático no segundo ano	18
FIGURA 3	Atividade do livro didático no terceiro ano	19
FIGURA 4	Órgãos do aparelho fonador emprestados do sistema articulatório	25
FIGURA 5	Órgãos do aparelho fonador emprestados do sistema fonatório	25
FIGURA 6	Órgãos do aparelho fonador emprestados do sistema respiratório	26
FIGURA 7	Classificação das vogais em Português	28
FIGURA 8	Cordas vocais e glote em som vozeado e surdo	29
FIGURA 9	Órgãos do aparelho fonador (os articuladores passivos e ativos)	30
FIGURA 10	Cavidade oral, nasal, nasofaringe e faringe	31
FIGURA 11	As consoantes do Português	33
FIGURA 12	Diagrama de formação da sílaba no modelo de Camara Jr. (1998)	34
FIGURA 13	Divisão silábica da palavra <i>mantas</i> no modelo de Camara Jr. (1998)	34
FIGURA 14	Atividade proposta na primeira etapa da IP	65
FIGURA 15	Atividade 1 da segunda etapa da IP	68
FIGURA 16	Diagrama exemplo de par mínimo distintivo apresentado aos alunos	70
FIGURA 17	Atividade 2 da segunda etapa da IP	71
FIGURA 18	Atividade 3 da segunda etapa da IP	73
FIGURA 19	Caça-palavras nasal	74
FIGURA 20	Atividade 4 da segunda etapa da IP – Memória nasal	75
FIGURA 21	Memória nasal com pares mínimos	75
FIGURA 22	Atividade 5 da segunda etapa da IP	76
FIGURA 23	Modelo de cartela do Bingo de Nasalidade	77
FIGURA 24	Consoantes bilabiais e não-bilabiais [1]	78
FIGURA 24	Consoantes bilabiais e não-bilabiais [2]	78
FIGURA 25	Atividade 1 da terceira etapa da IP	80
FIGURA 26	Atividade 2 da terceira etapa da IP	81
FIGURA 27	Alfabeto Móvel	82
FIGURA 28	A organização interna do texto	83
FIGURA 29	Atividade 3 da terceira etapa da IP	85
FIGURA 30	Atividade 4 da terceira etapa da IP	86
FIGURA 31	Modelo de divisão silábica feito com o alfabeto móvel	86

FIGURA 32	Atividade 5 da terceira etapa da IP	87
FIGURA 33	Modelos de cartas do Baralho de sílabas	88
FIGURA 34	Atividade proposta na quarta etapa da IP	89

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Exemplos de apagamento da nasalidade	17
QUADRO 2	Exemplos de troca da nasalidade	18
QUADRO 3	Exemplos de inserção da nasalidade	18
QUADRO 4	Moldes silábicos	35
QUADRO 5	Níveis da consciência fonológica	43
QUADRO 6	Amostra de palavras com apagamento da nasalidade	54
QUADRO 7	Amostra de palavras com troca da consoante nasal	58
QUADRO 8	Amostra de palavras com inserção da consoante nasal	59
QUADRO 9	Lista de pares mínimos - nasalidade	61
QUADRO 10	Orgãos do aparelho fonador listados com os alunos durante a aula	66
QUADRO 11	Moldes silábicos do Português montados com os alunos durante a aula	84
QUADRO 12	Palavras para o jogo Baralho de Sílabas	87
QUADRO 13	Ocorrências de troca da nasalidade encontradas nas PIs	92
QUADRO 14	Ocorrências de apagamento da nasalidade encontradas nas PIs	97
QUADRO 15	Ocorrências de inserção da nasalidade encontradas nas PIs	100
QUADRO 16	Comparação das ocorrências das produções iniciais e finais – Turma A	104
QUADRO 17	Comparação das ocorrências das produções iniciais e finais – Turma B	106
QUADRO 18	Comparação das ocorrências das produções iniciais e finais – Turma C	108
QUADRO 19	Comparação das ocorrências das produções iniciais e finais – Turma D	112

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Percentual de alunos com desvios da escrita da nasalidade na produção inicial	91
TABELA 2	Ocorrências de processos fonológicos no corpus	100
TABELA 3	Porcentagem de alunos que apresentaram casos de desvio de escrita da nasalidade nas produções iniciais e finais	101
TABELA 4	Comparação dos casos de processos fonológicos da nasalidade nas produções iniciais e finais	113
TABELA 5	Comparação dos casos de variados processos fonológicos nas produções iniciais e finais	114

LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS

CCV	Padrão silábico consoante-consoante-vogal
CCVC	Padrão silábico consoante-consoante-vogal-consoante
CCVCC	Padrão silábico consoante-consoante-vogal-consoante-consoante
CCVV	Padrão silábico consoante-consoante-vogal-vogal
CV	Padrão silábico consoante-vogal
CVC	Padrão silábico consoante-vogal-consoante
CVCC	Padrão silábico consoante-vogal-consoante-consoante
CVCCC	Padrão silábico consoante-vogal-consoante-consoante- consoante
CVV	Padrão silábico consoante-vogal-vogal
EFI	Ensino Fundamental I
ILEEL	Instituto de Letras e Linguística da Universidade Federal de Uberlândia
IP	Intervenções pedagógicas
PCNs	Parâmetros Curriculares Nacionais
PF	Produção final de texto
PI	Produção inicial do texto
PROFLETRAS	Mestrado Profissional em Letras
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
ZDP	Zona de Desenvolvimento Proximal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1	Fonética e Fonologia	23
2.1.1	O aparelho fonador	24
2.1.2	O sistema vocálico do Português	26
2.1.3	O sistema consonantal do Português.....	29
2.1.4	A Sílabas no Português.....	33
2.1.5	A nasalidade no Português.....	36
2.1.6	Processos fonológicos: apagamento, inserção e troca	38
2.2	Fonética e Fonologia na Alfabetização	39
2.3	Consciência Fonológica e Alfabetização	41
2.4	Consciência fonoarticulatória	44
2.5	Aportes teóricos para a metodologia	45
2.6	Os PCNs e os jogos no fazer pedagógico	49
3	METODOLOGIA	53
3.1	Contexto e participantes da pesquisa	53
3.2	Coleta, seleção e classificação de dados	53
3.3	Procedimentos de elaboração da intervenção pedagógica	60
4	INTERVENÇÃO PEDAGÓGICA (IP)	63
5	DADOS COLETADOS E ANÁLISE	91
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
7	REFERÊNCIAS	123
8	ANEXOS	127
	ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	128
	ANEXO 2 – Produção de texto 1 para coleta de dados	130
	ANEXO 3 – Produção de texto 2 para coleta de dados	131
	ANEXO 4 – Produção de texto 3 para coleta de dados	132
	ANEXO 5 – Material para o Jogo de Memória da Nasalidade.....	133
	ANEXO 6 – Material para o Bingo da Nasalidade.....	134
	ANEXO 7 – Cartas do Baralho de Sílabas	145
	ANEXO 8 – Alfabeto Móvel	150

1 INTRODUÇÃO

O Mestrado Profissional (PROFLETRAS) apresenta dois grandes objetivos: o primeiro, formar professores de Língua Portuguesa capazes de pesquisar teorias metodológicas de forma crítica e responsável e o segundo, propor intervenções pedagógicas que busquem a inovação na sala de aula e contribuam para melhorar o ensino nas escolas públicas brasileiras. Nesse sentido, este trabalho tem o objetivo geral de fornecer possíveis alternativas para professores do Ensino Fundamental I (doravante, EFI) lidarem com as dificuldades de escrita de seus alunos, tendo como pauta noções básicas acerca do sistema fonológico da língua, que podem funcionar como facilitadoras da implementação de intervenções pedagógicas com foco na aquisição da modalidade escrita.

O processo de ensino-aprendizagem da escrita é um dos maiores desafios do trabalho docente, haja vista a dificuldade dos novos aprendizes, principalmente no EFI, em expressarem-se por meio da norma culta. Para isso, é importante a apropriação do sistema alfabético, o que envolve aprendizados muito específicos referentes ao sistema fonêmico e gráfico da língua, como, por exemplo, consoantes, vogais e sílabas. Em função disso, a grande preocupação do professor é descobrir como fazer com que seu aluno se aproprie da escrita, considerando a fala como o ponto de partida para sua aquisição.

Outro fator importante nesta discussão é a dificuldade de se elaborarem atividades, por parte da maioria dos professores do Ensino Básico, uma vez que muitos deles não têm condições de se dedicarem à pesquisa e à organização das próprias intervenções pedagógicas para atender as demandas específicas de seus alunos, devido à sobrecarga de trabalho ou até por desconhecimento de teorias na área da linguagem. Referimo-nos a isso, pois, o professor do Ensino Básico vem dos cursos de Pedagogia, que, em grande parte, apresentam pouca base científica referente à Linguística. Este trabalho, portanto, tem como objetivo específico a intenção de trazer à tona bases linguísticas que permitam contribuir para a reflexão e a ação do professor acerca de sua atuação em sala de aula.

Este trabalho tem por tema a representação da nasalidade em textos escritos de alunos do quarto e do quinto anos do EFI. Em nossas observações em sala de aula, percebemos que o registro equivocado da nasalidade mostra a tentativa da criança deregistrar segmentos que ainda não estão solidificados nessa fase em que se encontra, devido à sua pouca reflexão sobre a Fonética e Fonologia da língua.

Ao observar o livro didático, percebemos um enorme número de intervenções pedagógicas – doravante IP – voltadas para o estudo do texto, ou seja, a macroestrutura. Não

desconsideramos a preocupação de subsidiar o trabalho com os textos, todavia, há uma urgência em promovermos pesquisas que contemplem as particularidades menores do texto, a saber: os fonemas, grafemas, a sílaba e a palavra. Isso é totalmente possível, sem esquecer o trabalho com o texto.

Em vista disso, a escolha do tema da nasalidade se justifica pelo fato de existir poucas IPs com viés microestrutural, com o intuito de ajudar os professores em sua prática em sala de aula quanto à representação escrita da nasalidade.

Para tanto, foram convidados a participar da pesquisa os alunos de quarto e quinto anos do Ensino Fundamental de uma escola pública da periferia de Trindade-GO, de onde foram recolhidos 253 textos, formando nosso *corpus* inicial.

Em uma análise prévia dos processos fonológicos, foram encontrados variados casos de neutralização, alçamento vocálico, ditongação, monotongação, vocalização do L, troca de sonora-surda e surda-sonora, apagamento da vibrante r em posição final, hipossegmentação, hipersegmentação, nasalização e desnasalização e dentre outros.

No entanto, os processos que mais ocorreram foram aqueles acerca da representação escrita da nasalidade, nos quais pudemos constatar a presença de três casos: i) apagamento da nasalidade; ii) troca da consoante nasal; e iii) inserção de um segmento nasal. Essas três ocorrências são ilustradas a seguir, nos quadros 1 a 3 com exemplos retirados dos nossos dados:

a. Apagamento da nasalidade

Quadro 1 - Exemplos de apagamento da nasalidade

REGISTRO CONVENCIONAL ¹	REGISTRO NÃO CONVENCIONAL
Acertaram	“... i os meninos asertaru nofaso...”
Acontece	“... tudo bem isso acotesse ...”
Aconteceu	“... mais no final acoteceu dudo denovo...”

Fonte: *Corpus* desta pesquisa, 2016.

¹ Chamamos de registro convencional a forma ortográfica oficial da língua.

b. Troca da consoante nasal

Quadro 2 - Exemplos de troca da nasalidade

REGISTRO CONVENCIONAL	REGISTRO NÃO CONVENCIONAL
Com	“... eles ficarão con um frio na bariga...” “... e lucas ficaram con medo...”
Conseguiu	“... so que não com seguiu...”
Contar	“... i a gora vam com ta...” “...nos vamos com ta...”

Fonte: *Corpus* desta pesquisa, 2016.

c. Inserção de consoante nasal

Quadro 3 - Exemplos de inserção da nasalidade

REGISTRO CONVENCIONAL	REGISTRO NÃO CONVENCIONAL
Muito	“... porque ela não gostava mu into dese vaso...”
Aconteceu	“... eles fingiran que nada acon tenceu e fim.”
Educado	“... ele era endu cado...”
Idêntica	“...a planta estava indu entica a que quebraram...”
Igual	“... e o vaso ingu al e fim.”

Fonte: *Corpus* desta pesquisa, 2016.

Após esse levantamento, passamos à análise das coleções de livros didáticos² usados pela escola, para verificar de que forma eram tratados os desvios de escrita da nasalidade.

No livro do primeiro ano, após solicitar aos alunos que separem palavras com *m* antes de *p* e *b*, deparamo-nos com atividades em que os alunos devem completar palavras com *m* ou *n*, conforme se pode observar na Figura 1:

²CARPANEDA, I.P. de M. BRAGANÇA, A. D. **Porta Aberta**: letramento e alfabetização, 1º, 2º, 3º, 4º e 5º. São Paulo: FTD, 2011.

Figura 1 - Atividade do livro didático no primeiro ano

6 Leia as palavras do quadro. Depois pinte, em cada uma, a letra que aparece depois do **n**.

banco	anjo	pente
lindo	enlutarado	envelope
confete	panqueca	enxada
manga	enrolado	anzol

7 Responda oralmente.

* Nas palavras do quadro, a letra **n** poderia ser substituída por **m**? Por quê?

8 Complete as palavras com **m** ou **n**. Depois copie.

lâ_____pada	sa_____ba	te_____po
ca_____tima	ca_____po	pi_____cel

Fonte: Carpaneda e Bragança (2011, 1º ano, p.223).

No livro do segundo ano encontramos três páginas e meia de atividades (1,3% do total de 259 páginas) enfocando a representação grafêmica da nasalidade, como por exemplo, no exercício que pede ao aluno que separe as palavras em que a letra *m* forma uma sílaba com vogal, em que as letras *m* e *n* estão em final de sílaba. As atividades sugerem a fixação da regra “antes de *p* e *b* se escreve *m*” e também uma pequena reflexão grafêmica da nasalidade, no entanto a discussão se apresenta muito abstrata e superficial. Não há nenhuma informação prática sobre as vogais nasais, as consoantes bilabiais e as não-bilabiais³, bem como da relação desses segmentos dentro da sílaba.

Figura 2 - Atividade do livro didático no segundo ano

4 Responda.

a. A letra **m** se escreve antes de quais consoantes?

b. E a letra **n**?

* Agora complete a regra.

Usamos a letra _____ antes de _____ e _____.

5 Use o que você aprendeu e complete as palavras abaixo com **m** ou **n**.

a. de _____ te	c. co _____ vite	e. e _____ pada
b. bo _____ beiro	d. e _____ prego	f. pri _____ cesi

Fonte: Carpaneda e Bragança (2011, 2º ano, p.48)

³Durante a aplicação da IP chamamos de não-bilabiais as consoantes labiodentais, dentais, alveolares, alveolopalatais e velares.

Ao analisar o livro do terceiro ano, percebemos que as autoras dedicam cinco páginas (1,9%) para tratar da nasalidade e, apesar de conter sete atividades, nenhuma deixa claro o uso de pressupostos fonético-fonológicos para explicar o uso do *m* e *n* na representação da nasalidade.

Figura 3- Atividade do livro didático no terceiro ano

4 Use o que você aprendeu completando as palavras abaixo com m ou n .		
a. dista _____ cia	d. e _____ pada	g. presu _____ to
b. cara _____ bola	e. ve _____ daral	h. lara _____ ja
c. xa _____ pu	f. pra _____ boesa	i. pra _____ go

Fonte: Carpaneda e Bragança (2011, 3º ano, p.180).

Para nossa surpresa, o assunto é totalmente abandonado nos livros do quarto e quinto anos, fato que não deveria ocorrer já que a maioria das crianças ainda não atingiu o nível de aquisição da escrita esperado para esses anos do EFI. Em virtude dessa eventualidade, o livro deveria continuar abordando assuntos como esse, pelo menos em atividades de revisão, com enfoque fonético-fonológico, atuando como colaborador na escrita da nasalidade. Com certeza, isso contribuiu para que a criança não alcançasse a realidade fonético-fonológica da presença da nasalidade nas palavras e, conseqüentemente, apresentasse dificuldade para representá-la na escrita.

O grande problema dos livros didáticos é que são elaborados para um público ideal, que não existe em nossas escolas. A intervenção pedagógica proposta neste trabalho, ao contrário, é direcionada para a busca de soluções para os desvios de escrita apresentados nos próprios textos dos alunos, com os quais foi possível fazer o diagnóstico dos desvios.

A despeito de todas as questões apresentadas referentes aos livros didáticos analisados, o principal motivo que nos levou a escolher a nasalidade como foco do nosso trabalho é por se tratar de um traço cuja representação na escrita oferece grande dificuldade para 90,1% das crianças das turmas participantes.

O contexto escolar expostos nos permite levantar as seguintes hipóteses: i) se o professor tem conhecimento fonético-fonológico da língua, ele consegue ajudar o aluno na representação da nasalidade; ii) os problemas acerca da representação da nasalidade na escrita podem ser sanados com atividades nas quais é contemplada a consciência fonológica; iii) o estudo sobre a fonética articulatória pode ajudar na aquisição da escrita da nasalidade; iv) os

jogos pedagógicos podem colaborar para a aquisição da escrita.

Em virtude disso, o objetivo geral deste trabalho é propor uma IP pautada no estudo fonético e fonológico da língua que colabore para a melhoria do desempenho de alunos do quarto e quinto anos do EFI na representação da nasalidade em textos escritos. Especificamente, foram estabelecidos os seguintes objetivos:

- investigar as ocorrências de nasalidade em textos de alunos dos quarto e quinto anos do EFI;
- pesquisar as causas dos desvios de escrita da nasalidade em textos escritos de alunos do EFI;
- elaborar uma IP para sanar desvios de escrita da nasalidade.

Esperamos que, cumpridos esses objetivos, estejamos contribuindo para o processo de aquisição de escrita dos alunos do EFI.

Nossa fundamentação teórica iniciou-se por mostrar a visão que estudiosos como Matzenauer (2005) e Callou; Leite (2003) têm da Fonética e da Fonologia. Depois, apresentamos o quadro vocálico e consonantal do Português Brasileiro, bem como os conceitos de sílaba e a nasalidade reportando-nos a Camara Jr. (1998), Silva (2002), Alves (2012) e Seara, Nunes e Lazzarotto-Volcão (2015). Para o estudo dos processos fonológicos, pautamo-nos em Zorzi (2003) e em Othero (2015).

Outro aporte importante deste trabalho são as pesquisas relacionadas à consciência fonológica e à alfabetização, para as quais retomamos estudos de Bisol (1974), Morais (1990), Signorini (1998), Lemle (2000), Callou e Leite (2003), Moojen (2003), Scliar-Cabral (2003), Freitas (2004), Morais e Leite (2005), Adams (2006), Bortoni (2006), Santos (2012) e Queiroba, Zorzi e Garcia (2015).

Nossa metodologia foi elaborada com base em estudos sobre: i) a concepção de escrita segundo Oliveira (2005); ii) os níveis de hipótese da escrita, de acordo com Ferreiro e Teberosky (1985); iii) pressupostos vigotskianos sobre a zona de desenvolvimento proximal, os jogos e a ludicidade; e por fim, iv) a visão piagetiana dos jogos para desenvolvimento cognitivo.

Todas as informações acima citadas foram organizadas neste trabalho da seguinte forma:

No próximo capítulo, apresentamos a fundamentação teórica, na qual abordamos o funcionamento do aparelho fonador, o sistema vocálico e consonantal do Português Brasileiro, bem como estudos acerca da sílaba, do traço de nasalidade e dos processos fonológicos (apagamento, troca e inserção da nasalidade). Também tratamos da Fonética e a

Fonologia voltada para a Alfabetização, bem como os estudos sobre consciência fonológica, fonêmica e fonoarticulatória. Em seguida, expomos as contribuições vigotskianas, as concepções de aprendizagem e as hipóteses de escrita da criança, assim como as orientações acerca da produção escrita dos Parâmetros Curriculares Nacionais (PCNs) de Língua Portuguesa e a importância dos jogos pedagógicos na sala de aula, segundo Piaget (1976).

No capítulo terceiro está exposta a metodologia utilizada na pesquisa e são descritos o contexto e os participantes da pesquisa, o procedimento de coleta, seleção e classificação dos dados, assim como as etapas de elaboração da IP.

O capítulo quarto apresenta a IP com as atividades voltadas para a consciência fonológica da nasalidade e os comentários da aplicação de cada aula. No quinto, apresentamos e analisamos os dados coletados nas produções iniciais e finais. Em seguida, no capítulo sexto, são tecidas as considerações finais do estudo, seguidas das referências.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo, são apresentados os elementos teóricos que fundamentaram as descrições, bem como a implementação de uma proposta pedagógica que alcance o professor e o aluno de EFI.

2.1 Fonética e Fonologia

O homem sempre se comunicou oralmente. A fala é uma característica que o distingue do restante dos animais. É valendo-se da fala que o homem organiza sua sociedade e transmite pensamentos, sentimentos e emoções. Tanto a língua falada quanto a escrita são objetos de estudo da Linguística. Nesta seção, nos detemos em expor como a fala pode ser descrita e analisada nos níveis fonético e o fonológico.

A fonética estuda todos os sons produzidos pelo aparelho fonador humano passíveis de uso na comunicação linguística. A fonética pode estudar os sons por três óticas diferentes, como afirma Matzenauer (2005):

A fonética visa ao estudo dos sons da fala do ponto de vista articulatório, verificando como os sons são articulados ou produzidos pelo aparelho fonador, ou do ponto de vista acústico, analisando as propriedades físicas da produção e propagação dos sons, ou ainda do ponto de vista auditivo, parte que cuida da recepção dos sons. (MATZENAUER, 2005, p. 11).

O enfoque desse trabalho é a fonética articulatória, que colabora para entendermos a fala partir dos órgãos que a produzem. A descrição dos movimentos e posicionamentos que os órgãos realizam em cada som foi importante para a nossa pesquisa.

A Fonética se ocupa de explicar como os sons são produzidos e percebidos, os quais ela chama de fone e os marca com colchetes, por exemplo, a palavra *mata* é representada foneticamente assim: [m] [a] [t] [v].

A Fonologia, por sua vez, estuda os sons da fala, a maneira pela qual cada língua organiza seus sons e a relação deles com o processo em que a mente do falante os organiza com o objetivo de comunicar-se. Assim, Matzenauer (2005, p. 11) enfatiza que

A Fonologia, ao dedicar-se ao estudo dos sistemas de sons, de sua descrição, estrutura e funcionamento, analisa a forma das sílabas, morfemas, palavras e frases, como se organizam e como se estabelece a relação “mente e língua” de modo que a comunicação se processe. (MATZENAUER, 2005, p. 11).

A Fonologia considera a diversidade da língua para entender o sistema que a define,

colaborando para conhecê-la em suas particularidades sonoras e representação semântica. Por conseguinte, estuda o fonema, ou seja, a menor unidade sonora e distintiva de uma língua. Ele é a representação abstrata de um som existente em uma língua, os quais podem ser vogais, semivogais e consoantes.

Assim sendo, a Fonologia refere-se a modelos que tratam do estudo da cadeia sonora da fala. Um dos objetivos de uma análise fonológica é definir quais são os sons de uma língua que têm valor distintivo, ou seja, que servem para distinguir palavras. Sons que estejam em oposição – por exemplo, /n/ e /m/ em “*nora*” e “*mora*” são caracterizados como unidades fonêmicas distintivas chamadas fonemas.

Tanto a Fonética quanto a Fonologia colaboram para o trabalho do professor em sala de aula. Calou e Leite (2003) esclarecem que

Fonética e Fonologia têm sido entendidas como duas disciplinas interdependentes, uma vez que para qualquer estudo fonológico é indispensável partir do conteúdo fonético, articulatório e/ou acústico para determinar quais são as unidades distintivas de cada língua. A caracterização da Fonética como ciência que trata da *substância* da expressão e da Fonologia como a ciência que trata da *forma* da expressão é aceita pela maioria dos linguistas por não implicar a oposição entre os dois campos do conhecimento, nem sua independência e autonomia. (CALLOU; LEITE, 2003, p. 11).

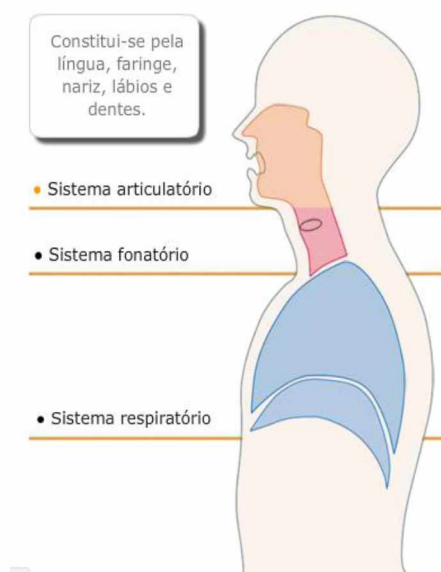
Em vista do que expusemos, é de grande importância um estudo mais detalhado da Fonética e a Fonologia para aprimorar as estratégias e intervenções pedagógicas. Posto isso, passemos a seguir para um breve detalhamento do aparelho fonador.

2.1.1 O aparelho fonador

Para que o ser humano consiga, fisiologicamente, falar é necessário que alguns órgãos do corpo sejam acionados. No entanto, não há órgãos específicos para o desenvolvimento da fala, eles são emprestados de outros sistemas do corpo humano.

Do sistema articulatório utilizamos língua, faringe, nariz, lábios, dentes, conforme mostra a Figura 4.

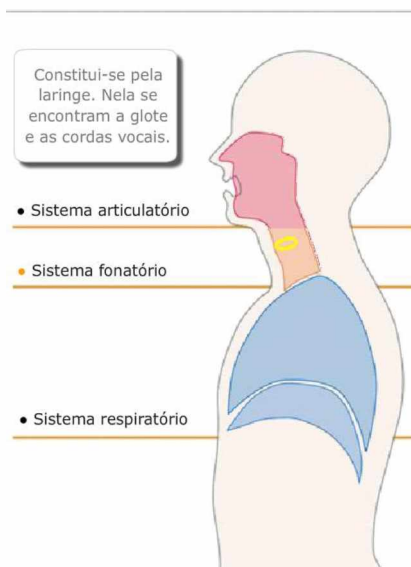
Figura 4 - Órgãos do aparelho fonador emprestados do sistema articulatório



Fonte: Silva (2012).

Do sistema fonatório, utilizamos a laringe, a glote e as pregas vocais no momento de falar. Como se pode ver na Figura 5.

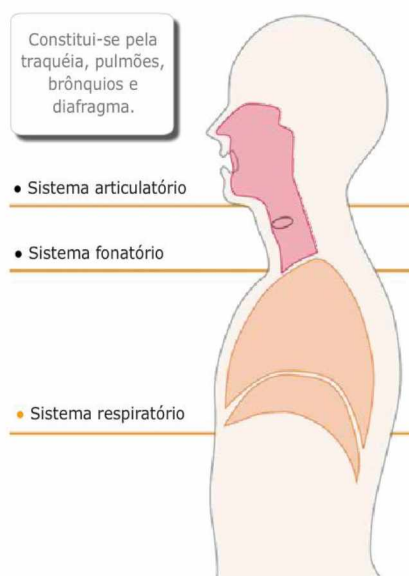
Figura 5 - Órgãos do aparelho fonador emprestados do sistema fonatório



Fonte: Silva (2012).

E finalmente, do sistema respiratório, utilizamos a traqueia, os pulmões, os brônquios e o diafragma, como expostona Figura 6.

Figura 6 - Órgãos do aparelho fonador emprestados do sistema respiratório



Fonte: Silva (2012).

Pode-se perceber que os órgãos que formam o aparelho fonador têm outras funções fisiológicas no corpo humano, por exemplo, respirar, cheirar, engolir e outras, entretanto, são usados para o ato da fala. Devido ao formato do nosso aparelho fonador, a produção de sons se limita ao conjunto de 120 símbolos, como relata Silva (2002), o que é suficiente para qualquer falante produzir todos os sons de qualquer língua natural⁴.

Na próxima seção, apresentamos as vogais, grupo sonoro importante para a Língua Portuguesa e também para nosso trabalho.

2.1.2 O sistema vocálico do Português

Entendemos ser de suma importância esta descrição para a fundamentação teórica do nosso trabalho, haja vista o papel importante que esses segmentos sonoros têm na Língua Portuguesa.

⁴Línguas que se desenvolvem sem interferência formal externa são chamadas línguas naturais. O Português é uma língua natural, por evoluir de acordo com parâmetros gerados pela própria língua a partir do uso feito pelos falantes. Há também línguas artificiais (também chamadas línguas auxiliares). Uma língua artificial é aquela inventada com o propósito específico de comunicação ou para fins de linguagem computacional. O Esperanto é geralmente a língua artificial mais difundida (criada em 1887 pelo polonês Ludwig Lazarus Zamenhof). O léxico de tal língua foi construído com influência de línguas da Europa ocidental e há influência de línguas eslavas na sintaxe e na ortografia. (SILVA, 2002, p.18).

Segundo Silva(2002), no Português existem sete segmentos vocálicos, que são produzidos com a passagem do ar sem interrupção na linha central da boca, como se vê a seguir:

- [i] para o som da vogal *i* em *li*;
- [e] para o som da vogal *e* em *lê*;
- [ɛ] para o som da vogal *e* em *fê*;
- [a] para o som da vogal *a* em *pá*;
- [ɔ] para o som da vogal *o* em *pó*;
- [o] para o som da vogal *o* em *capô*;
- [u] para o som da vogal *u* em *Itu*.

Primeiramente, as vogais podem ser classificadas a partir de três parâmetros principais, a saber:

i - altura da língua: ao pronunciarmos as sete vogais de forma contínua, podemos perceber a modificação da posição da língua no sentido vertical, como, por exemplo em: *a, é, ê, i, ó, ô* e *u*; portanto no Português, temos quatro níveis de altura: alta [i], [u], como em *vi* e *tu*; média-alta [e], [o], como em *vêe pôr*; média-baixa [ɛ], [ɔ], como em *pée sol*; e baixa [a], como em *pá*;

ii - anterioridade, posterioridade e centralidade da língua: pensemos na nossa boca, em sua parte interna, dividida em três partes: parte anterior (na região dos dentes incisivos e alvéolos), parte central (região do céu da boca) e parte posterior (região da garganta). Novamente, ao pronunciarmos os sons vocálicos de forma contínua como em *i, ê, é, a, ó, ô, u*, podemos perceber que a língua vai da parte mais anterior para a mais posterior. Logo, serão anteriores as vogais [i], [e], [ɛ], central a vogal [a] e posteriores as vogais [ɔ], [o] e [u];

iii - arredondamento dos lábios: durante a execução de um som vocálico, os lábios podem estar estendidos ou arredondados. Para a execução dos sons [ɔ], [o] e [u] os lábios ficam arredondados, já para os sons [i], [e], [ɛ] e [a] os lábios são não-arredondados.

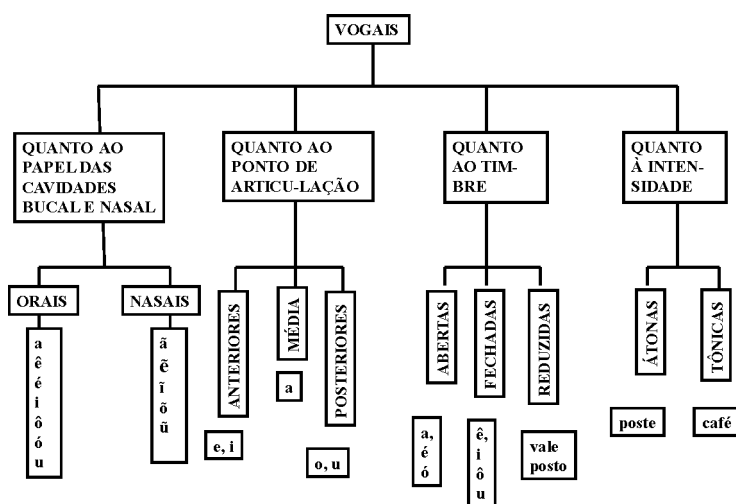
Além das vogais orais, o sistema vocálico do Português apresenta também as vogais nasalizadas, quando, na pronúncia, o ar sai pelas cavidades oral e nasal simultaneamente. Para a produção de uma vogal nasalizada, por exemplo, [ã] da palavra *anta*, o ar que vem dos pulmões encontra o véu palatino abaixado e passa pelas duas cavidades, oral e nasal, então acontece a ressonância na cavidade nasal. Podemos ter a comprovação do movimento do véu palatino quando pronunciamos todas as vogais orais e nasais um pouco mais longas, *a/ã, e/ẽ, i/ĩ, o/õ, u/ũ*, nessa articulação, a movimentação do véu palatino é perceptível.

De acordo com Seara, Nunes e Lazzarotto-Volcão (2015), a classificação das vogais nasais segue os mesmos parâmetros das orais, ficando assim:

- [ĩ] vogal nasal alta anterior não-arredondada;
- [ẽ] vogal nasal média-alta anterior não-arredondada;
- [ã] vogal nasal baixa central não-arredondada;
- [õ] vogal nasal média-alta posterior arredondada;
- [ũ] vogal nasal alta posterior arredondada.⁵

A Figura 7 apresenta o quadro fonético das vogais em Português.

Figura 7 - Classificação das vogais em Português.



Fonte: Costa (2014).

Nesta seção, expusemos resumidamente o sistema vocálico da Língua Portuguesa com intuito de formar uma base linguística para a nossa IP que logo mais apresentaremos. Todas essas informações elencadas mostram a complexidade do estudo com as vogais, que têm grande importância na formação da sílaba e, conseqüentemente, da palavra. Dando continuidade, passamos, na próxima seção, a falar sobre o sistema consonantal do Português.

⁵ A literatura em Fonologia tem assumido que não há vogais nasais fonológicas. Esta discussão, contudo, está fora do escopo deste trabalho. (CAMARA JR., 1997).

2.1.3 O sistema consonantal do Português

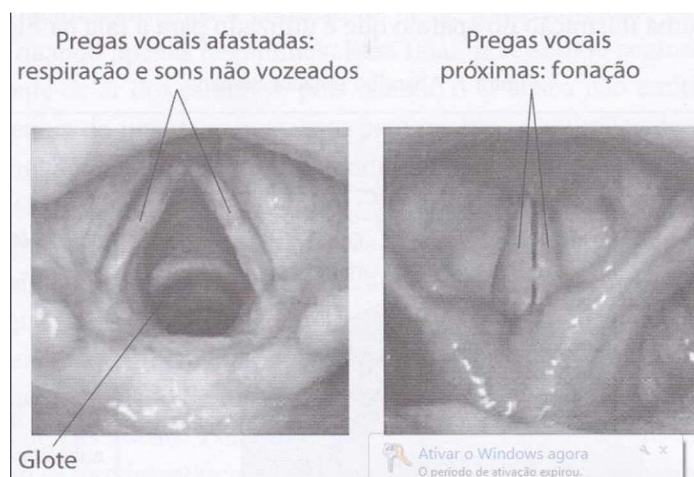
Iniciamos esta seção justificando mais uma vez o porquê de apresentarmos os fundamentos descritos a seguir: nossa intervenção pedagógica, sugerida mais adiante, foi elaborada voltada a um públicopouco familiarizado com a perspectiva fonético-fonológica adotada neste trabalho, por esse motivo faz-se necessário fornecer as explicações basilares para o entendimento da proposta. Além disso, esse é um conhecimento necessário para se pensar a sílaba, também objeto de estudo desse trabalho. Nesta seção, veremos como as consoantes do Português são classificadas.

Segundo Silva (2002), por meio de parâmetros articulatórios, para classificarmos uma consoante, no Português, deve-se levar em conta quatro aspectos: i) mecanismo de corrente de ar; ii) vozeamento e desvozeamento; iii) oralidade e nasalidade; iv) lugar e modo de articulação. Vamos entender cada uma dessas classificações.

As correntes de ar podem ser pulmonar, glotállica e velar, todavia para o Português, a corrente de ar é sempre pulmonar, logo, essa característica não distingue nenhum som da nossa língua. Portanto, deve-se considerar três dos quatro aspectos mencionados no parágrafo anterior.

Conforme a autora, para classificarmos um som como vozeado ou desvozeado, precisamos entender a atuação das pregas vocais e a abertura da glote. Na produção de um som desvozeado, os músculos da glote não se aproximam e as cordas vocais não vibram, o ar passa sem resistência alguma do pulmão para fora, vejamos a foto à esquerda na Figura 8. Quando o som é vozeado, a glote aproxima as cordas vocais que vibram na passagem do ar, como na foto à direita na mesma figura.

Figura 8 - Cordas vocais e glote em som vozeado e surdo

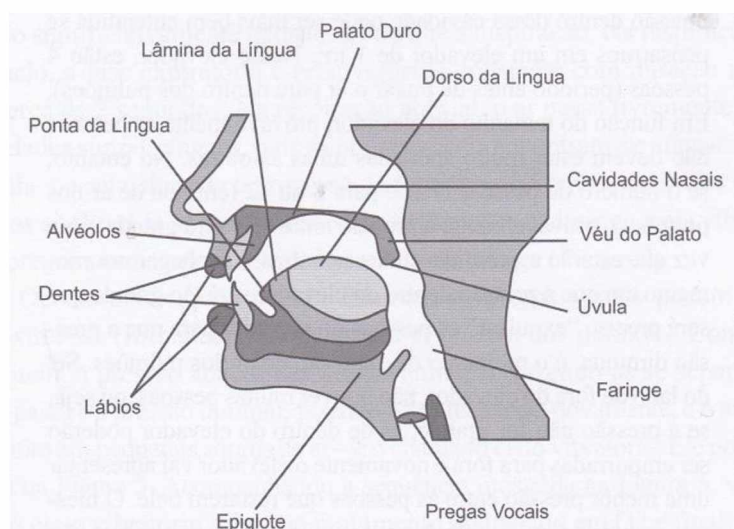


Fonte: Seara, Nunes e Lazzarotto-Volcão (2015).

Por exemplo, ao pronunciarmos as palavras *sela ezela*, é possível sentir a vibração das cordas vocais apoiando os dedos contra o pescoço, na altura do pomo-de-adãomasculino. Ao repetir somente o som das consoantes */s/* e */z/*, com os ouvidos tapados, fica nítida a diferença de surdo e sonoro, sendo */s/* um som surdo e */z/*, sonoro.

De acordo com Silva (2002), os sons podem ser classificados quanto à oralidade e a nasalidade. Como já explicamos, o palato mole, também chamado de véu palatino, é uma parte do céu da boca que fica bem próximo à úvula (Figura 9). O movimento do palato mole e da úvula pode dar ao som a característica de oralidade ou nasalidade.

Figura 9 - Órgãos do aparelho fonador (os articuladores passivos e ativos)



Fonte: Seara, Nunes e Lazzarotto-Volcão (2015).

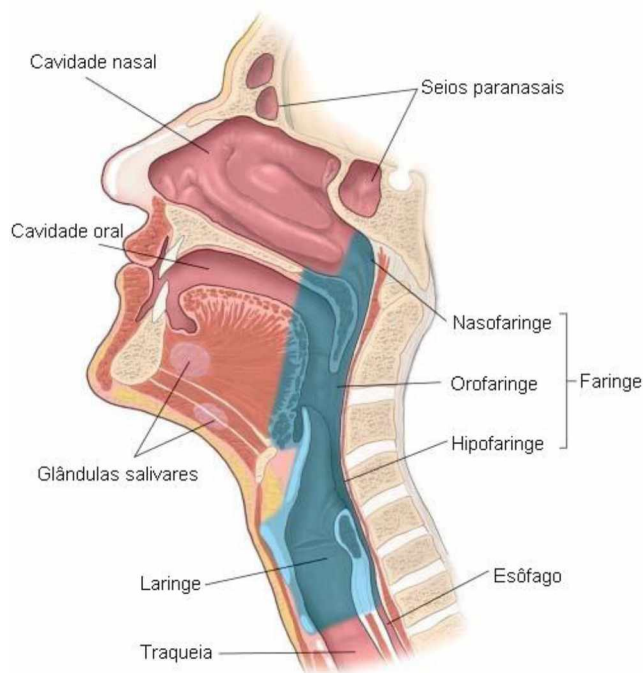
Para classificar os sons consonantais de acordo com o lugar de articulação, é necessário saber que os órgãos do aparelho fonador podem ser divididos em articuladores ativos e passivos. Articuladores ativos são aqueles órgãos que se movimentam na produção dos sons e os passivos os que não se movimentam.

No entanto, a movimentação dos articuladores ativos só é possível devido à existência de cavidades, ou seja, os quatro “espaços”, na verdade, não são espaços vazios, pois neles há a presença de células dos mais variados tipos e de mucosa. São as cavidades no aparelho fonador que possibilitam as movimentações dos órgãos, com as quais o falante consegue realizar vários tipos de sons diferentes. Na Figura 10, podemos ver a cavidade oral (entre a língua e o céu da boca), a cavidade nasal (acima do palato duro) e as cavidades que se formam pela nasofaringe e pela faringe.

O movimento dos articuladores ativos faz com que as cavidades se modifiquem. O lábio inferior e a língua (dividida em ápice, lâmina, parte anterior, parte medial e parte

posterior) modificam a cavidade oral. O palato mole modifica a cavidade nasal e as cordas vocais modificam a cavidade faringal. Os articuladores passivos são o lábio superior, os dentes superiores, os alvéolos, o palato duro. O palato mole e a úvula podem funcionar tanto como articuladores passivos quanto ativos.

Figura 10 - Cavidade oral, nasal, nasofaringe e faringe



Fonte: Chen e Vokes (2008).

O encontro dos articuladores determina o lugar da articulação para a produção de cada som consonantal. Dessa forma, de acordo com Silva (2002), os lugares de articulação podem ser:

- bilabial: quando o lábio inferior encontra o lábio superior as consoantes produzidas são [p], [b] e [m], como nas palavras *pico*, *bico*, *mico*;
- labiodental: quando o lábio inferior encontra os dentes incisivos superiores, as consoantes produzidas são [f] e [v], como nas palavras *fia* e *via*;
- dental ou alveolar: quando a ponta da língua encontra os dentes incisivos, produzimos as consoantes [t] de *tatu*, [d] de *dado*, [s] de *sapo*, [z] de *zanolho*, [n] de *nada*, [l] de *lua*, [r] de *arara*, [ʀ] de *carro* e [ɹ] de *porta* (em que o som do r é pronunciado com a ponta da língua fica voltada para a parte anterior da boca);
- alveolopalatal: quando a parte anterior da língua encontra a parte média do palato duro produzimos as consoantes [tʃ] de *tiro*, [dʒ] de *dito*, [ʃ] de *chave* e [ʒ] de *jato*;

- velar: quando a parte mais anterior da língua encontra com o palato mole produzimos as consoantes [k] de **coco**, [g] de **gato**.

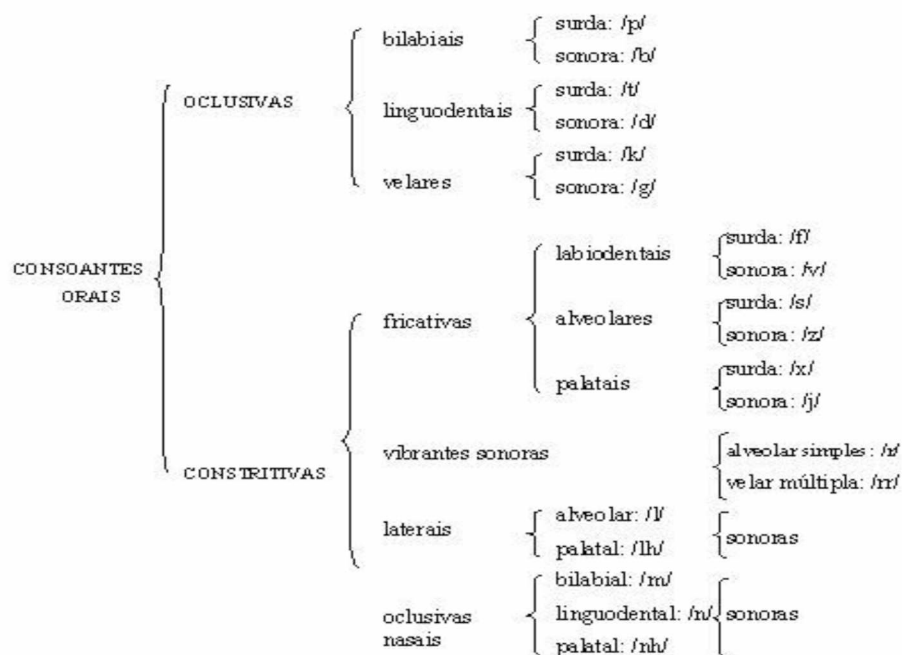
As consoantes são também classificadas quanto ao modo de articulação, ou seja, como os articuladores se comportam na produção do som, pois, para que isso ocorra, o ar passa pelos articuladores e sobre algum tipo de obstrução. O grau e a natureza da obstrução é que caracterizam o som produzido. Conforme o modo de articulação, as consoantes são:

- oclusivas: sons orais, produzidos por um bloqueio do ar que vem dos pulmões pela ação dos articuladores, quer sejam eles os lábios, a língua, os dentes incisivos ou o palato mole. Sons produzidos: [p], [b], [t], [k], [d] e [g], nas respectivas palavras: **pato**, **tato**, **cato**, **dato** e **gato**;
- nasais: essas são como as oclusivas, com bloqueio do ar que vem dos pulmões pela ação dos articuladores, entretanto o véu palatino se posiciona abaixados nessas, produzindo consoantes nasais. Sons produzidos: [m], [n] e [ɲ], nas respectivas palavras: **cama**, **cana** e **canha**;
- fricativas: se os articuladores não fazem um bloqueio total, eles se podem aproximar de tal forma que se esfregam um no outro, ou seja, produzem uma fricção, que aliada à saída do ar, promove o som oral de algumas consoantes. Sons produzidos: [f], [v], [s], [z], [ʃ], [ʒ] e [r], nas respectivas palavras: **faca**, **vaca**, **saca**, **zica**, **chá**, **cajá** e **ré**. Ainda há outras fricativas que representam variações do som da consoante “**r**” dependendo do dialeto;
- africadas: são consoantes orais produzidas com bloqueio do ar e depois com a soltura dele, momento que ocorre uma fricção dos articuladores, língua e região pós-alveolar. Sons produzidos: [tʃ], [dʒ], nas respectivas palavras: **tia** e **dia**;
- lateral: é uma consoante oral em que os articuladores, o ápice da língua e os alvéolos, barram a saída de ar central na boca e ele sai pelas laterais. Som produzido: [l], na palavra **lua**.

Além desses modos de articulação, no Português Brasileiro temos ainda os tipos que não julgamos necessário descrever neste trabalho por não se apresentarem em palavras com contexto propício para nasalidade. Consoantes como: a retroflexa, a fricativa velar vozeada e a lateral palatal vozeada. As demais consoantes foram descritas acima devido ao fato de podermos encontrá-las no contexto de nasalidade. Essas explicações servirão para melhor compreensão da IP sugerida logo à frente.

A Figura 11 apresenta um resumo da classificação das consoantes em Português.

Figura 11 - As consoantes do Português



Fonte: Costa (2014).

Depois de apresentados os sistemas vocálico e consonantal do Português Brasileiro, na nossa próxima seção falamos sobre aspectos fonéticos e fonológicos da sílaba no Português.

2.1.4 A Sílaba no Português

Neste trabalho, acreditamos que o desenvolvimento da consciência fonológica pode proporcionar ao aluno ferramentas para a análise linguística. Em vista disso, o estudo sobre a consciência silábica é mais uma das etapas necessárias para a aplicação da IP a que propomos mais adiante. Para ela, faz-se necessário que o professor e o aluno saibam o que é uma sílaba, como é produzida e composta e que conheçam as regras fonológicas que regem esse componente formador de palavras.

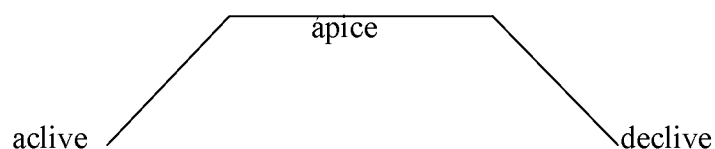
Para a formação de uma sílaba, o ar, em jatos, é expelido pelos músculos responsáveis pela fala. Cada movimento deles corresponde à emissão de uma sílaba.

A produção sonora da sílaba é uma capacidade natural dos homens, desde a mais tenra idade, assim como a percepção de que a palavra é formada por partes menores, já que é uma habilidade encontrada até em crianças ou em adultos não alfabetizados. Segundo Alves (2012), observam-se evidências da consciência fonológica no nível da sílaba quando a criança

é capaz de bater palmas de modo a contar o número de sílabas da palavra, inverter a ordem das sílabas na palavra em questão, adicionar ou excluir sílabas, além de produzir palavras que iniciem ou terminem com a sílaba inicial ou final de outra palavra. (ALVES, 2002, p.34). Em sala de aula, o professor facilmente verifica essa capacidade em seus alunos, mas a noção de o que é uma sílaba e de como ela é formada não é um assunto simples.

De acordo com Camara Jr. (1998), a sílaba é um conjunto de segmentos formados por vogal e consoante sendo necessária a presença de vogal e facultativa a de consoante. Para ele, a sílaba é formada de um aclave, de um ápice e de um declive, conforme a Figura 12.

Figura 12 - Diagrama de formação da sílaba no modelo de Camara Jr. (1998)



Fonte: Adaptado de Camara Jr. (1998, p. 26).

O ápice é constituído por uma vogal. O aclave pode ser constituído por uma ou duas consoantes. O declive é constituído por uma das seguintes consoantes /s/, /r/, /l/, pelas semivogais /i/ e /u/ ou ainda pela consoante nasal. Há sílabas com fonema no aclave e ápice (sílabas *pa*, em *ca-pa*); outras, no ápice e declive (sílabas *ar*, em *ar-co*) e outras só no ápice (sílabas *a*, em “*a*-mor”).

A divisão silábica da palavra *mantas* no modelo de Camara Jr. (1998) ficaria conforme a Figura 13.

Figura 13 - Divisão silábica da palavra *mantas* no modelo de Camara Jr. (1998)



Fonte: Adaptado de Camara Jr (1998, p. 26).

Nos moldes silábicos citados a seguir, a letra maiúscula *C* significa a presença de uma consoante e a letra *V* maiúscula, representa uma vogal. Os padrões silábicos do

Português podem variar quanto ao número de consoantes que ocorrem no acento e no declive, podendo ir de zero a duas na primeira posição e também de zero a três na segunda, como demonstrado no Quadro 4:

Quadro 4 - Moldes silábicos

V	(<i>a</i> -mor)
VV	(<i>au</i> -to)
VC	(<i>ar</i> -ma)
CV	(<i>de</i> -do)
VCC	(ru- <i>ins</i>)
CVC	(<i>cis</i> -ter-na)
CVV	(<i>bei</i> -jo)
CCV	(crime)
CVCC	(<i>cons</i> -tru-ção)
CCVC	(cros-ta)
CCVV	(<i>frei</i>)
CVCCC	(<i>felds</i> -pa-to)
CCVCC	(<i>trens</i>)

Fonte: Camara Jr. (1998, p. 27 a 31) e Seara, Nunes e Lazzarotto Volcão (2015, p.125).

O sistema alfabético do Português tem suas regras explicadas pela Fonologia. É mediante essas regras que as vogais e as consoantes se organizam na sílaba, que pode ser classificadas em sílabas livres, aquelas terminadas por vogal, e em sílabas travadas, as que são terminadas por consoantes. A compreensão de ambos os tipos silábicos é importante para a IP sugerida nesse trabalho, pois as crianças precisam saber que há outros moldes silábicos além do padrão silábico consoante-vogal, como os que encontramos nos contextos de nasalidade. Também outros moldes silábicos foram levados em consideração, dada a necessidade de entender as formas pelas quais a sílaba se organiza na língua.

Em nossa experiência em sala de aula de Língua Portuguesa, podemos constatar nos textos escritos por alunos de séries iniciais que, ao grafarem a nasalidade, dois processos ocorrem: primeiro, a criança não grava a nasalidade porque ainda está no seu nível de hipótese de escrita referente ao silábico-alfabético, no qual, conforme Abaurre (1988), “[...] a criança tende a fazer uma simplificação da estrutura silábica”, utilizando o molde silábico mais simples, CV (consoante+vogal). Nessa fase, a criança não tem internalizada a noção de todos os moldes silábicos e ela recorre àquilo com que ela manteve mais contato até o momento de

sua alfabetização.

O segundo processo que ocorre é aquele em que a criança sabe que deve marcar a nasalidade, mas não sabe qual consoante nasal usar, *m* ou *n*. Nesse caso, a criança não consegue ainda entender que o final de uma sílaba travada deve combinar foneticamente com a primeira letra da sílaba seguinte. Sendo, pois, a consoante seguinte bilabial, ela deve optar pela consoante nasal bilabial *m*. Caso seja uma consoante não-bilabial, ela deve escolher a nasal não-bilabial *n*. É esse tipo de explicação que o professor precisa oferecer ao aluno, como ratifica Seara, Nunes e Lazzarotto-Volcão (2015)

[...] experimentando pronunciar palavras como ‘campo’ e ‘canto’, percebe que não precisaria memorizar a velha regra que diz que antes de ‘p’ e ‘b’ vem sempre ‘m’, uma vez que há uma explicação física do movimento articulatorio[...] São segmentos que têm o mesmo ponto de articulação – dizendo de outra forma, ‘p’ e ‘b’ são homorgânicos, assim como ‘n’ e ‘t’ também são. (SEARA, NUNES; LAZZAROTTO-VOLCÃO, 2015, p. 174 e 175).

Com esse tipo de explicação, o professor pode levar seu aluno a refletir sobre a palavra, depois sobre a sílaba, levando-o à reflexão dos fonemas a partir da consciência articulatória, o que, consequentemente, levará o aprendiz a pensar sobre a representação dos sons que faz para escrever.

Neste trabalho, buscamos mostrar fundamentos da Fonética e Fonologia, que contribuem para embasar o professor de ferramentas auxiliares em um trabalho com a escrita de seus alunos. Por isso, foi importante começar pelo aparelho fonador, passar pelos sistemas vocálico e consonantal do Português, e agora, concluindo, a seção sobre sílaba. Tanto professor, quanto o aluno se beneficiarão desses assuntos, o que pretendemos constatar nas atividades de produção de texto finais dos alunos da pesquisa.

Na próxima seção, apresentamos algumas análises da nasalidade no Português, assunto-foco deste trabalho.

2.1.5 A nasalidade no Português

No Português, a nasalidade pode ser percebida tanto nas vogais quanto nas consoantes. Tanto em um segmento quanto no outro, as características articulatórias são as mesmas: na produção dos sons, o véu palatino ou palato mole fica abaixado. Esse abaixamento provoca a saída do ar vindo dos pulmões tanto pela cavidade oral quanto pela nasal, o que causa ressonância nesta região.

Em se tratando das vogais nasais, segundo Seara, Nunes e Lazzarotto-Volcão (2015),

quanto maior a altura da língua na produção da vogal oral, menor é o esforço do aparelho fonador em abaixar o véu palatino. Logo, nas vogais altas, como [i] e [u] há um menor abaixamento do véu palatino nas vogais médias, [ê] e [ô], o abaixamento é mediano e na vogal baixa ã o véu palatino sofre o maior abaixamento.

Segundo a autora, a melhor forma de perceber a diferença de vogais orais e nasais é prestar atenção à altura e ao avanço/recuo da língua na produção de ambas as vogais. Esse procedimento pode colaborar para a aquisição da escrita do traço de nasalidade pelos alunos dos anos iniciais, por isso o professor deve compreender os aspectos articulatórios na produção dos segmentos sonoros da fala.

Em consonância com Silva (2002), podemos distinguir dois fenômenos diferentes a respeito do traço da nasalidade no Português: a nasalidade e a nasalização. Camara Jr. (1998) denomina esses processos por nasalidade fonética e nasalização fonológica.

A nasalidade fonética diz respeito ao processo pelo qual a articulação ou não da vogal oral demonstra a variação de dialeto, como nos exemplos *c[a]mareira* ou *c[ã]mareira*. Nesse caso, a nasalidade não faz distinguir palavras no Português, mas destaca a variação dialetal da nossa língua. Essa nasalidade acontece por assimilação regressiva, ou seja, um processo em que os segmentos sonoros tendem a ganhar os traços característicos de outro segmento anterior ao segmento que influencia dentro de um mesmo vocábulo. Então, podemos falar *c[â]mareira* porque a vogal *a* da sílaba *ca* começa sentir a nasalidade da consoante nasal *m* da sílaba *ma*. Nos textos escritos de alunos de anos iniciais, essa nasalidade não é representada, pensamos que a criança entende que a consoante da outra sílaba já a marca. É o que diz Camara Jr. (1998), “[...] o falante espontâneo não sente no segundo caso uma nasalidade que não é funcionalmente válida”. (CAMARA JR, 1998, p. 25).

A nasalização fonológica é a ocorrência de vogal nasal obrigatória, como nas palavras *pr[ã]nto* e *b[ê]nto*. Esse processo, em algumas palavras “causa diferença de significado: lá/lã; mito/minto; cadeia/candeia”. (SILVA, 2002, p. 93). Aqui, nos deteremos por alguns instantes para compreender o conceito de pares mínimos. Pares mínimos, conforme Seara, Nunes e Lazzarotto-Volcão (2015), “são duas sequências fônicas que se distinguem apenas por um som, como em ‘pato’ e ‘bato’”. (SEARA; NUNES; LAZZAROTTO-VOLCÃO, 2015, p.105).

A escrita da nasalidade no Português é de grande dificuldade para os alunos de séries iniciais, devido ao fato de a nasalidade poder ser marcada com as consoantes *m* e *n* pós-vocálico ou o uso de til nas vogais. Além desses casos, a nasalidade pode ser representada por ditongos nasais, como em *mãe* e *mamão*, ou ainda nos ditongos nasais em sílabas finais de

algumas formas verbais, como *vieram*, *fazem*, *foram*, *vão*, *estão* e *escreverão*. Nesses últimos casos, aspectos sobre a tonicidade da palavra são de grande importância.

Dependendo da fase de aquisição da escrita em que a criança se encontre, ela vai fazer as escolhas grafêmicas de forma diferente. Portanto, ela pode: i) não marcar a nasalidade, ocorrendo o apagamento, tornando a sílaba travada (fator de dificuldade nos anos iniciais de aquisição da escrita) em sílaba simples, ou seja, do molde CVC para CV, tornando palavra como *compra* em *copra*; ii) fazer a troca da consoante nasal, *n* por *m* ou vice-versa, devido ao seu pouco conhecimento sobre as regras fonológicas do *continuum* da palavra, seria o caso do registro *conpra* em vez de *compra*; iii) inserir uma consoante nasal como em *muinto* e *ingual*.

Na próxima seção tratamos de explicitar alguns processos fonológicos na tentativa de entender como a criança representa a nasalidade nos textos escritos.

2.1.6 Processos fonológicos: apagamento, inserção e troca

Os processos fonológicos são ajustes feitos pelo falante para emissão de alguma palavra quando esse falante ainda não tem todas as condições de emitir aquele determinado som do qual precisa fazer uso. Então são feitas mudanças fonológicas para tentar simplificar o modelo produzido pelo falante mais experiente. Segundo Othero (2015), os processos fonológicos são meios que as crianças encontraram de pronunciar algum determinado fonema de forma mais facilitada. A partir do momento em que a oralidade vira objeto de estudo e de conhecimento, abrem-se as possibilidades de reflexão, de análise e de ação sobre o desvio em questão. Percebe-se que esses processos se refletem na escrita nos anos iniciais da alfabetização e, se não trabalhados adequadamente, podem perdurar até o final do Ensino Médio de um estudante.

Os processos fonológicos ligados à nasalidade que serão abordados neste trabalho são:

- a. Apagamento da nasalidade: acontece quando a criança quer escrever, por exemplo, *brincar* e grafia “*bricar*”. Esse processo pode ter explicação no fato de que o aprendiz não compreendeu ainda que determinadas sílabas são grafadas por um número maior de grafemas que de fonemas, quando no caso do traço de nasalidade o som [ã] requer duas letras na sua representação *-an-*. (ZORZI, 2003, p.85).
- b. Troca de consoante nasal: esse processo fonológico ocorre em palavras em que há a nasalidade; a criança tem essa percepção, mas não consegue fazer a escolha adequada entre a

nasal bilabial [m] e a dental [n] que será utilizada em decorrência do segmento consonantal seguinte, por exemplo, encontramos *ponba* para a palavra *pomba*.

c. inserção de consoante nasal: é o caso da palavra *muito* que é escrita por muitas crianças como “*muinto*”. Nesse caso, o aprendiz, ainda pouco experiente em relação à escrita, pensa que ela seja a representação fiel da fala.

Nesta seção, tentamos trazer à discussão preceitos teóricos de grande valor para embasar nossa futura IP. Esperamos ter colaborado para o entendimento de teorias fonético-fonológicas em torno do traço de nasalidade presente em nossa língua e representada nos textos escritos. Na próxima seção, tratamos da Fonética e da Fonologia na alfabetização.

2.2 Fonética e Fonologia na Alfabetização

A Alfabetização nas escolas brasileiras ainda padece de diversos problemas de ordem política, física, econômica e cultural. Há muito tempo, as crianças brasileiras estão sujeitas a métodos antiquados e/ou a profissionais despreparados para a tarefa de tamanha importância. Vários autores se ocuparam em escrever sobre esse assunto, tais como Bisol (1974), Lemle (2000), Callou e Leite (2003), Bortoni (2006), entre outros. Todas essas autoras comungam da mesma opinião: ao lidar com os processos de aquisição da escrita, o professor precisa ter conhecimento científico suficiente para poder identificar a natureza dos processos fonológicos que o aprendiz apresenta em seus textos. Para isso, os cursos de formação de professor alfabetizador, os cursos de Pedagogia, por exemplo, precisam abranger a área da Fonética e da Fonologia. Bortoni (2006) refere-se a isso, pontuando que

[...] a aquisição da consciência fonológica tem de estar no fulcro da reflexão sobre os métodos de alfabetização adotados no país e sobre as teorias que lhes dão sustentação. Isso é de suma importância, porque, no Brasil, convivemos com um paradoxo: os cursos de letras, onde os alunos têm oportunidade de se familiarizar com o sistema fonológico do Português, não costumam dedicar-se à formação de alfabetizadores; seus currículos são voltados para o ensino da língua no ciclo final do Ensino Fundamental e Ensino Médio. Por sua vez, o Curso de Pedagogia e o Curso Normal Superior, embora assumam a responsabilidade da formação dos alfabetizadores, não incluem em seus currículos disciplinas de Linguística Descritiva que possam fornecer aos futuros alfabetizadores subsídios que lhes permitam desenvolver uma consciência linguística, ou, mais propriamente, uma consciência fonológica. (BORTONI, 2006, p. 207-208).

A autora enfatiza a necessidade de que o alfabetizador tenha subsídios teóricos para distinguir problemas de decodificação e a transferência de regras fonológicas do vernáculo da criança. O professor alfabetizador precisa mediar atividades em que os alunos consigam reconhecer a letra, perceber a estrutura das palavras por meio de um trabalho pedagógico

implícito ou explícito da área fônica. (BORTONI, 2006).

Bisol (1974), há mais de 40 anos, alertava sobre problemas que a criança enfrentaria no futuro se fosse exposta a “uma aquisição insegura”, pois, segundo ela, “[...] a alfabetização é o momento em que o aluno começa a visualizar o vocabulário de seu idioma” (p. 33). Se o professor tiver conhecimentos com base científica, poderá apoiar seu aluno nas dúvidas sobre como registrar sua fala, relacionando fonema e letra adequadamente.

Para a autora, saber ler é aperfeiçoar o conhecimento dos anos escolares iniciais, sabendo selecionar palavras e organizá-las de acordo com o sistema linguístico. Além disso, para ela, saber ler é ordenar os elementos de uma língua, seguindo as regras de combinação desses elementos. Essa tarefa é da escola, personificada no professor. Bisol (1974, p. 33) se mostra otimista, caso haja mudanças nas grades curriculares dos cursos que preparam alfabetizadores:

Não são raros os casos de crianças que só se alfabetizam depois de três ou quatro anos de escola. É provável que um atendimento científico desfizesse barreiras. Só o conhecimento exato do sistema da língua, ao lado do domínio das dificuldades que o alfabeto acarreta, poderão evitar os males que se estendem por anos ininterruptos causados, na maioria das vezes, nos primeiros anos escolares, por inábeis processos carentes de base linguística. Por certo, cursos de Fonética e Fonologia introduzidos na preparação do magistério primário, entre outros esclarecimentos, brotarão novos métodos de alfabetização, flexíveis e condizentes com a realidade de nosso povo.

Infelizmente, os problemas apontados há mais de 40 anos ainda persistem. O professor precisa fazer um trabalho consciente com base fonológica, que levará seu aluno, leitor principiante, a relacionar sons e letras e fazer o registro adequado quando escreve.

Além disso, o professor precisa atuar de maneira politicamente correta diante da tarefa de alfabetizar. Conforme Lemle (2000, p. 6):

É claro que, além dos conhecimentos básicos, o alfabetizador precisa de outros dons para se sair bem. Ele deve ter respeito pelos alunos, evitar o papel de cúmplice de um sistema interessado em manter esmagada uma grande parte do seu povo, confiar na capacidade de desenvolvimento dos alunos e ter criatividade, inventividade, iniciativa, combatividade e fé em sua capacidade de tomar este mundo melhor.

O professor é um ator muito importante no processo de alfabetização. É ele que pode ou não integrar o aluno no mundo da escrita e automaticamente na sociedade. Para que consiga fazer seu trabalho de forma proveitosa, ele precisa estar envolvido no processo político que permeia a alfabetização, lembrando que seu aluno é um cidadão que já participa das práticas sociais do seu país.

Bortoni (2006) expressa sua preocupação, ao mostrar dados estatísticos em que os

números de analfabetos são muito grandes, mesmo após aprovada a “Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional”, em 1996, que, em seu artigo 32, afirma ser o Ensino Fundamental obrigatório e gratuito, hoje ampliado de oito para nove anos nos sistemas estaduais e municipais de ensino. E novamente Bortoni (2006) propõe a utilização de base científica no trabalho do alfabetizador que precisa estar inteirado dos estudos que a Linguística oferece, a Fonética e a Fonologia, visto que

[...] pesquisadores da área de alfabetização, em muitos países de escrita alfabética, argumentam, enfaticamente, que o reconhecimento das palavras desempenha um papel central no desenvolvimento da habilidade de leitura. Aprender a reconhecer palavras é a principal tarefa do leitor principiante, e esse reconhecimento é mediado pela Fonologia. Por meio da decodificação fonológica, o aprendiz traduz sons em letras, quando lê, e faz o inverso, quando escreve. [...] Mas ressalve-se que, na fase inicial da aprendizagem da leitura, a competência essencial a ser desenvolvida é a decodificação de palavras, o que, por sua vez, implica um processamento fonológico. (BORTONI, 2006, p.204).

Apesar de não bastar que o leitor principiante saiba somente conhecer as palavras, é a partir disso que ele consegue alcançar outros conhecimentos linguísticos, como sintático, semântico e pragmático-cultural, ou seja, é preciso que ele domine o reconhecimento das palavras para que depois ele consiga fazer uso da escrita no seu dia a dia, nas práticas sociais em que está inserido.

A Fonética e a Fonologia na alfabetização são ferramentas seguras e viáveis para que professores alfabetizadores possam desempenhar bem o seu papel em sala de aula. Por isso, na próxima seção, tratamos de aspectos da consciência fonológica que podem colaborar para o trabalho do professor alfabetizador.

2.3 Consciência Fonológica e Alfabetização

Concomitantemente com os estudos fonéticos e fonológicos, as pesquisas sobre consciência fonológica podem contribuir de várias maneiras para a reflexão acerca da alfabetização e, com isso, serem buscados outros caminhos para alcançar o sucesso nessa tarefa.

Vários estudiosos descrevem consciência fonológica, tais como Signorini (1998), que diz que consciência fonológica ou metafonologia é o conhecimento que o sujeito tem sobre seus próprios processos e produtos cognitivos. Já de acordo com Scliar-Cabral (2003), a consciência fonológica vem da capacidade de o ser humano de se debruçar sobre a linguagem de forma consciente, fazendo a reflexão sobre os sons da fala e a organização das palavras.

Em Moraes (1990), encontramos que se deve considerar a consciência fonológica como a habilidade para executar operações mentais sobre a fala, de forma a permitir o julgamento e a manipulação da estrutura sonora das palavras.

Logo, se uma criança consegue observar a estrutura da palavra, reconhecer rimas (presença de sons iguais no final da palavra) e aliterações (presença de sons semelhantes no início da palavra), e que os fonemas são “peças manipuláveis” com as quais se pode criar palavras, pode-se dizer que essa criança tem desenvolvida a consciência fonológica.

Moraes e Leite (2005) desenvolveram pesquisas acerca das habilidades fonológicas de uma aluna e constataram que uma criança pode ter desenvolvido as suas habilidades fonológicas e mesmo assim não conseguir expressar-se de forma escrita. Todavia, os autores comprovaram que nenhuma criança conseguiu alcançar uma hipótese silábica sem conseguir, por exemplo, contar as sílabas de palavras. Segundo os autores supracitados, as crianças que leem com facilidade são as mesmas que apresentam facilidade para identificar sílabas iniciais iguais ou que rimam. Para isso, segundo Moojen (2003, p. 11):

A consciência fonológica envolve o reconhecimento pelo indivíduo de que as palavras são formadas por diferentes sons que podem ser manipulados, abrangendo não só a capacidade de reflexão (constatar e comparar), mas também a de operação com fonemas, sílabas, rimas e aliterações (contar, segmentar, unir, adicionar, suprimir, substituir e transpor).

O conceito de consciência fonológica é importantíssimo para os estudos sobre alfabetização, portanto, os profissionais da área, pedagogos principalmente, precisam apoderar-se disso para que esses estudos se reflitam nos resultados alcançados pelos alunos. Adams (2006, p. 17) ressalta que

Os educadores que ensinam consciência fonológica descobriram que, fazendo isso, aceleram o crescimento de toda turma em termos de leitura e de escrita, ao mesmo tempo em que reduzem a incidência de crianças com atraso na leitura. Além disso, perceberam que, prestando atenção à consciência fonológica das crianças, tiram a fônica do campo do treinamento puro, tornando-a mais fácil de ser aprendida e mais interessante para os alunos.

Para que consigamos colocar em prática atividades que desenvolvam a consciência fonológica das crianças, faz-se necessário conhecer os três níveis da consciência fonológica: o silábico, o intrassilábico e o fonêmico. O nível das sílabas corresponde ao potencial de as palavras serem divididas em sílabas. O nível das unidades intrassilábicas corresponde ao potencial de a sílaba se dividir em seus constituintes internos, ou seja, ataque e rima. E, por último, o nível dos fonemas, que é a capacidade da palavra de se dividir em unidades de som sem carga de significação. O Quadro 5 apresenta esses níveis.

Quadro 5 -Níveis da consciência fonológica

Nível das sílabas	can-ti-nho
Nível das unidades intrassilábicas	Na sílaba “can” de cantinho: Ataque: c Rima: na
Nível dos fonemas	c – a – n – t – i – n – h – o c-ã-t-i-ɲ-o

Fonte: Adaptado de Freitas (2004, p.13).

Segundo Alves (2012), a criança com consciência fonológica no nível da sílaba é capaz de

[...] contar o número de sílabas de uma palavra, inverter a ordem de sílabas na palavra, adicionar sílabas, excluir sílabas, juntar sílabas isoladas para formar uma palavra, segmentar em sílabas as palavras e fornecer palavras a partir de uma sílaba dada. (ALVES, 2012, p.34).

Da mesma forma, o autor explica que saber apontar aliterações e sílabas que rimam é um indicativo de que a criança apresenta consciência no nível intrassilábico. E uma criança com nível fonêmico, de acordo com Alves (2012), consegue

[...] segmentar uma palavra nos diversos sons que a compõem; juntar sons separados, isolados, de modo a formar uma palavra; identificar e enumerar palavras que acabam ou terminam com o mesmo som de uma palavra; e excluir sons de uma palavra para formar outras palavras existentes na língua. (ALVES, 2012, p. 39).

Esse mesmo autor (2006, p. 19) salienta que sem o trabalho atento do professor, a consciência fonêmica pode passar despercebida de “[...] 25% dos estudantes de primeira série do Ensino Fundamental de classe média e uma quantidade consideravelmente maior daqueles com origens menos ricas em termos de letramento”.

Para o trabalho do professor-alfabetizador, os níveis de consciência fonológica têm grande importância, haja vista que ler e escrever requerem do aluno a propriedade de esmiuçar e/ou montar uma nova palavra, ou seja, a consciência fonológica, em nível maior ou menor, já precisa fazer parte do universo do aprendiz. Segundo Freitas (2004), a consciência fonológica leva à aquisição da escrita que, por sua vez, colabora para o aumento da primeira.

Após a exposição sobre os três níveis da consciência fonológica, na próxima seção, damos destaque a uma ramificação da consciência fonêmica, a consciência fonoarticulatória.

2.4 Consciência fonoarticulatória

A consciência fonoarticulatória é parte integrante da consciência fonológica e está no nível do fonema, sendo esse nível o que requer maior empenho e dedicação por parte do professor e dos alunos. Segundo Santos (2012)

Quando se fala em consciência fonoarticulatória (CFA) faz-se referência à habilidade de distinguir os diferentes pontos de articulação dos segmentos sonoros, isto é, perceber que os sons são modificados de acordo com a posição dos seus articuladores. Consciência fonoarticulatória, portanto, [...] é a capacidade de o indivíduo refletir sobre os sons e gestos motores orais. Essa capacidade é importante não somente na produção e na percepção dos sons, mas na aprendizagem do sistema de escrita alfabético. (SANTOS, 2012, p. 60 e 61).

Uma criança consegue facilmente fazer a identificação de que uma palavra é composta por sílabas, bastando que fale a palavra bem devagar. Para a divisão fonêmica, a dinâmica não é a mesma. É preciso que essa criança já esteja no processo de pré-alfabetização para que ela consiga identificar essas partes menores da palavra. Nesse período, o aprendiz vai começar a pensar sobre os sons, o que não fazia antes. Normalmente, a criança, ao aprender a falar, não pensa sobre os aspectos fisiológicos que requisitou para elaborar sua fala. Posteriormente, ela vai relacionar os sons aos grafemas, ou seja, entender que cada som que emitimos na fala será representado por um símbolo/letra.

A consciência fonoarticulatória pode colaborar para que essa identificação seja menos abstrata para a criança. Por exemplo, ao se trabalhar a apresentação das vogais, as características articulatórias desses segmentos devem ser esclarecidas para a criança, logo, é importante que ela saiba que a posição dos lábios e da língua determina qual vogal estamos pronunciando. Então, com lábios não-arredondados e língua central e baixa, produziremos a vogal *a*, o que é diferente de produzirmos a vogal *e* [*ε*], em que temos os lábios não-arredondados e língua na posição anterior da boca. Essas atitudes simples tornam a sala de aula um lugar de “conhecimento metafonológico”, como se refere Queiroba, Zorzi e Garcia (2015, p. 36). E por menos experiente que seja o aprendiz, aos poucos ele se acostuma com os termos e começa a fazer generalizações dessas observações, passando a analisar outros sons com os mesmos princípios utilizados anteriormente.

Proporcionar ao aprendiz momentos para pensar sobre a fala e, ao mesmo tempo, relacioná-la aos movimentos articulatórios requisitados, leva-o a perceber como a fala é produzida e isso influenciará a aprendizagem da escrita. Então, o professor precisa lançar mão de atividades em que o aprendiz consiga refletir sobre a relação entre fonema/grafema a fim de que faça a construção e desconstrução da complexidade do sistema alfabético. Quando o aprendiz entender que há um número restrito de fonemas e grafemas, e que se vão

combinando para formar uma infinidade de palavras, ele terá em suas mãos o segredo da codificação e da decodificação, processos basilares da alfabetização.

2.5 Aportes teóricos para a metodologia

Abordamos, nesta seção, a relação da aquisição da linguagem escrita com pressupostos teóricos vigotskianos acerca dos conceitos de desenvolvimento, aprendizagem, mediação, instrumentos de mediação e zona de desenvolvimento proximal. Ainda são abordadas as concepções de escrita segundo Oliveira (2005) e as fases da hipótese de escrita das crianças, conforme Ferreiro e Teberosky (1985).

Para Vigotsky (2007), o homem é um ser histórico e se desenvolve no meio social. Logo, para agir, precisa de instrumentos, físicos ou abstratos, chamados símbolos. Esses instrumentos são essenciais para o contato com o meio e, por eles, o indivíduo se desenvolve. Para o autor, a criança desenvolve da função psicológica elementar para a função psicológica superior. Isso quer dizer que, na fase da infância, a criança é conduzida pelas situações vividas e pelas pessoas que convivem com ela. E posteriormente, a função psicológica superior se desenvolve e ela começa a se direcionar por si mesma.

Em função disso, a partir do sociointeracionismo, defende-se que o homem evolui de um ser biológico para um ser histórico, portanto, Vigotsky (2007) não concebe que a evolução seja apenas biológica, mas também cultural, haja vista que o indivíduo é o resultado produzido ao longo dos anos de existência do ser social.

Pensemos na seguinte situação: uma criança está em uma sala, sozinha e avista uma tomada elétrica. Em um primeiro momento, ela, levada pela sua curiosidade instintiva, vai à tomada, coloca o dedo, leva um choque e começa a chorar devido à dor. Em um segundo momento, a criança é interrompida pela cuidadora, sua mãe ou babá, que a impede de colocar o dedo na tomada. Ou ainda, ela é interrompida pela lembrança da dor sentida anteriormente, em que colocou o dedo na tomada e levou um choque. As situações apresentadas são diferentes, pois, no primeiro momento, a criança não conhecia aquele objeto. Nesse caso, não havia nenhum tipo de mediação, pois era o primeiro contato da criança com a tomada. No segundo momento, a relação da criança com a tomada foi mediada, ou pela mãe que a interrompeu, ou pela lembrança da situação vivenciada.

Logo, percebemos que o indivíduo se desenvolve a partir das interações com as pessoas ou objetos, sejam eles físicos ou abstratos. De acordo com Vigotsky (2007), o indivíduo precisa de um conhecimento anterior cognitivamente relacionado para assimilar e

entender o novo aprendizado. Podemos dizer que, se o indivíduo vivencia um episódio de dor associada ao ato de tocar com o dedo a tomada, provavelmente ele não repetirá a ação, pois o aprendizado anterior lhe deu base para entender e evitar mais um momento de desconforto. Assim, para Vigotsky (2007), caminha a humanidade, seu desenvolvimento nunca é do zero e a mediação colabora para o prosseguimento contínuo dessa evolução.

Tendo essa base como ponto de partida, o desenvolvimento e a aprendizagem humanos compreendem dois níveis. O primeiro é o nível de desenvolvimento real, que reúne o conjunto de atividades que a criança consegue realizar sozinha. Esse nível compreende as funções psicológicas que já estão cristalizadas até o momento. O segundo nível, chamado desenvolvimento potencial, compreende as atividades que a criança ainda não consegue realizar sozinha, mas, com a mediação adequada, ou de um adulto ou de um objeto, vai conseguir realizar. À relação desses dois níveis de desenvolvimento, o real e o potencial, Vigotsky (2007) dá o nome de Zona de Desenvolvimento Proximal (ZDP), ou seja, a distância entre o que o aprendiz sabe e aquilo que ele saberá no futuro, caso entre em contato com os mediadores adequados. Segundo o autor, o que o aprendiz faz com a mediação de objetos ou de outro indivíduo mais experiente, no futuro, vai conseguir fazer sozinho, porque a aprendizagem adquirida na interação com o mediador vai proporcionar ao aprendiz uma “bagagem” que fez com que sua capacidade real aumentasse, possibilitando alcançar a capacidade potencial.

Por exemplo, para a aquisição da fala, o bebê, primeiro, balbucia e aos poucos, consegue falar, graças à ação de mediadores, no caso, o cuidador. Essa habilidade da criança usada para se comunicar mostra que ela é um ser simbolista, ou seja, busca instrumentos para representar seu pensamento. Segundo Vigotsky (2007), a sensação, o desejo, o sentimento, a vontade, o envolvimento, a fala, os gestos, o brincar, o desenho e o jogo são simbolismos de primeira ordem. Após essa fase, a criança descobre que pode desenhar também a fala por meio da escrita. Segundo o mencionado autor, a passagem da escrita pictográfica para a ideográfica se dá justamente a partir dessa fase do desenvolvimento da criança, em que ela precisa

[...] fazer uma descoberta básica - a de que se pode desenhar, além de coisas, também a fala. Foi essa descoberta, e somente ela, que levou a humanidade ao brilhante método da escrita por letras e frases; a mesma descoberta conduz as crianças à escrita literal. Do ponto de vista pedagógico, essa transição deve ser propiciada pelo deslocamento da atividade da criança do desenhar coisas para o desenhar a fala. (VIGOTSKY, 2007, p.140).

Logo que a criança percebe que consegue entender o mundo ideográfico ao seu redor

e se expressar por meio da escrita, começa uma nova etapa do seu desenvolvimento. Nesse momento, a escrita deixa de ser um símbolo de segunda ordem e passa a ser de primeira ordem, porque o aprendiz começa a iniciar seu desenvolvimento em um novo código, a linguagem escrita.

Posto isso, é importante pensarmos sobre como a criança aprende a escrita, uma das modalidades de exercício de uma língua. Nesse sentido, apresentamos, a seguir, a concepção de aprendizagem de escrita que nos orienta neste trabalho.

Para Oliveira (2005), entre as muitas propostas teóricas para a aprendizagem da escrita, ele aborda as três mais relevantes: i) transferência de um produto; ii) processo de construção de conhecimento baseado nas características da própria escrita; iii) processo de construção de conhecimento intermediado pela oralidade.

Na primeira concepção, o conhecimento é considerado pronto e acabado e basta que o professor o repasse para o aluno. O aprendizado é alcançado por ele por meio de canais exteriores, por exemplo, o professor, os livros, as técnicas. E o discente usa de sua memória para absorver e incorporar o conteúdo ensinado, promovendo-se entre os anos ou etapas do currículo pela avaliação do professor e pelo alcance uma nota, que demonstrará se conseguiu realmente aprender o mínimo necessário para essa promoção. Oliveira (2005) ressalta que essa concepção apresenta problemas sobre o que seja aprender a escrever, pois, ao entender que a criança adquire a escrita por meio de cópias exaustivas, o professor subestima a inteligência dela, esquece que seus alunos são capazes de raciocinar, de generalizar e de fazer inferências, de criar modelos e regras, de interagir com a representação da fala: a escrita. As dúvidas na escrita são comuns, até mesmo para os mais experientes; entretanto, contar apenas com a memorização do aprendiz é tratar a criança como se ela não soubesse a língua que está aprendendo.

A segunda concepção de aprendizagem da escrita, de acordo com Oliveira (2005), propõe que esse aprendizado aconteça por meio das características da própria escrita, na qual o iniciante vai fazer várias tentativas baseadas na observação da língua e em suas hipóteses a respeito do que ela é. Essa concepção está ligada diretamente ao construtivismo, que postula que a criança pode construir seu conhecimento por meio da observação do meio linguístico em que está inserida, formular hipóteses, errar e reformular suas hipóteses. Apesar de encontrarmos na segunda concepção características superiores à primeira, segundo Oliveira (2005), ela não explica todas as possibilidades de escrita que o aprendiz iniciante apresenta. Logo, percebe-se que se o aluno tem contato com a escrita sem o intermédio de um adulto já proficiente, ele não vai grafar somente o que ele “lê” nos materiais disponíveis. É importante

frisar que essa concepção é bem melhor que a primeira, mas limita a ideia de aprendizagem da escrita por meio somente do contato com os materiais. Todavia, a criança não escreve somente o que “lê” nos materiais gráficos em que observa a língua, mas também registra o que ouve no meio em que vive. Daí a fragilidade dessa concepção.

Na terceira concepção de aprendizagem da escrita, conforme Oliveira (2005), o aprendizado é controlado pelo aprendiz, mas intermediado pela oralidade. O autor considera, então, que o aprendiz controla seu aprendizado por meio de formulação e reformulação das hipóteses sobre essa representação da língua, na interação com o objeto escrito e que essa interação é intermediada pela oralidade, haja vista que o aprendiz é um falante da língua em estudo e já apresenta o conhecimento linguístico internalizado. Nesse ponto, essa concepção se encontra com os estudos de Vigotsky e fortalece as bases teóricas deste trabalho.

Ainda segundo Oliveira (2005), aprende-se por meio de esquemas mentais inatos, interage-se com o objeto de aprendizado, formulam-se hipóteses, que são baseadas no Conhecimento Linguístico Internalizado, conjunto de conhecimentos advindos da experiência oral da língua. E de acordo com o contato com a língua escrita, a influência da língua falada vai diminuindo.

Para o autor, quanto maior o tempo em que o aprendiz está no processo de aquisição da escrita, mais ela se aprimora, pois, mesmo partindo da língua falada, o aprendiz vai conseguindo assimilar o código da língua escrita. Oliveira (2005) afirma que a criança pratica dois tipos de controle sobre a língua: o controle qualitativo e o quantitativo:

O controle qualitativo pode ser formulado assim: *sons iguais são representados por letras iguais; sons diferentes são representados por letras diferentes*. Note-se que a escolha das letras a serem utilizadas não tem que ser a mesma para todos os aprendizes. Por exemplo, para o som [s], um aprendiz pode escolher a letra ' s ' enquanto um outro aprendiz pode escolher a letra ' c '. Já o controle quantitativo pode ser formulado assim: *o número de letras utilizadas corresponde ao número de sons pronunciados*. Assim, se uma palavra como hoje tem apenas três sons (uma vez que o ' h ' inicial não tem correspondência sonora), é perfeitamente natural que o aprendiz, em suas primeiras produções escritas, grafe a palavra como 'oji' (ou 'ogi'). (OLIVEIRA, 2005, p.19).

Pode-se perceber que o aprendiz estabelece relação da fala com a escrita e isso mostra que ele constrói seu conhecimento por meio de hipóteses, que foram organizadas e chamadas por Ferreiro e Teberosky (1985) de níveis de hipótese da escrita.

De acordo com as autoras, os níveis de hipóteses da escrita compreendem quatro fases, a saber: i) nível pré-silábico, quando a criança ainda não entende que a escrita representa a fala, por isso usa desenhos ou outros sinais gráficos para representar uma palavra, que só pode ser lida por ela própria; ii) nível silábico, quando a criança já entende que os sons

da fala podem ser representados por letras, entende a divisão da palavras em sílabas, masela pode ser grafada com apenas uma letra com ou sem valor sonoro; iii) nível silábico-alfabético, no qual a criança consegue grafar sílabas completas ou parciais; iv) nível alfabético, momento em que a criança já tem condições de perceber os fonemas da sílaba e de compreender a correspondência fonema/grafema.

Nesta seção, descrevemos pressupostos teóricos quemostam-nos que a criança chega à escola com muitos saberes e, por meio de diagnósticos, o professor precisa inteirar-se do nível de escrita em que seus alunos estão, para buscar as intervenções pedagógicas mais eficientes para cada caso. Na próxima seção veremos como os PCNs e os jogos puderam nos auxiliar na elaboração da IP.

2.6 Os PCNs e os jogos no fazer pedagógico

O professor deve-se orientar pelos Parâmetros Curriculares Nacionais (PCNs) de Língua Portuguesa a fim de alinhar o seu fazer pedagógico com as exigências dos sistemas educacionais brasileiros. E nesses PCNs, encontram-se algumas críticas às antigas práticas de correção textual em sala de aula, tais como “...atividades de identificação, correção de palavra errada, seguidas de cópia e de enfadonhos exercícios de preenchimento de lacunas”. (BRASIL, 1998, p. 85). Percebe-se, pois, que há uma proposta para o trabalho com os processos fonológicos, vinda do documento orientador e que não é praticadapela maioria dos professores. Nessa proposta, o professor deve estar preparado para desenvolver nosalunos habilidades, tais como:

- identificar e analisar as interferências da fala na escrita, principalmente em contextos de sílabas que fogem ao padrão consoante/vogal;
- explorar ativamente um *corpus* de palavras, para explicitar as regularidades ortográficas no que se refere às regras contextuais;
- explorar ativamente um *corpus* de palavras, para descobrir as regularidades de natureza morfossintática, que, por serem recorrentes, apresentam alto grau de generalização. Em vez de sobrecarregar o aluno com pesada metalinguagem (radical, vogal temática, desinências, afixos), deve-se insistir no uso do paradigma morfossintático para a construção de regularidades ortográficas;
- apoiar-se no conhecimento morfológico para resolver questões de natureza ortográfica;
- analisar as restrições impostas pelo contexto e, em caso de dúvida entre as possibilidades de preenchimento, adotar procedimentos de consulta. (BRASIL, 1998, p. 86).

Para que o professor consiga colocar em prática essa proposta, os sistemas educacionais precisam incentivar sua formação continuada, de formaque, assim, os alunos

recebam um ensino de maior qualidade, fruto de novas pesquisas, que contribuam para o melhor resultado em seus textos escritos.

Infelizmente, os cursos de Pedagogia não têm as disciplinas de Fonética e Fonologia, as quais só serão conhecidas pelo professor que se dedicar à formação continuada, principalmente aquelas que lhe proporcione ferramentas para a elaboração de intervenções pedagógicas adequadas aos problemas advindos dos textos de seus alunos.

Pensando nessas ferramentas, o uso de jogos pedagógicos é uma opção para dinamizar as aulas de Língua Portuguesa. Segundo Piaget (1978), o conhecimento da criança vem do contato físico com os objetos, devido à sua dificuldade de abstrair significados de meras explicações. Por meio dos jogos pedagógicos em sala de aula, os alunos desenvolvem habilidades, como a atitude e a iniciativa própria. Além de proporcionar divertimento e brincadeiras, no jogo, a criança precisa elaborar planejamento de ação e soluções para os desafios. É uma atividade que proporciona prazer e desenvolvimento cognitivo.

Com o uso dos jogos em sala de aula, o professor consegue tornar suas aulas mais atrativas e dinâmicas, pois o envolvimento no jogo traz mais alegria para as crianças e esse diferencial torna o aprendizado mais efetivo. Tudo isso, de forma sistematizada e constante nos planejamentos dos discentes pode melhorar o desempenho dos alunos nas atividades de sala de aula, bem como nas avaliações externas a que as escolas são submetidas.

Vigotsky (2007) diz que, no jogo, a criança consegue aprender sobre autocontrole, pois, a cada passo, ela vivencia o conflito da escolha entre o que ela quer fazer e o que permite a regra. No entanto, ela entende que o cumprimento da regra pode levá-la ao prêmio, então

[...] age de maneira contrária à que gostaria de agir. O maior autocontrole da criança ocorre na situação de brinquedo. Ela mostra o máximo de força de vontade quando renuncia a uma atração imediata do jogo (como, por exemplo, uma bala que, pelas regras, é proibido comer, uma vez que se trata de algo não comestível). Comumente, uma criança, experiencia subordinação a regras ao renunciar a algo que quer, mas, aqui, a subordinação a uma regra e a renúncia de agir sob impulsos imediatos são os meios de atingir o prazer máximo. (VIGOTSKY, 2007, p. 117).

Fica evidente quão grande é o aprendizado em uma situação como a explicada anteriormente. É dessas aulas desafiantes que nossas crianças estão precisando para manter acesa a chama do aprender. Lamprecht (2012) reforça a importância de se combinar brincadeiras e som:

Na nossa perspectiva, adotamos um posicionamento de que a prática de 'brincadeira com sons' nada mais é do que um poderoso instrumento de apoio e um eficiente facilitador para o método que cada profissional adota[...]. (LAMPRECHT, 2012,

p.17).

Adams (2006) oferece uma enorme gama de sugestões de jogos para ajudar na consciência fonológica, para tanto orienta que “[...] é importante trabalhar com os jogos regularmente e retomar cada um com frequência, até que tenha sido dominado e possa ser ampliado” (p.23). A autora ainda ressalta que os jogos devem estar inseridos nos planejamentos dos professores todos os dias, por no mínimo quinze minutos. Outra questão importantíssima abordada pela autora é a questão da manutenção da autoestima das crianças, para isso “[...] deve-se tomar muito cuidado com a forma como as atividades são apresentadas, de modo que nenhuma criança se sinta fracassada ou impaciente” (p. 32).

Neste capítulo, apresentamos a fundamentação teórica que nos deu sustentação nesse trabalho; no próximo capítulo tratamos da descrição do processo metodológico do trabalho.

3 METODOLOGIA

Neste capítulo, apresentamos a operacionalidade do trabalho, começando pela exposição do contexto e dos participantes da pesquisa, seção em que caracterizamos a escola em que foi realizada a pesquisa e também os participantes envolvidos. Logo após, expomos a forma de coleta de dados, sua classificação e a seleção dos dados. E finalmente, discutimos sobre os procedimentos para a montagem da IP.

3.1 Contexto e participantes da pesquisa

O local escolhido para desenvolver a pesquisa e aplicação da IP foi uma escola municipal da periferia da cidade de Trindade-GO, onde aconteceram todas as etapas da investigação. Nesta escola, as quatro professoras envolvidas têm a graduação em Pedagogia.

Por envolver seres humanos, submetemos nossa pesquisa ao Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia, do qual recebemos autorização para sua realização, por meio do Parecer Consubstanciado CAAE: 59470315.0.0000.5152.

Os participantes da pesquisa são os alunos dos quarto e quinto anos, total de 96 estudantes, dos quais 46 são do sexo masculino e 50 do feminino, na faixa etária de nove e quatorze anos, (nos quartos anos, a idade varia entre nove e quatorze anos e nos quintos, entre dez e doze anos). Esses alunos estavam alocados nas turmas 4º A, 4º B, 5º A e 5º B, as quais, doravante serão referidas, respectivamente, como turmas A, B, C e D. Esses alunos são, na sua maioria, de classe baixa e alguns pertencentes à classe média baixa. Em reunião marcada pela direção, os pais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ver anexo 1).

Na próxima seção, apresentamos como executamos a coleta, a seleção e a classificação de dados.

3.2 Coleta, seleção e classificação de dados

A presente pesquisa tem caráter quali-quantitativo, posto que por meio da listagem e contagem de dados do *corpus* inicial, procuramos entender a causa para a ocorrência de desvios na escrita de palavras com nasalidade, mostrando como e por que os casos de desvios acontecem. Com essa atitude investigativa, conseguimos entender, interpretar os dados e buscar soluções para os problemas identificados em sala de aula. Dessa forma, a pesquisa se faz presente nas várias etapas do trabalho.

Após o consentimento dos pais, os dados foram selecionados por meio de três propostas de produção de textos narrativos (ver anexos 2, 3 e 4), nas quais não há a identificação dos alunos, pois cada participante recebeu um código.

Nos meses de março e abril deste ano de 2016, os 96 alunos participaram de três aulas de produção textual, com, aproximadamente, 50 minutos cada, em suas próprias salas de aula, nas quais recolhemos o *corpus* inicial da pesquisa. Ao final dessa etapa, somaram 269 textos escritos e recolhidos pela pesquisadora.

A seleção dos dados se deu por meio da leitura dessas 269 produções de texto, das quais fizemos o levantamento das palavras em que ocorriam desvios de escrita relacionados à nasalidade. Os dados foram classificados em três grupos: i) apagamento da nasalidade; ii) troca da nasalidade; iii) inserção da nasalidade. Os dados podem estar disponíveis nos quadros 6, 7 e 8:

a. apagamento da nasalidade:

Quadro 6 - Amostra de palavras com apagamento da nasalidade

REGISTRO CONVENCIONAL	REGISTRO NÃO CONVENCIONAL
Acampada	“...Eu fiquei acapadan ...”
Acertaram	“... i os mennos asertaru nofaso...”
Acontecer (acontece, aconteceu)	“... tudo bem isso acotesse ...” “... mais no final acoteceu dudo denovo...” “... porque a coteseu aquilo...”
André	“ Adre juto a bola...”
Assim	“...E assieles foram brinca...” “... Assique cheguei...”
Bagunça	“...Não faz baguça ...”
Balanço	“...Foi brincar no balaso ...” “...eu no balaso ...” “...eu fui no balaso ...” “...No balaço etabém no escorregador...” “...Brincar no balaso ...”
Bastante	“...Brinquei bastate com um amigo...”
Brigando	“... Brigado com a mamãe...” “...Só fica brigado comigo...”

Brincar	"...meninas foram bricar ..." "...ele gostava de bricar ..." "...foram ao parque para bricar ..." "La em casa Bricar comigo..." "...Fo ibricar no balanço..." "...Queremos bricar ..."
Brincando	"2 meninos estava bricado ..." "... Bricado ate tarde..." "... eles set incertiu muito bincado ..."
Brincaram	"...eles bricaram ..."
Bombeiro	"...chamou o bobeiro ..." "...Mandou chamar o bobeiro ..." "...o bobeiro chegou..." "O bobeiro pegou o gato..." "Chamar o bobeiro ..." "Um bobeiro que estava passando..." "O bonbeiro resgatou o gato..." "Era uma vez um bobeiro ..."
Cansado	"Estamos casado e com fome..."
Caindo	"E uvaso foi caído e caido ate que tidu foipoxo..."
Comprar	"...juntarão dieiro pracopra outro..." "...vamos copra um vaso..."
Compraram	"... e copraram um novo vaso..."
Correndo	"...o gato estava coredo ..." "...foi corredo para casa..."
Conseguiu	"...mas eles coçigueu arrumar o vaso" "... e pedo não coseguio paga bola..."
Conta	"... e o João não deu cota ..."
Contar (contou)	"... i ele cotou pra mãe..." "... cota pamia mãe..."
Contaram	"... mais eles cotaram para sua mãe..."
Correndo	"... eles sairão coredo ..." "...foi corredo para casa..."
Criança	"Um criaça fala..." "...era quatro criaca ..."
Derepente	"... derrepete o cachorro caiu..."
Diferente	"Ela é diferete ..."
Encontrou	"...um dia ele emcontro ..."

Embora	“Ele foi ebora ...” “Foi tomar sorvete e foi ibora ...” “Foie ibora ...”
Então	“... estava jogado etão o nariano jogo...”
Fazendo	“...o que você estaf asedo ai...”
Gente	“Leva a gete para passear...”
Importante	“Mãe você é importate para mim...”
Indo	“Queria ter ido ...” “... ido para o parque...”
Inspira	“...é uma coisa que me ispira ...”
Inteligente	“Pessoa educada e eteligete ...”
Irritante	“Minha irmã é muito irritate ...”
Joaquim	“... dirverdino Andre mais o Joaqui ...” “... o vaso da mãe do joaqui ...”
Jogando	“Era uma vez dois amigos que estava jogado bola...” “O jose estava jogado muito fote...” “... os meninos es tavaj acodo bola i a cabou...” “Era uma vez dois menino jogado bola...” “o Antonio e o lucas estavam jogado Bola...”
Lembraram	“...eles lebraram ...”
Linda	“...uma floresta linda...”
Limpar	“... mas vocês tei que lipa...”
Limparam	“...eles liparame fingiu que não aconteceu...”
Miado	“...um gato miado ...”
Mim	“Melhor pai para mi ...”
Mundo	“Foi o maior mico do mudo ...” “Todom udo ficou feliz...” “...e todo mudo ficou feliz...”
Nem	“... que eles nei qeria...”
Nunca	“ Nuca me deixou de lado...”

Pensado	“... fico pessado pessado pessado pessado ...”
Pensou	“... e eles pesou e ficou...”
Pergunta	“ Pergutase estou bein...”
Plantas	“... que tinha muitas platas e flores...”
Predeu	“...ele se predeu na arvore...”
Quando	“... quadoo passarinho apareceu...”
Quintal	“Fiquei no quital ...”
Quando	“De vez em quado vou para minha madrinha...”
Segundo	“O segudo lugar...”
Seguinte	“...no dia seguite ...”
Sempre	“Elase pre me escuta...”
Também	“...estou cansada, eu tambe ...” “Nobalaço etabém no escorregador...” “...o meu amigo tanbe ...” “ Tabemé muito chato...” “Eutabém fui para casa...”
Tem	“... mas vocês tei que lipa...”
Tranquilo	“Fiquetraquilo...”
Trindade	“Festa de Tridade ...”
Vem	“... veieu vou te ajudar...”

Fonte: *Corpus* desta pesquisa (2016).

b. troca de consoante nasal

Quadro 7 - Amostra de palavras troca da consoante nasal

	REGISTRO NÃO CONVENCIONAL
Aprendeu	“Ele já apremdeua andar...”
Bem	“Pergutase estou bein ...” “...o gato estava ben longe ...”
Bombeiro	“...quatro meninas chamaram o bonbeiro ...” “...ligar para o bonbeiro ...” “...chamou o bonbeiro ...” “...o bonbeiro e o gato...” “...o bonbeiro e o gato...” “O bãobeiro resgatou o gato...” “Chamou o bonbeiro ...” “O bonbeiro salvou o gato...” “...o bonbeiro e o gato...”
Brincar	“...eles foram brimcar no parque...” “...eles foram brimcar no parque...”
Com	“... eles ficarão con um frie na bariga...” “... e lucas facaram conmedo ...”
Conseguiram	“...nao comseguiram descer...”
Conseguiu	“... so que não comseguiu ...”
Contar	“... i a gora vam comta ...” “...nos vamos comta ...”
Contente	“Ficou feliz e cotemte ...”
Conversa	“... e comversa sempre...”
Desempatar	“...fez par adesenpatar ...”
Divertindo	“...eles divertimdo ...”
Em	“... comprar um vaso novo en 90 dias...”
Embora	“... podem ir enbora viu.” “...eles falaram e foram enbora ...” “...foram enbora para casa...” “...ele foi enbora ...” “...vamos enbora ...” “...eles foram enbora ...” “Fomos inbora ...”
Encontrar	“Espero emcontrar você...”
Enquanto	“... emquanto Helena estava brincando...”
Então	“... emtão foram jogar bola...” “...e emtao fomos embora...” “... emtao passou algumas horas...”

	“... emta ele abaixou...”
Fingiram	“... eles fingiran que nada aconteceu e fim.”
Iam	“... que todo dia ião ate um lugar...”
Inteiro	“...a tarde emteira ...”
Irmã	“João e uma irman ...” “Um airman chamada Gabrielle...”
Jogando	“Era uma vez dois irmãos jogando bola...” “O menino estava jogãoto bola...” “...dois amigos estavam jogando ...”
Lembrança	“...guardar na lenbranca ...”
Limparam	“... o Mikaam linparantude ...”
Ninguém	“Quase ninguem para brincar...”
Nunca	“... uma peia que eles numca mas jogaram...”
Pensando	“... ele ficou parados pensamdo ...”
Presente	“Me deu um presente ...”
Quando	“...jogando futebol quamdo ...” “... jogado bola é comdo ele jogou...”
Sempre	“... os dois senpre estavam jogando...” “...as crianças senpre ia la...”
Também	“...o menino ficou animado e o gatinho tanbem ...” “A mamãe tanbém ...”
Tão	“O clube era TAM legal...”
Tempo	“... passo tenpo e o finho converso...”
Tentou	“... temtou descer...”
Uma	“... era un veis um menino...”

Fonte: *Corpus* desta pesquisa (2016).

c. inserção de consoante nasal:

Quadro 8 - Amostra de palavras com inserção da consoante nasal

REGISTRO CONVENCIONAL	REGISTRO NÃO CONVENCIONAL
Aconteceu	“... eles fingiran que nada aconteceu e fim.”
Educado	“... ele era enducado ...”
Idêntica	“...a planta estava indentica a que quebraram...”
Igual	“... e o vaso ingual e fim.”
Ideia	“Tive uma indeia ...”
Muito	“... porque ala não gostava muinto dese vaso...” “...ele estava muinto feliz...”
Tentaram	“... e eles tentantaram ...”

Fonte: *Corpus* desta pesquisa (2016).

Evidenciaram-se nesse *corpus* inicial os processos fonológicos apagamento e troca de consoante nasal, assim como inserção da consoante nasal. Apesar disso, percebemos que alguns alunos não escreveram muitas palavras com nasalidade. Para que isso não ocorresse nas produções iniciais e finais da IP, o que poderia inviabilizar as análises comparativas, optamos por selecionar do *corpus* inicial onze substantivos nomeados por palavras com nasalidade que deveriam estar obrigatoriamente nos textos.

Além disso, esse *corpus* inicial colaborou para o início de uma lista de pares mínimos de nasalidade, a qual possibilitou a elaboração dos jogos pedagógicos “Memória Nasal” e “Bingo da Nasalidade”.

Na próxima seção apresentamos os procedimentos de elaboração da IP.

3.3 Procedimentos de elaboração da intervenção pedagógica

A IP que passamos a descrever foi pautada nos pressupostos teóricos vigotskianos. Para contemplar isso, assumimos atitude colaborativa de mediação aliada aos objetos e jogos pedagógicos aplicados, a fim de levar o aluno a construir seu próprio conhecimento que, de acordo com Vigotsky (2007), pode ser construído por meio de atividades relacionadas ao brinquedo e aos jogos. A escolha metodológica faz toda a diferença em salas de aula do Ensino Fundamental, porque, por meio dos jogos, o professor consegue levar a criança a descobrir “[...] habilidades durante as situações de brinquedo”. (VIGOTSKY, 2007, p. 144).

Nossas aulas e jogos foram elaborados após análise dos dados do *corpus* inicial elencado na seção anterior, do qual retiramos palavras das próprias produções textuais dos alunos para elaborar as atividades da IP.

As aulas teóricas sobre vogais, consoantes e sílabas foram planejadas a fim de dar um suporte teórico de Fonética e Fonologia aos alunos, pois o método de alfabetização da escola não contemplava essa abordagem. Para isso, optamos por trabalhar com espelho e o alfabeto móvel, objetos que nos puderam auxiliar na observação da articulação dos fonemas, assim como na construção e na desconstrução de palavras.

As atividades desenvolvidas para esta pesquisa têm como mola propulsora a ludicidade. Ela propicia aos alunos momentos de aprendizagem prazerosa, todavia sem perder o foco no objetivo. Sobre isso, Luckesi (1998) explica

Em síntese, sou muito tentado a dizer que o que caracteriza uma atividade lúdica é a “plenitude da experiência” que ela propicia a quem a pratica. É uma atividade onde o sujeito entrega-se a experiência sem restrições, de qualquer tipo, especialmente as mentais, que, usualmente, tem por base juízos pré-concebidos sobre as coisas e práticas humanas. (LUCKESI, 1998, p. 10).

A ludicidade permeou as atividades em sala de aula por meio de músicas e de jogos. A música relaxa as crianças e deixa o ambiente preparado para o aprendizado. Com os jogos, conseguimos provocar envolvimento emocional dos alunos e a interação entre eles. Por meio dos jogos, as crianças aprenderam sobre a Língua Portuguesa, a conviver com o outro, e ainda, a lidar com seus próprios sentimentos.

Organizamos dois grupos de palavras que foram utilizadas nos jogos: i) lista de palavras retiradas das produções de texto iniciais dos alunos; e ii) lista de pares mínimos exposta no Quadro 9:

Quadro 9 - Lista de pares mínimos - nasalidade

abas/ambas	cota/conta	mete/mente	saca/sanca
ajo/anjo	dó/dom	mito/minto	seda/senda
ata/anta	fica/finca	mudo/mundo	seta/senta
atenas/antenas	fraco/franco	nu/num	se/sem
baba/bamba	fuga/funga	paca/panca	si/sim
baco/banco	grade/grande	papa/pampa	sobra/sombra
boba/bomba	juta/junta	pesa/pensa	tato/tanto
cadeia/candeia	lebre/lembre	popa/pompa	tapa/tampa
caído/caindo	Leda/lenda	pote/ponte	traça/trança
capo/campo	lida/linda	prato/pranto	troco/tronco
casa/cansa	lipo/limpo	que/quem	tuba/tumba
cata/canta	lobo/lombo	Quinca/quica	vê/vem
cato/canto	mata/manta	rapa/rampa	veto/vento
cito/cinto	mato/manto	ri/rim	vi/vim

Fonte: Autora (2016).

Usamos essa lista de pares mínimos para elaborarmos os jogos “Memória Nasal” e o “Bingo da Nasalidade”. E a lista de palavras retiradas do *corpus* inicial, mostrado nos Quadros 6, 7 e 8 da seção anterior, compôs as atividades de produções textuais e o jogo “Baralho de Sílabas”.

As músicas “O sapo não lava o pé” e “Pombinha Branca” compuseram uma aula teórica e um caça-palavras.

Durante toda a aplicação da IP, registramos os conceitos aprendidos na Lista de Constatação, cartazes afixados na sala, os quais serviam para a retomada e a conclusão de cada aula.

Dessa forma, apresentamos a metodologia do nosso trabalho com o intuito de esclarecer aos professores como foi a construção da nossa metodologia. A seguir, apresentamos nossa IP com os devidos comentários da sua aplicação.

4 INTERVENÇÃO PEDAGÓGICA (IP)

O presente capítulo objetiva descrever a IP e sua aplicação nas turmas de quarto e quinto anos de uma escola pública da periferia da cidade de Trindade-GO.

A IP que vamos explicitar neste capítulo foi aplicada nas turmas A, B e D, e não é a mesma que propusemos na turma C. Nesta turma foi aplicada uma proposta-piloto de intervenção. O motivo de a intervenção não ser a mesma foi a nossa necessidade de colocá-la em prática para que pudéssemos fazer os ajustes para a aplicação nas outras turmas. Então, na turma C, a aplicação foi condensada em quatro dias de aula, na qual apresentava as seguintes situações, a saber: i) a aplicação das aulas teóricas ainda estava um tanto abstrata; ii) não foi possível usar as aulas com o alfabeto móvel; iii) o Baralho de Sílabas não continha as palavras do atual. Apesar disso, consideramos os resultados alcançados, mesmo em condições não favoráveis para o sucesso dos alunos, que mostraram avanços comprovados no próximo capítulo.

Nossa IP é composta de quatro etapas, perfazendo um total de quatorze aulas:

- **1ª Etapa:** Produção de texto Inicial (PI) - duas aulas de 50 minutos;
- **2ª Etapa:** Análise fonético-fonológica das vogais da Língua Portuguesa - cinco aulas de 50 minutos;
- **3ª Etapa:** Análise fonético-fonológica das consoantes, dos fonemas e da sílaba da Língua Portuguesa - cinco aulas de 50 minutos;
- **4ª Etapa:** Produção de texto Final (PF) - duas aulas de 50 minutos.

As etapas estão organizadas de forma que podemos ter as informações gerais, tais como: nome, objetivos, conhecimento prévio do aluno e recursos necessários para execução das atividades. As aulas são identificadas por meio de numeração, nome, duração, objetivos, metodologia e avaliação.

Este capítulo foi organizado de forma que é possível ler a aplicação detalhada e logo em seguida a atividade planejada com seus tópicos: etapa, atividade, objetivos, metodologia e avaliação. A primeira etapa da IP foi a produção inicial de um texto narrativo, feito a partir de figuras nomeadas por palavras com a presença de vogais nasais (*carpinteiro, pomba, enxada, limpeza, bombeiro, cachimbo, tambor, cantor, banda, sombra e tampa*). A proposta foi a seguinte: as crianças foram divididas em grupos de onze alunos, cada uma recebeu uma figura e eles inventaram, oralmente e diante da turma, uma história maluca.

Nossa proposta tentou dar espaço à imaginação das crianças, fazendo com que tivessem um momento lúdico para alegrar a atividade, descontraír os alunos e contribuir para

um bom rendimento na produção escrita. A participação na primeira parte desta atividade foi ótima, pois quase todos os alunos se ofereceram para criar parte da história.

Apesar disso, foi notável a falta de criatividade para a elaboração de cada parte, haja vista a dificuldade deles em continuar a ideia do outro colega, o que, às vezes, não acontecia mesmo. Em várias ocasiões, tivemos que dar um suporte grande para a continuidade da atividade. Segundo Alencar e Fleith (2003), o ser humano cria barreiras para o desenvolvimento da criatividade e o professor pode criar condições, dentro de sala de aula, para que o aluno a desenvolva, por exemplo, com atividades como a citada acima. Na aplicação dessa atividade, os alunos ficaram à vontade e participaram com muita alegria. Era esse clima que gostaríamos para as nossas aulas, tentando deixar as crianças felizes e predispostas a aprender os conteúdos ministrados.

Após esse momento, os alunos passaram a escrever sua própria história maluca, esforçando-se para que as onze palavras-alvo aparecessem no texto. Nessa primeira etapa, enfrentamos um problema sério que há na escola: há muitos alunos faltosos. Devido a isso, foi necessária a aplicação da produção inicial por quatro dias até que pelo menos 90% dos alunos tivessem participado da atividade. A figura 14 apresenta a atividade proposta.

Figura 14 - Atividade proposta na primeira etapa da IP

Disciplina: Língua Portuguesa

Ano/série: 4º e 5º anos do Ensino Fundamental

1ª Etapa: Produção de texto Inicial (PI)

Objetivos da etapa (para o professor):

- Aplicar uma produção textual inicial.
- Tabular as ocorrências dos processos fonológicos.
- Analisar os processos fonológicos encontrados nas produções escritas dos alunos.

Conhecimento prévio do aluno:

Conhecer as características do texto narrativo.

Recursos necessários para a etapa:

- dois ou três envelopes contendo as fichas com as imagens de tambor, limpeza, pomba, cachimbo, banda, enxada, cantor, tampa, sombra, bombeiro, carpinteiro;
- folha sulfite pautada para produção escrita.

1ª Etapa - Atividade 1 e 2: “HISTÓRIA MALUCA”

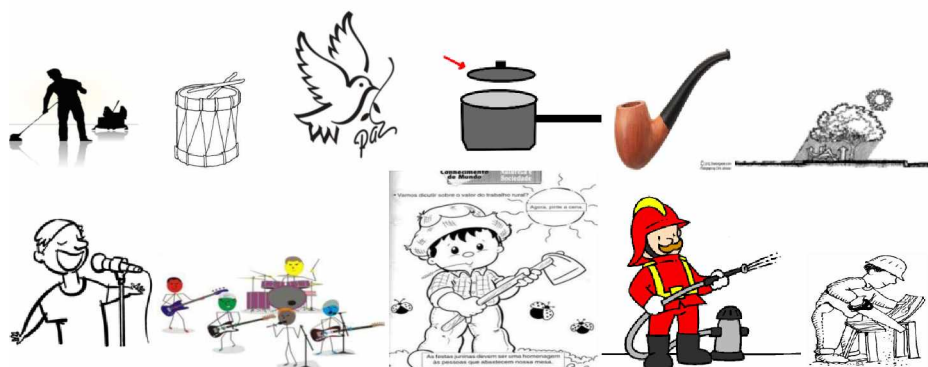
Duração: 2 aulas de 50 minutos

Objetivos (para o aluno):

- Produzir oralmente um texto narrativo.
- Produzir um texto narrativo escrito.

Metodologia:

1. Organizar os alunos em um círculo.
2. Entregar a cada um dos alunos uma das fichas com as figuras abaixo.
3. Cada aluno falará em voz alta o nome da figura que receber (tambor, limpeza, pomba, cachimbo, banda, enxada, cantor, tampa, sombra, bombeiro, carpinteiro).



4. Juntos e oralmente, os alunos devem elaborar uma história maluca, na qual cada aluno deve citar o nome da figura que receber. Como são 11 figuras, a roda continua até que todos os alunos tenham participado da atividade.

5. Solicitar aos alunos a produção escrita de uma das histórias malucas contadas.

Fonte: Autora (2016).

Para a segunda etapa, decidimos trabalhar aulas teóricas sobre as vogais orais e nasais juntamente com jogos educativos. Começamos a aula explicando o porquê de estarmos ali e qual seria nosso objetivo. Falamos sobre a necessidade de pesquisarmos textos escritos de alunos de Ensino Fundamental e criamos tarefas embasadas em teorias estudadas no curso para ajudar as crianças a melhorar alguns aspectos da escrita. Os alunos ficaram surpresos em saber que a pesquisadora ainda estuda e que ainda tem que fazer um trabalho para entregar ao professor dela.

No primeiro momento, pedimos que cantássemos a música *O sapo não lava o pé* e os alunos, tanto dos quartos quanto dos quintos anos pediram para fechar a porta para não *pagarem mico*. Dissemos que a intenção não era cantarmos alto e forte, mas, sim, observar o formato da nossa boca em cada vogal utilizada na letra. Logo após, perguntamos sobre os órgãos que usamos para produzir os sons e, um a um, fomos listando-os no quadro:

Quadro 10 - Órgãos do aparelho fonador listados com os alunos durante a aula.

Pulmões, boca, língua, céu da boca, nariz, lábios, dentes e cordas vocais.
--

Fonte: Autora (2016).

Cada sala formou listas bem parecidas, diferenciando somente alguns órgãos como diafragma e laringe, por exemplo, o que não era um ponto de preocupação se esses órgãos não constassem nela porque o foco da observação era o formato da boca e posição da língua na produção das vogais.

Em todas as turmas em que a intervenção foi aplicada, percebemos a satisfação da maioria das crianças em participar, então sempre era preciso organizar o momento para cada criança falar.

O momento de entrega dos espelhos foi empolgante para as meninas, que ficaram muito entusiasmadas para usá-los. No decorrer das atividades com espelho, vez ou outra era preciso pedir que se concentrassem na execução dos comandos da professora, pois o espelho também se tornou um fator de desatenção. Apesar disso, consideramos válido o uso deste instrumento nas aulas, pois as descobertas feitas tornaram o processo da fala mais concreto para as crianças.

Pedimos para que observassem o formato de suas bocas ao pronunciar as vogais. Optamos por apresentar as vogais na seguinte ordem: a – é – ê – i – ó – ô – u, pois entendemos que poderíamos observar o formato da boca em um quase fechamento gradual, e assim, facilitar o entendimento das crianças.

Depois, pedimos que observassem, com o espelho ou não, a posição da língua. Dessa vez, a ordem para as vogais foi da mais anterior para a mais posterior: i – é – ê – a – ó – ô – u. As crianças foram orientadas para observar que a língua poderia assumir três posições: anterior (que elas chamaram de “*pra frente*”), central (no meio da boca) e posterior (na parte mais atrás da boca). No geral, as crianças não apresentaram dificuldade nesse entendimento.

Antes de começar a observação no espelho, e que foi feita a pergunta: *Nós falamos todas as vogais com o mesmo movimento de boca, lábios e língua?* Muitas crianças responderam que era o mesmo formato da boca e que a língua ficava no mesmo lugar. Após, as observações, fizemos novamente a mesma pergunta e elas notaram que cada vogal apresenta características distintas, umas mais, outras menos, mas que são diferentes.

Para a conclusão, elencamos na Lista de Constatações, os três tópicos aprendidos na aula, aproveitando também para fazer o resumo dela:

- Para falar, usamos: pulmões, laringe, boca, nariz, dentes, língua, lábios, queixo, céu da boca.
- Os lábios podem ficar abertos ou fechados.
- A língua pode ficar para frente, no meio ou para trás.

A Figura 15 apresenta a atividade proposta para a segunda etapa da IP.

Figura 15 - Atividade 1 da segunda etapa da IP

2ª Etapa: Análise fonético-fonológica das vogais da Língua Portuguesa**Objetivos da etapa (para o professor):**

Levar o aluno a

- Refletir sobre os aspectos articulatórios na produção de vogais orais e nasais.
- Relacionar os fonemas nasais com seus respectivos grafemas.
- Identificar pares mínimos com a presença ou não de nasalidade.

Conhecimentos prévios do aluno:

Nível de leitura alfabética.

Recursos necessários para a etapa:

- Quadro-giz.
- Cartolina e pincel para Lista de Constatações.
- Espelhos para cada aluno.
- Textos e caça-palavras impressos.
- Jogo de Memória da Nasalidade (ver anexo 5).
- Lista de conferência das palavras, fichas com os pares mínimos e cartelas do Bingo da Nasalidade impressos em papel sulfite (ver anexo 6).

2ª Etapa – Atividade 1: “O SAPO NÃO LAVA O PÉ”

Duração: 1 aula de 50 minutos.

Objetivo(para o aluno):

- Refletir sobre os aspectos articulatórios na produção de vogais orais.

Metodologia:

1. Explicar o objetivo da aula.
 2. Perguntar aos alunos:
 - a. Quais partes do nosso corpo usamos para falar?
 - b. Vocês já prestaram atenção nos movimentos que fazemos quando falamos os sons das vogais? Vamos observar? Nós falamos todas as vogais com o mesmo movimento de boca, lábios e língua?
 3. Pronunciar de forma alongada cada uma das vogais e pedir aos alunos que observem no espelho.
 - a. Vocês perceberam as modificações ocorridas na boca? Como ficou o formato da nossa boca para cada som?
 4. Pronunciar, novamente, de forma alongada cada uma das vogais e pedir aos alunos que observem no espelho e expliquem como fica a boca.
 - d. Qual posição da língua na produção das vogais?
- Pronunciar, novamente, de forma alongada cada uma das vogais e pedir aos alunos que observem no espelho e expliquem como é a posição da língua em cada uma das vogais.
3. Registrar as conclusões, as quais do grupo na cartolina da Lista de Constatações.

Avaliação: Por meio da participação e produção dos sons vocálicos.

Fonte: Autora (2016).

A atividade 2 da segunda etapa seguiu os mesmos padrões da atividade 1, no entanto, a discussão girou em torno das vogais nasais e os órgãos responsáveis pela nasalidade: palato mole, nariz e cavidade nasal.

Antes de começarmos no novo assunto, fizemos a retomada da aula anterior. Esse procedimento já é uma rotina no nosso cotidiano de sala de aula. No entanto, após conviver alguns dias com as turmas participantes, foi fácil perceber que alunos faltosos eram uma constante na escola. E para que essas faltas não repercutissem no resultado da IP, optamos por retomar toda Lista de Constatações em todo início de aula.

Após a entrega dos espelhos, listamos as sete vogais orais no quadro e explicamos que as vogais nasais são apenas cinco porque as vogais fechadas *ẽ* e *õ* não têm as suas correspondentes nasais. Fomos anotando, no quadro, as vogais nasais e suas possibilidades de grafia. No momento dessa explicação, pedimos que produzissem as vogais nasais de forma contínua e colocassem a ponta do dedo no nariz, acima das fossas nasais. Muitos alunos manifestaram a percepção da vibração da cavidade nasal e ficaram surpresos por isso, inclusive disseram sentir uma vibração tamanha que sentiram cócegas no céu da boca. Destacamos que a produção delas depende da movimentação do palato mole, parte do céu da boca que se estiver abaixado, tapa a passagem do ar para a boca, levando o ar para a cavidade nasal. Já esse termo foi muito bem entendido quando falamos sobre um espaço que temos na região acima da boca, onde o ar passa e provoca uma vibração. Notaram também a modificação do formato na boca, uma vez que, para produzir as vogais nasais, a boca sofre uma pequena diminuição do formato comparado com sua forma quando pronunciamos as vogais orais.

Nesse momento, os espelhos foram recolhidos e passamos para a leitura do poema “*As árvores*”, autor desconhecido, conforme consta na Figura 17, a seguir.

Depois, pedimos aos alunos que encontrassem todas as palavras formadas por alguma vogal nasal. Essa tarefa não foi difícil e a lista ficou assim:

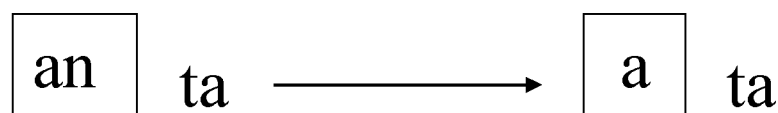
purificam	encantam	fazem
acolhem	campo	sombra
vêm	embelezam	são
cantar	crianças	tão

Alguns alunos também citaram palavras como: desconhecido, amigas, passarinhos, nelas, bonitas. Aproveitamos o surgimento dessas palavras para ressaltar que a nasalidade não é uma característica só das vogais, mas também das consoantes, mas a lista devia conter apenas as palavras com vogais nasais. Os alunos que as citaram foram elogiados, porque conseguiram perceber o traço de nasalidade em outros contextos, não trabalhados nessa aula. Essa atitude do professor provocou reações muito positivas nas crianças, ao contrário de se sentirem ofendidas, elas se sentiram colaboradoras do processo de ensino.

Outra explicação dada aos alunos foi sobre a diferença fonética entre vogais e consoantes, sendo vogal o som produzido sem o impedimento da saída do ar por ação dos articuladores, o que acontece quando o som é consonantal. Os alunos não demonstraram grande entendimento dessa questão, pensamos que por isso, futuramente seria preciso um trabalho com foco no assunto.

O exercício seguinte pedia que os alunos identificassem no texto palavras que poderiam formar pares mínimos em relação ao traço de nasalidade. Para explicar que a mudança de vogal oral para a nasal ou vice-versa pode, em algumas palavras, fazer com que essa se transforme em outra palavra, usamos como exemplo abaixo:

Figura 16 - Diagrama exemplo de par mínimo distintivo apresentado aos alunos



Fonte: Autora (2016).

A partir da proposta de desafio, os alunos descobriram que as palavras *vêm, cantar, sombra e campo* se transformam nas palavras *vê, catar, sobra e capo*, quando trocamos as vogais nasais por orais. Para facilitar o entendimento dessas palavras, montamos frases, fazendo com que os alunos compreendessem o significado delas.

Para concluir, registramos na Lista de Constatações as conclusões do grupo.

- As vogais podem ser orais e nasais. Na produção das vogais orais, o ar passa pela boca e nas nasais o som sai pelo nariz, provocando uma vibração na cavidade nasal.
- Por meio da percepção visual, podemos observar a articulação da boca, lábios, língua e movimentação no pescoço quando produzimos vogais nasais.
- A troca de vogais nasais por orais, ou vice-versa, pode transformar uma palavra em outra.

Figura 17 - Atividade 2 da segunda etapa da IP

2ª Etapa- Atividade 2: “AS ÁRVORES”**Duração:** 1 aula de 50 minutos**Objetivo (para o aluno):**

- Refletir sobre os aspectos articulatórios na produção de vogais nasais.
- Diferenciar vogais orais das vogais nasais.
- Identificar pares mínimos em relação ao traço de nasalidade.

Metodologia:

1. Entregar xerocado aos alunos o poema abaixo:

*As árvores**(Autor desconhecido)**As árvores são amigas**Purificam o ar**Acolhem os passarinhos**Que nelas vêm cantar.**Encantam os campos**Embelezam as estrelas**São amigas das crianças**Fazem sombra nas praças.**Elas são tão bonitas.**Elas são tão amigas.*

2. Quais são as palavras em que encontramos vogais nasais?

3. Par mínimo são “duas sequências fônicas que se distinguem apenas por um som.” (SEARA, NUNES, LAZZAROTTO-VOLCÃO 2015, p.105). Encontrem as quatro palavras, que quando trocamos a vogal nasal pela oral, transformamos em uma nova palavra.

Avaliação: Por meio da produção das vogais nasais e identificação de pares mínimos.

Fonte: Autora (2016).

A atividade descrita na Figura 17, assim como está proposta, não foi aplicada na turma C, essa foi uma das que resolvemos modificar para que os alunos tivessem uma melhor interação com o conteúdo. A nossa intenção foi deixar a aula mais desafiante para o aluno, pedindo aos alunos que encontrassem as palavras com vogais nasais, o que não foi contemplado na versão anterior. Nas outras turmas, A, B e D, com a atividade remodelada, a participação foi ótima e todos queriam participar, escolher uma nova palavra, muitos ficando até empolgados em comprovarem o acerto com o aval da professora.

Dando continuidade, ministramos a atividade 3, em que os alunos teriam que ler poemas, reescrever palavras e resolver um caça-palavras. De início, foi feita a leitura dos dois poemas “Pombinha branca” e “Tanta tinta”, de Cecília Meireles.

A leitura coletiva foi bem aceita pelas crianças. No entanto, na leitura do primeiro poema, por exemplo, no verso *Lavado roupa pro casamento*, elas liam *lavando roupa pro casamento*. O que pareceu ficar evidente foi que como já conheciam o poema, liam com a nasalidade.

A leitura do segundo poema trouxe um pouco de dificuldade para as crianças, pois gerou dúvida de como teriam que ler essas palavras sem a nasalidade, já que da forma como estavam escritas no texto não existiam na nossa língua. Superadas as dificuldades e descoberta a lista de palavras que teriam que encontrar, os alunos fizeram a reescrita delas e passaram a procurá-las no caça-palavras. Essa parte da atividade gerou muita euforia das crianças a cada palavra encontrada.

A atividade com caça-palavra integrou nossa IP por se tratar de um jogo conhecido e muito usado em sala de aula. Entretanto, acrescentou poucos saberes que pudessem colaborar para a reflexão da nasalidade. Entendemos que, se tivéssemos utilizado um poema só e menos conhecido, poderíamos ter possibilitado maior reflexão ao trabalho do aluno.

Figura 18 - Atividade 3 da segunda etapa da IP

2ª Etapa - Atividade 3: “DIGITADOR MALUQUETE”**Duração:** 1 aula de 50 minutos.**Objetivo (para o aluno):**

- Identificar palavras com vogais orais e transformá-las em nasais.

Metodologia:

1. Retomar a Lista de Constatações das aulas anteriores, revisando tópicos aprendidos.

2. Entregar atividade xerocada aos alunos:

Leia os dois poemas abaixo. Eles estão meio malucos porque um digitador maluquete trocou as vogais nasais pelas orais formando palavras que não existem. Pode? Encontre essas palavras, reescreva-as e encontre-as no caça-palavras.

POMBINHA BRANCA

Domínio Público

Pombinha branca, o que está fazendo?
Lavado roupa pro casamento.
 Vou me lavar, vou me secar,
 Vou me trocar, vou pra janela pra namorar.
 Passou um moço, de terno branco
 Chapéu de lado, meu namorado.
 Mandei entrar, mandei **setar**,
 Cuspiu no chão...
Lipa aí, seu porcalhão!
 Tenha mais educação!

TANTA TINTA

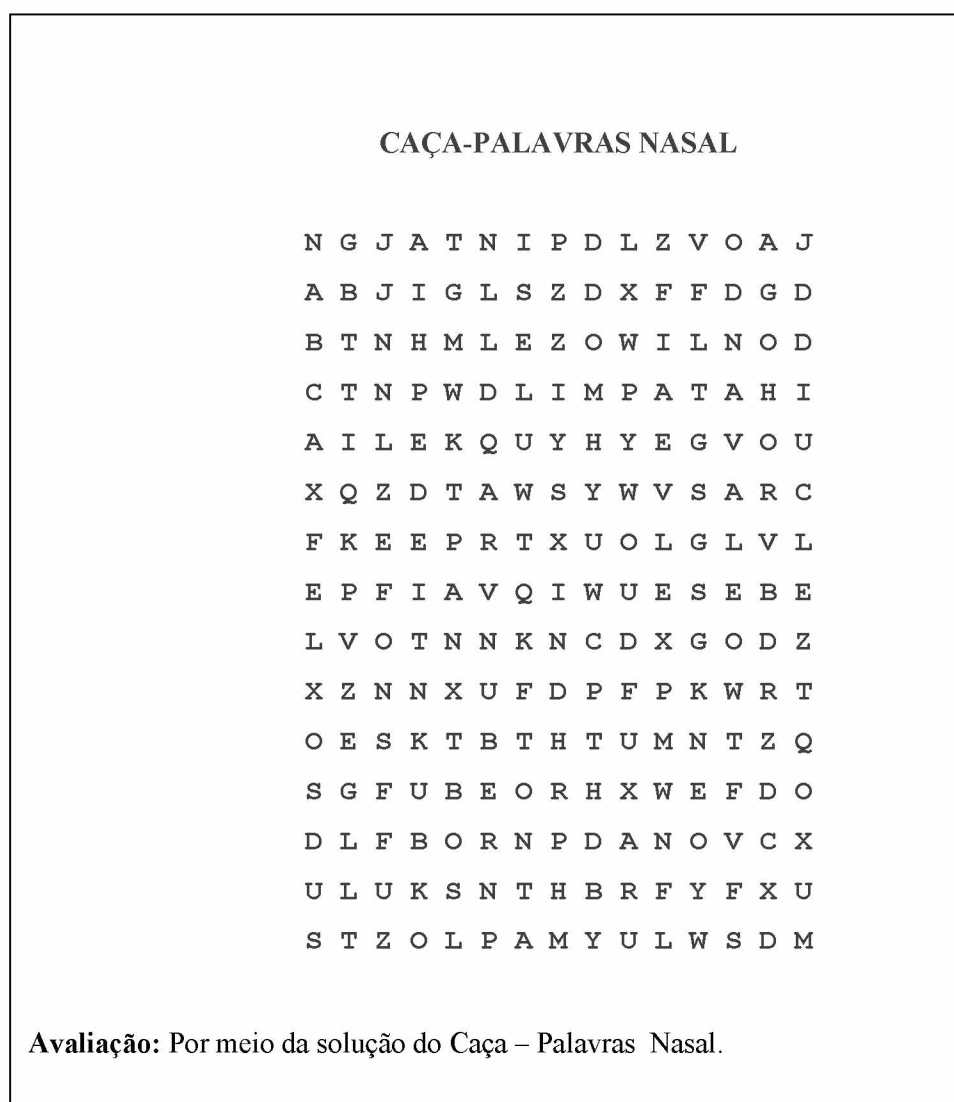
Cecília Meireles.

(Ou Isto ou Aquilo – Editora Nova Fronteira – Rio de Janeiro, 1990)

Ah! Menina **tota**.
 Toda suja de **tita**
 mal o sol desponta!
 (sentou-se na **pote**,
 muito desatenta...
 e agora se espanta:
 quem é que a **potepita**
 com tanta tinta?...)
 A ponte aponta
 e se desaponta.
 A tontinha **teta**
 limpar a tinta,
 ponto por ponto
 e pinta por pinta...
 Ah! A menina tonta!
 Não viu a tinta na ponte.

Fonte: Autora (2016).

Figura 19 - Caça-palavras nasal



Fonte: Autora (2016).

Para a atividade 4, elencamos 56 pares mínimos com relação ao traço de nasalidade para compor um jogo de memória. Ele foi confeccionado com plaquinhas de MDF (placa de madeira com 4mm de espessura), onde foram coladas as palavras selecionadas. Cada jogo apresentava oito pares e havia jogo suficiente para trabalharmos em duplas. Para organizar as duplas, decidimos colocar crianças com níveis diferentes de dificuldade percebidos na produção inicial.

Nossa proposta inicial era a seguinte: primeiro cada criança lia suas palavras para professora depois iniciaria as rodadas do jogo. Como ficaram muito ansiosas para começar a jogar, tivemos que modificar a estratégia citada. Então, todos começaram a jogar e íamos passando em cada grupo para ouvir a leitura das palavras feita pela criança. Uma infeliz constatação foi a de que percebemos que algumas crianças ainda não conseguiam fazer a

leitura, (segundo nosso levantamento, 9,3% dos alunos ainda não estavam alfabetizados no período da aplicação da IP) e isso foi estarrecedor já que estávamos aplicando a intervenção em turmas de quartos e quintos anos.

A aplicação da atividade foi muito satisfatória, pois as crianças adoraram o jogo de Memória Nasal, haja vista a grande aceitação traduzida em comentários elogiosos à aula e pedidos de repetirmos a atividade.

Figura 20 - Atividade 4 da segunda etapa da IP – Memória nasal

2ª Etapa - Atividade 4: “MEMÓRIA NASAL”

Duração: 1 aula de 50 minutos.

Objetivo (para o aluno):

- Identificar pares mínimos com traço nasal.

Metodologia: Retomar a Lista de Constatações das aulas anteriores, revisando tópicos aprendidos. Logo após, professor organiza a turma em duplas e entrega o Jogo de Memória Nasal (ver anexo 5). Primeiro, o professor pede ao aluno que leia os pares que recebeu, depois comece a jogar. As duplas jogam três partidas. O vencedor é a criança que conseguir fazer mais pares.

Avaliação:

Por meio da participação no jogo e leitura dos pares mínimos com traço nasal.

Fonte: Autora (2016).

Figura 21 - Memória nasal com pares mínimos



Fonte: Autora (2016).

Para fechar a segunda etapa, levamos para as salas de aplicação um jogo de Bingo da Nasalidade (ver anexo 6). Essa atividade foi muito agradável de ser executada e os alunos também demonstraram muita satisfação em participar. O bingo foi aplicado na turma C antes de ser aplicado nas demais salas, e isso foi decisivo para o sucesso da aplicação nessas turmas, já que tivemos tempo para aperfeiçoá-lo. No entanto, toda a aplicação colaborou para que pensássemos em melhorias para o jogo, principalmente no que diz respeito às peças utilizadas para sortear as palavras, pois as sucessivas aplicações do jogo suscitaram a necessidade de adequações em sua estrutura. Portanto, a confecção do jogo demandou a construção de uma caixa rasa em que estão escritas as palavras do jogo, divididas nas letras do bingo, para que a cada palavra sorteada, ela fosse colocada no seu devido lugar, assim como o recipiente em que ficam as palavras, também foi aprimorado para facilitar a utilização pelo professor.

O bingo é um jogo que envolve os participantes, pois todos querem ganhar o prêmio, pensamos então que, aliado ao processo de ensino-aprendizagem, esse jogo consiste em uma ferramenta motivadora da aprendizagem e suas variações podem trazer resultados ainda mais positivos às atividades de sala de aula.

Durante a execução do jogo, pudemos utilizar a palavra em uma frase para incitar no aluno o desejo de adivinhar qual foi sorteada, por exemplo, quando sortearmos a palavra prato, falamos: *Na hora do almoço, coloco minha comida no...* E as crianças completaram: *prato*. Essa hora também foi propícia para a explicação do significado de algumas palavras não conhecidas, como *senda* par de *seda*, entre outras.

Figura 22 - Atividade 5 da segunda etapa da IP

2ª Etapa - Atividade 5: “BINGO!”

Duração: 1 aula de 50 minutos.

Objetivo (para o aluno):

- Identificar pares mínimos com traço nasal.

Metodologia: O professor prepara as palavras em fichas e coloca numa caixa, assim como imprime as cartelas do Bingo da Nasalidade (ver anexo 6). Depois, distribui as cartelas para os alunos. O professor tira uma palavra do saco e lê. O sorteio se dá até que alguém preencha toda a cartela, o popular, “cartela cheia”. Os alunos vão marcando as palavras que tiverem na sua cartela. Vence quem preencher toda a cartela.

Avaliação: Por meio da participação no jogo do Bingo da Nasalidade.

Figura 23 - Modelo de cartela do Bingo da Nasalidade

B	I	N	G	O
CAPO	DOM	LOMBO	PANCA	VENTO
ATA	DÓ	MENTE	QUEM	TRANÇA
CANDEIA	CASA		SEDA	SOBRA
ANTA	JUNTA	MUNDO	POTE	TAMPA
BACO	FICA	MANTO	PRATO	TRONCO

Fonte: Autora (2016)

Para a terceira etapa, selecionamos o estudo das consoantes e da sílaba do Português devido à importância desses tópicos para o entendimento da representação da nasalidade.

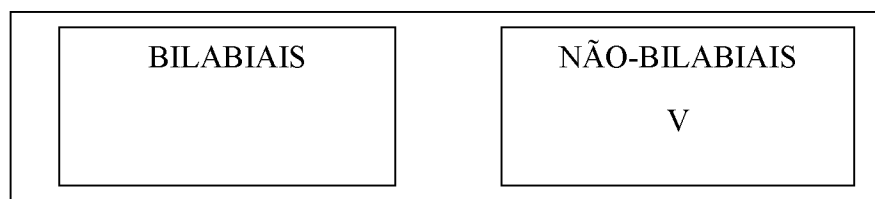
Para a primeira atividade, elaboramos uma aula sobre consoantes e optamos por usar o espelho, como em aulas anteriores, por entendermos que, com esse procedimento, o assunto teórico ficaria mais claro para a criança. Com o espelho, as crianças poderiam visualizar as articulações da boca na produção de todas as consoantes, conseguindo, assim, diferenciar as bilabiais das não-bilabiais, na prática.

Para começar, foi importante dizer aos alunos que o estudo das consoantes colaboraria para a reflexão sobre a escrita de algumas palavras que os alunos têm encontrado dificuldade para grafar, como por exemplo, as palavras *tampa* e *cantor*, constatação feita a partir do levantamento de dados da produção inicial.

Ao aplicar essa aula, percebemos que os alunos ficaram novamente empolgados com o uso do espelho, ao mesmo tempo em que sentiam dificuldade em produzir os sons das consoantes, já que o costume nas escolas é de destacar o nome das letras. Primeiro, explicamos que deveríamos separar as consoantes em dois grupos: bilabiais e não-bilabiais e questionamos as crianças se sabiam o significado dessas palavras, o que foi necessário explicar.

Depois disso, pedimos que cada consoante fosse classificada e agrupada de acordo com as características citadas anteriormente. Então começamos pelo [v], pedindo uma palavra que começasse por *vvvv* (momento que fizemos o som mais alongado para dar ênfase à articulação) e um dos exemplos citados foi *vaca*. Então perguntamos aos alunos como ficou os lábios na produção do *vvvv* (som), encostados ou não, e eles responderam que os lábios não se encostaram. Frisamos que a consoante V era não-bilabial e fomos compondo os conjuntos. (Figura 24).

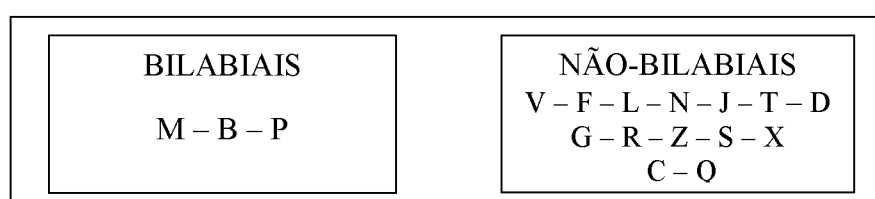
Figura 24 - Consoantes bilabiais e não-bilabiais[1]



Fonte: Autora (2016).

Esse mesmo procedimento foi feito com todas as consoantes, até que os quadros ficaram conforme a Figura 24:

Figura 24 - Consoantes bilabiais e não-bilabiais[2]



Fonte: Autora (2016).

Nesse momento, explicamos que para escrevermos palavras com vogais nasais, precisamos, em alguns casos, escolher entre vogais nasais grafadas com *n* ou com *m*, por exemplo, *an* ou *am*, *en* ou *em* e assim por diante. Para realizar essa escolha, precisamos saber se a consoante que vem após a vogal nasal é bilabial (*p* e *b*) ou não-bilabial (as demais consoantes). Sendo bilabial, devemos optar pelas vogais nasais *am*, *em*, *im*, *om* e *um* porque a articulação do *m* é igual a do *p* e *b*, para pronunciarmos essas três consoantes precisamos encostar os lábios. Sendo não-bilabial, optaremos pelas nasais *an*, *en*, *in*, *on* e *un*, pois a articulação do *n* é a mesma das demais consoantes (*v*, *f*, *l*, *j*, *t*, *d*, *g*, *r*, *z*, *s*, e *x*).

Novamente, encerramos a aula anotando na Lista de Constatações as conclusões a que os alunos chegaram:

- Cada consoante representa um som, produzido por meio de articuladores específicos e de acordo com o lugar e o modo dessa articulação;
- As consoantes podem ser divididas em bilabiais e não-bilabiais;
- Quando escrevemos palavras com vogais nasais devemos grafá-las com *m* ou *n*, e para sabermos qual usar, precisamos observar se a próxima consoante é ou não-bilabial. Caso seja, usamos *m*, no caso de não ser, usamos *n*.

Essa aula foi mais uma que modificamos da primeira aplicação para a segunda. A

aplicação dessa atividade na turma C mostrou-nos que somente pensar sobre as características articulatórias das consoantes não garantiria o entendimento da questão de porque grafar com *m* ou *n* as vogais nasais. Era necessário concentrar a atenção para uma única característica das consoantes: se eram ou não-bilabiais.

Nessa nova versão da aula, os alunos participaram mais ativamente, principalmente as turmas A e B. A turma D não se envolveu muito na atividade em questão, mesmo nos pontos importantes e que necessitariam de participação deles, parecia-nos que não estavam entendendo e, mesmo assim, não buscavam tirar dúvidas. Essa turma apresenta um grande número de alunos com graves problemas de leitura e de escrita, advindos de uma alfabetização deficitária. A nosso ver, as atividades propostas neste trabalho não estavam dentro da zona de desenvolvimento proximal (ZDP) de cerca de 70% da turma C, por isso a pouca participação e envolvimento.

Figura 25 -Atividade 1 da terceira etapa da IP

3ª Etapa: Análise fonético-fonológica das consoantes, dos fonemas e da sílaba da Língua Portuguesa

Objetivos da etapa:

Analisar as consoantes, os fonemas e a sílaba da Língua Portuguesa.

Conhecimentos prévios do aluno:

Nível de leitura alfabética.

Recursos necessários para a etapa:

- Quadro-giz.
- Cartolina e pincel para Lista de Constatações.
- Espelhos para cada aluno.
- 15 jogos de Baralho da Nasalidade (ver anexo 7).
- 30 kits do alfabeto móvel com quadro (ver anexo 8).

3ª Etapa - Atividade 1: “OLHAI OS LÁBIOS QUE TOCAM!”

Duração: 1 aulas de 50 minutos

Objetivos (para o aluno):

- Compreender os modos e pontos de articulação dos sons consonantais de modo prático e relacioná-los aos seus respectivos grafemas.
- Classificar as consoantes em bilabiais e não-bilabiais.

Metodologia:

1. Retomar as aulas anteriores por meio da Lista de Constatações.
2. Explicar o objetivo da aula.
3. Entregar os espelhos aos alunos.
4. Explicar o significado das palavras bilabial e não-bilabial.
5. Pronunciar o som de cada consoante, usando uma palavra como exemplo (a cada consoante pronunciada, o professor vai levar o aluno a articular, reconhecer os articuladores que estão envolvidos e os seus pontos e modos).
6. Observar se a consoante é bilabial ou não-bilabial e separá-la em dois grupos distintos.
7. Registrar das conclusões do grupo na Lista de Constatações.

Avaliação: Por meio da produção articulatória e identificação das consoantes bilabiais e não- bilabiais.

Fonte: Autora (2016).

A segunda atividade desta etapa constou de uma aula prática de construção de palavras com uso do alfabeto móvel, material produzido especialmente para a atividade, formado de quatro alfabetos completos impressos em fichas imantadas e um quadro de metal.

Esse material foi novidade nas salas de aula, por issoos alunos demonstraram entusiasmo em usar. Ao receber o *kit*, o aluno foi orientado a organizar as letras em ordem alfabética e por mais que pareça uma atividade fácil, despertou dúvidas nos alunos. Alguns tiveram dificuldade em identificar o traçado das letras, como as letras I e L, assim como das letras W e M. Outras crianças apresentaram grande dificuldade de classificação e de organização do material. E ainda houve casos de dificuldade de se concentrarem na tarefa,

requerendo ajuda de outrem.

No segundo momento, recorreremos novamente àquela lista de palavras com inadequações retiradas das produções iniciais dos alunos, e ditamos uma palavra, pedindo que as crianças fizessem análise fonêmica para depois montá-la no quadro. Como no caso da palavra *sombra*. A palavra foi ditada e produzimos o som de cada fonema separadamente: *sssss – õõõõ – bbbb – rrrrr – aaaa*. A cada som feito, a criança era estimulada a dizer qual era a letra que o representava, por meio de perguntas simples: qual letra devemos escrever para o som *ssss*? *E para o som õõõõ*? *Com m ou n*? *Qual é a consoante depois de õ*? *B- b- b...* *Então você deve escrever on ou om*? *Agora o som rrrr*? *Aaaa*?

Como esse procedimento demanda muito tempo, foi possível ditar apenas seis palavras e a real necessidade é maior, pois apesar de haver vários alunos em condições de desenvolver mais palavras, há aqueles que precisam de atenção a cada fonema exigido.

Essa atividade foi muito satisfatória, inclusive pensamos que se ela fosse incorporada à rotina de sala de aula poderia contribuir bastante para a ampliação da reflexão fonoarticulatória dos alunos e, é claro, refletir na escrita de textos.

Figura 26 -Atividade 2 da terceira etapa da IP

3ª Etapa - Atividade 2: “VOCÊ VAI VER COM QUANTOS SONS SE FAZ UMA PALAVRA!!!”

Duração: 1 aula de 50 minutos.

Objetivo (para o aluno):

- Refletir sobre os sons de palavras com vogais nasais e grafá-las corretamente.

Metodologia:

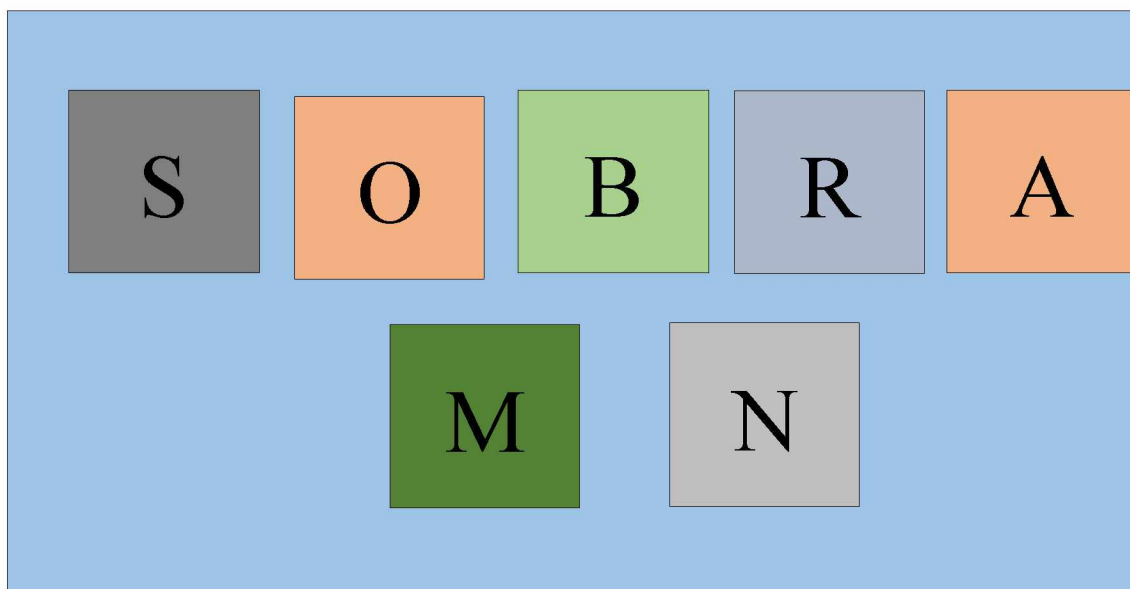
Previamente, o professor seleciona palavras com vogais nasais escritas pelos próprios alunos na produção inicial, cuja grafia estava em desacordo com a norma (*tambor, fazenda, cantor, pomba, banda, carpinteiro e sombra*). Em sala de aula, o professor deve retomar a Lista de Constatações das aulas anteriores, revisando tópicos aprendidos. Depois, entregar o kit alfabeto móvel para cada aluno e pedir que organize-o em ordem alfabética na sua mesa de estudo. Logo após, o professor vai ditando as palavras aos alunos, proporcionando a reflexão dos sons de cada palavra e seus respectivos grafemas. Por exemplo, a palavra *canta*, o professor deve perguntar:

1. Quantos sons tem essa palavra?
2. Quais letras precisamos usar para escrevê-la?
3. Agora, montem a palavra.

Após a confirmação de que todos os alunos conseguiram montar a palavra corretamente, o professor dita outra palavra da lista.

Avaliação: Por meio da produção de palavras com nasalidade.

Figura 27 - Alfabeto Móvel



Fonte: Autora (2016).

Na terceira aula da terceira etapa, contemplamos um assunto muito trabalhado nas escolas de Ensino Fundamental, todavia não com bases fonológicas: a sílaba. Para a nossa proposta de intervenção, tentamos aliar a reflexão fonêmica à reflexão silábica, já que a representação da nasalidade se dá justamente no encontro do declive/coda de uma sílaba com o aclave/ataque da sílaba seguinte. Conhecer as regras de formação e de divisão das sílabas faz-se importante para que o aluno aprenda a refletir sobre os fonemas e, assim, consiga grafar as palavras empregando as normas da escrita.

Em sala de aula, retomamos a Lista de Constatações das aulas anteriores, revisando tópicos aprendidos, pois, como já comentamos, alguns dos participantes dessa pesquisa apresentam grande incidência de faltas e, para que esse fator interferisse menos nos resultados, resolvemos retomar os conteúdos ensinados todo início de aula.

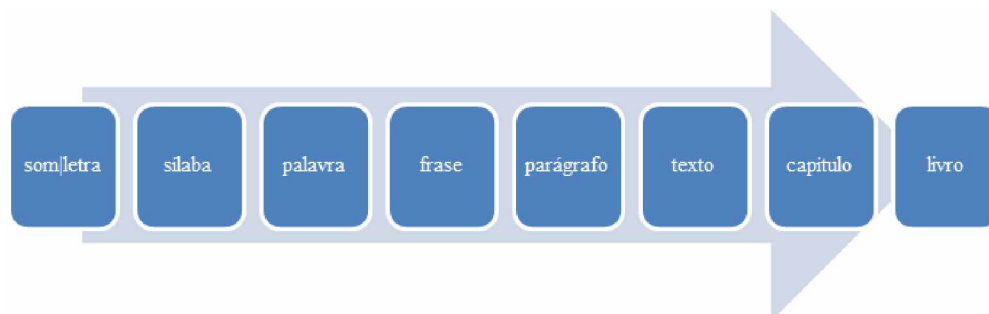
Depois, perguntamos aos alunos quem já sabia separar as sílabas de uma palavra e é claro a resposta foi um sonoro e longo: *Simmmmmmm!* Então, passamos para as perguntas, tentando intermediar aluno e teoria:

1. *Como fazemos para escrever uma palavra? Apenas em um risco conseguimos escrevê-la?*
2. *O que precisamos para escrever uma palavra?*

A partir desses questionamentos, explicamos que os sons da língua são representados pelas “letras” (para o professor, os grafemas), e essas letras se juntam e formam as sílabas e essas se juntam e formam as palavras, e assim sucessivamente, até formamos um livro. Em uma das turmas, a professora regente fez uma analogia, por sinal, muito apropriada, dessa

cadeia de processos com a organização do corpo humano, assunto que a turma estava estudando. O organismo (célula – tecido – órgão – sistema – organismo) se forma, como se forma o livro. Como na Figura 28:

Figura 28 - A organização interna do texto



Fonte: Autora (2016).

Então, fizemos questão de explicar que entender a sílaba é muito importante, pois pensar sobre como é formada pode ajudar-nos a escrever melhor nossos textos, ou seja, o aluno deve entender que não podemos escrever uma palavra de uma vez só, precisamos pensar nela segmentada em sílabas para escrevê-la em suas partes, logo depois, a sílaba segmentada em grafemas, que é a representação de cada som.

Nesse momento, foi importante explicar o que é uma sílaba na visão fonológica. Segundo Silva (2002, p. 76), sílaba é formada quando “[...] os movimentos de contração e de relaxamento dos músculos respiratórios expõem sucessivamente pequenos jatos de ar. Cada contração e cada jato de ar expelido dos pulmões constituem a base de uma sílaba”. Esse ar expelido, em contato com os articuladores passivos e ativos, transforma-se em sons. Obviamente, foi necessário fazer as devidas trocas de termos técnicos para facilitar a compreensão pelos alunos, momento no qual explicamos que o ar vem dos pulmões, quando chega à boca entra em contato com alguns órgãos do aparelho fonador, produzindo o som necessário para a formação das palavras.

E dando continuidade, explicamos que as letras não se juntam de qualquer forma. Para que uma língua se organize, há regras para a combinação das letras. E dessas regras surgem vários moldes silábicos, ou seja, modelos de sílabas que existem.

Com palavras sugeridas pelos alunos, montamos um quadro exemplificando com palavras, os moldes de sílabas. A seguir, apresentamos alguns exemplos (Quadro 11):

Quadro 11 - Moldes silábicos do Português montados com os alunos durante a aula

V	a -mi-go
VV	au -to-mó-vel
VC	a- mi -go
CV	es -co-la
VCC	ins -tru-men-tos
CVC	som- bra
CVV	pou -co
CCV	som- bra
CVCC	cons -tru-ção
CCVC	tron -co
CCVV	frei -o

Fonte: Autora (2016).

Observamos, durante a aplicação dessa aula, que seria necessário repetir o conteúdo relacionado à sílaba, todavia, por questões alheias à nossa vontade isso não foi possível. Como alguns alunos demonstraram estarem pouco concentrados, achamos melhor não aprofundar mais nas explicações sobre moldes maiores que os expostos no Quadro 11. Apesar de se tratar de um assunto um pouco mais complexo, consideramos a experiência proveitosa. Encerramos a aula com o registro dos tópicos aprendidos hoje na Lista de Constatações, ficou assim:

- As palavras se formam de sílabas e essas por fonemas/letras.
- Estudar as sílabas nos ajuda a escrever melhor.
- Existem muitos moldes silábicos: V – VV – CV – VC – VCC – CVC – CVV – CCV – CVCC – CCVC – CCVV e outros.

Figura 29 - Atividade 3 da terceira etapa da IP

3ª Etapa - Atividade 3: “CVC... SEMPRE COM VC!!!”**Duração:** 1 aula de 50 minutos.**Objetivo (para o aluno):**

- Refletir sobre a importância da sílaba para a escrita;
- Conhecer alguns moldes silábicos.

Metodologia:

1. Retomar as aulas anteriores, por meio da Lista de Constatações.
2. Explicar o objetivo da aula.
3. Explicar o que é uma sílaba, para que ela serve e quais moldes silábicos existem na nossa língua, fazendo com que através da participação dos alunos, eles próprios levantem o conhecimento acerca do tema da aula.
4. Anotar os moldes silábicos com exemplos sugeridos pelos alunos no quadro.
5. Anotar na Lista de Constatações os conceitos aprendidos na aula.

Avaliação: Por meio da identificação da sílaba, da sua importância para a escrita e de alguns moldes existentes na língua portuguesa.

Fonte: Autora (2016).

A atividade quatro da terceira etapa consistiu em estudar os fonemas e grafemas de algumas palavras, assim como suas respectivas divisões silábicas, colocando em prática a aula teórica anterior.

O procedimento foi o mesmo utilizado na atividade 2 desta mesma etapa. Como já era a segunda vez que as turmas utilizaram o alfabeto móvel, muitos já apresentaram agilidade em organizar o material. Recorrendo à lista de ocorrências de apagamento, troca e inserção da nasalidade nas produções iniciais dos alunos, resolvemos trabalhar com os seguintes vocábulos: *enxada, cachimbo, símbolo, tampa, comprar, quando, brincar e sempre*. As turmas A e B têm um número menor de alunos então a produção de palavras foi maior, todavia na turma D, o rendimento foi menor, trabalhando apenas seis desses vocábulos. Além de a turma ser maior, a dificuldade que muitos alunos enfrentam na leitura e escrita, impedia-nos de avançar com mais rapidez. Entretanto, mesmo produzindo menos palavras, as que conseguimos trabalhar foram executadas com sucesso. A única turma que não teve essas aulas com alfabeto móvel foi a C, pois, infelizmente, no período de aplicação, o referido material ainda estava em produção.

O diferencial dessa aula em relação à atividade 2 foi a necessidade que os alunos tinham de montar a palavra e depois separá-la. A cada palavra montada, passávamos na carteira de cada aluno, ou elogiando o acerto ou sanando as dificuldades.

Figura 30 - Atividade 4 da terceira etapa da IP

3ª Etapa - Atividade 4: “DIVIDA ISSO, MENINO!!”**Duração:** 1 aula de 50 minutos.**Objetivo (para o aluno):**

- Refletir sobre os fonemas, grafemas e sílabas da nossa língua;
- Montar e dividir a sílabas de palavras com nasalidade.

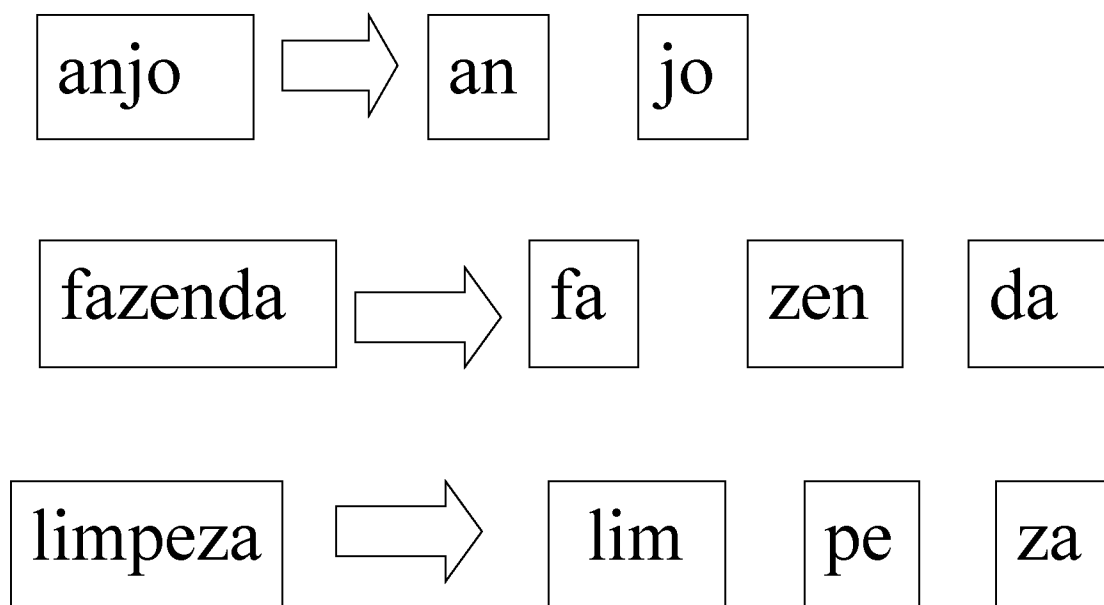
Metodologia:

1. Retomar as aulas anteriores, por meio da Lista de Constatações.
2. Explicar o objetivo da aula.
3. Entrega o kit alfabeto móvel para cada aluno e pedir que organize-o em ordem alfabética na sua mesa de estudo.
4. Ditar as palavras aos alunos, proporcionando a reflexão dos sons de cada palavra e seus respectivos grafemas.
5. Orientar os alunos a fazerem a divisão silábica a cada palavra ditada.
6. Passar nas carteiras elogiando os acertos e ou esclarecendo dúvidas.

Avaliação: Por meio da produção de palavras com vogais nasais e sua divisão silábica.

Fonte: Autora (2016).

Figura 31- Modelo de divisão silábica feito com o alfabeto móvel



Fonte: Autora (2016).

Para terminar a terceira etapa, elaboramos um jogo de baralho de sílabas com foco nas palavras da produção inicial, que os alunos grafaram em desacordo com a norma padrão, tais como no Quadro 12:

Quadro 12 - Palavras para o jogo Baralho de Sílabas

sombra – pomba – carpinteiro – bombeiro – tambor – enxada – tampa –
cantor – limpeza – banda – cachimbo – fazenda – fazendeiro – símbolo

Já na sala de aula, organizamos as duplas de forma semelhante ao que ocorreu na aplicação do jogo de memória, ou seja, duplas de alunos com perfis cognitivos diferentes. Pensamos nessa organização, por acreditarmos que, se a criança está trabalhando com um colega mais experiente, ele pode ser um parceiro colaborador da aprendizagem.

Na proposta, o jogo indicado é a caixeta, que alguns alunos sabiam jogar. Os que não sabiam, elaboraram outra forma de brincar, chegando ao mesmo objetivo que era formar palavras. No entanto, aconteceu uma variação que não esperávamos: muitas crianças, no intuito de formar logo as palavras, usaram as sílabas simples para formar palavras dissílabas, todavia sem nasalidade. É claro que não desconsideramos o esforço do aluno, mas o foco de palavras com nasalidade não foi concluído de forma satisfatória.

Nas quatro turmas, foi uma atividade muito tranquila de ser executada, muitas crianças gostaram de jogar. Certamente contribuiu como mais uma ferramenta de aprendizado para o aluno.

Figura 32 - Atividade 5 da terceira etapa da IP

3ª Etapa - Atividade 5: “BATI!”

Duração: 1 aula de 50 minutos.

Objetivos (para o aluno):

- Refletir sobre a importância da sílaba para a escrita.

Metodologia:

O professor deve imprimir o baralho com as sílabas das palavras em que ocorreram os processos de troca, apagamento e inserção da nasalidade.

2. Montar grupos de dois alunos que recebem o baralho com as instruções do jogo de caixeta.

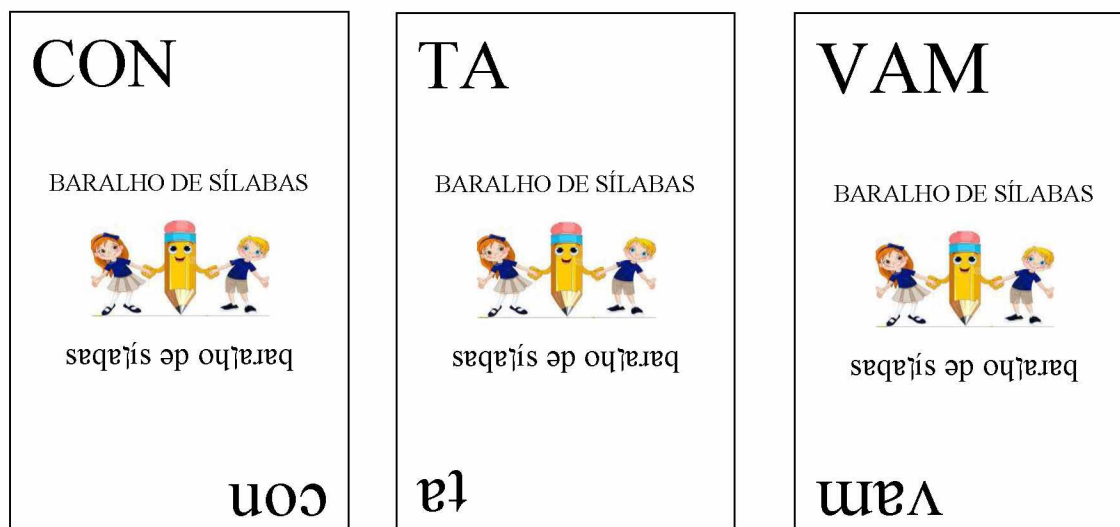
3. Cada dupla deve montar palavras com a presença da nasalidade.

4. Anotar no quadro as palavras montadas pelos alunos.

Avaliação: Por meio da produção de palavras a partir de sílabas com vogais orais e nasais.

Fonte: Autora (2016).

Figura 33 - Modelos de cartas do Baralho de sílabas



Fonte: Autora (2016).

A quarta e última etapa (conforme a Figura 34) contemplou a produção final, aulas em que a mesma produção inicial foi proposta, a fim de podermos comparar nos dois textos dos alunos as ocorrências de processos fonológicos, principalmente os que envolvem a nasalidade. Como as crianças já haviam participado anteriormente, as aulas transcorreram normalmente. Nossa única dificuldade foi na questão da falta de assiduidade de algumas crianças, o que provocou a repetição dessa aula por três vezes até que todos a fizessem.

A experiência de propor a mesma produção de texto conseguiu significativo êxito, pois, na produção final, houve uma ampliação do repertório das crianças e 64% delas mantiveram ou aumentaram seus textos em até 200%.

Figura 34 – Atividade proposta na quarta etapa da IP

4ª Etapa: Produção de texto Final (PF)

Objetivo da etapa (para o professor):

- Analisar os processos fonológicos encontrados nas produções escritas dos alunos.

Conhecimentos do aluno: Estrutura do texto narrativo.

Recursos necessários para a etapa:

- Dois ou três envelopes contendo as fichas com as imagens de tambor, limpeza, pomba, cachimbo, banda, enxada, cantor, tampa, sombra, bombeiro, carpinteiro;
- Folha sulfite pautada para produção escrita.

4ª Etapa - Atividade 1 e 2: HISTÓRIA MALUCA (Produção final- PF)

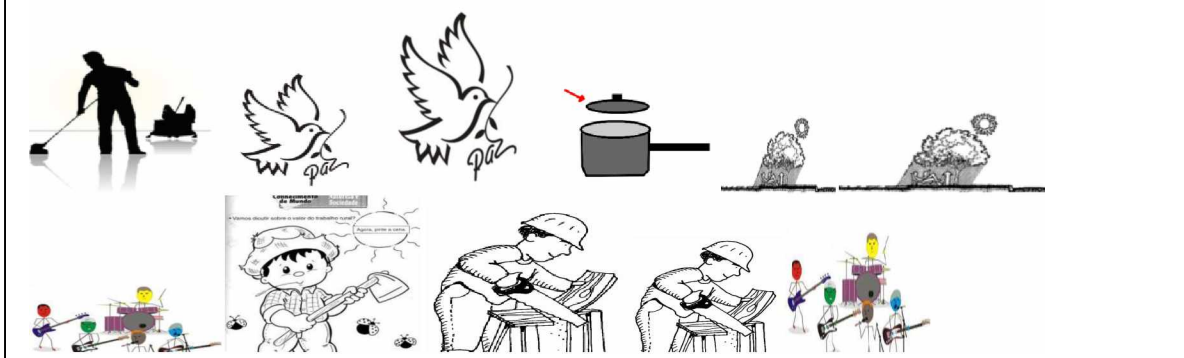
Duração: 2 aulas de 50 minutos.

Objetivo (para o aluno):

- Produzir oralmente um texto narrativo.
- Produzir um texto narrativo escrito.

Metodologia:

1. Organizar os alunos em um círculo;
 2. Entregar a cada um dos alunos uma das fichas com as figuras abaixo;
 3. Cada aluno falará em voz alta o nome da figura que receber (tambor, limpeza, pomba, cachimbo, banda, enxada, cantor, tampa, sombra, bombeiro, carpinteiro);
 4. Juntos e oralmente, os alunos elaborarão uma história maluca, na qual cada aluno deve colocar o nome da figura que receber. Como são onze figuras, a roda continua até que todos os alunos tenham participado da atividade.
 5. Solicitar aos alunos a produção escrita de uma das histórias malucas contadas pelos alunos.
 6. Recolher todas as produções dos alunos.
- Avaliação:** Por meio da produção escrita de texto.



Fonte: Autora (2016)

Nesse capítulo, decrevemos a nossa IP, na qual os alunos puderam participar de atividades de reflexão e de análise fonético-fonológica da Língua Portuguesa, a fim de compreenderem melhor como nosso código linguístico é organizado, além de fazê-los representar devidamente a nasalidade em seus textos finais, entretanto, oferecemos uma base teórica que lhes possibilitou ir além e refletir sobre outros processos fonológicos no seu texto escrito, comprovados por análise e apresentados logo a seguir. No próximo capítulo,

apresentamos os dados coletados e a análise feita durante a pesquisa.

5 DADOS COLETADOS E ANÁLISE

Neste capítulo, apresentamos os resultados quantitativos, a descrição e a análise dos dados obtidos nas produções iniciais e finais dos alunos do quarto e quinto anos, um total de 96 alunos, do Ensino Fundamental de uma escola pública municipal da periferia de Trindade - GO. Nos textos, foram tabulados os processos fonológicos de apagamento, troca da nasalidade e inserção da nasalidade.

No período da pesquisa, a escola tinha 96 alunos matriculados nas turmas pesquisadas e apenas 74 produções iniciais foram recolhidas. Foram excluídas da análise 22 produções, devido a alguns fatores: i) quatro não fizeram a produção inicial; ii) oito escreveram garatuja; iii) cinco não usaram as palavras indicadas na produção; e iv) cinco não fizeram a produção final, impossibilitando a análise comparativa dos textos iniciais e finais.

Nas PIs, as turmas apresentaram um número alto de alunos com problemas para representar a nasalidade. Da turma A, apenas um aluno representou a nasalidade de forma adequada. Na turma B, todos os doze alunos participantes apresentaram inadequações. Nas turmas C e D, três alunos escreveram a nasalidade corretamente, conforme podemos ver na tabela 1:

Tabela 1 - Percentual de alunos com desvios da escrita da nasalidade na produção inicial

	TURMA A	TURMA B	TURMA C	TURMA D
Total de alunos por turma	15	12	23	25
Apagamento, troca e ou inserção da nasalidade.	93,3%	100%	88%	86,3%

Fonte: Autora (2016).

Do total de 74 PIs, foram elencadas 1468 palavras em que ocorreu algum tipo de processo fonológico, lembrando que muitas palavras sofreram mais de um tipo. Desses, um total de 455 (30,9% do total de variados tipos de processos fonológicos ocorridos) ocorrências de processos em torno do traço de nasalidade, sendo 266 casos de troca (58,4%), de 173 de apagamento (38%) e 16 de inserção de nasalidade (3,5%), os quais estão relacionados no Quadro 13, 14 e 15:

Quadro 13 - Ocorrências de casos de troca da nasalidade encontradas nas PIs

Ocorrências de troca da nasalidade	
Adiantava	“... mas não adiamtava ...”
Banda	“... pra tocar tambor na bamda ” “... que cantava com a bamda ...” “... e abensuou a bamda ...”
Bomba	“... e feio uma bolba ...”
Bombeiro(s)	“...ae o dão dero que com seguiu...” “Derrepente o bonbeiro chegou...” “... e chamaro o bonbero ...” “... o cantor chamou o bonbeiro ...” “... chamou o bonbeiro ...” (Título)“ Bonbero ” “... chama o bonbero ...” “... o bonbero chegou...” “... depois disso como Bonbeiro ...” “... e ligou pros bonbeiros ...” “... o bonbeiro foi apiar o fogo...” “... ele virou bonbeiro ...” “... i o bonbero corendo...” “... os bonberos apagouopogo...” “... vil um bonbeiro ...” “... ele foi corre para vê o bonbeiro ...” “... o bonbeiro apagou o fogo...” “... eles chamaram o bonbeiro ...” “... chegou o bonbeiro ...” “E o bonbeiro disse: ...” “E o bonbeiro falou...” “... que era bonbeiro ...” “... encontrarão um bonbeiro ...” “... o bonbeiro não tinha trabalho...” “Era uma ves um bonbeiro ...” “... ele era bonbeiro ...” “... e chamou o bonbeiro ...” “... eles figarão pro bonbeiro ...” “... ai vei o bonbeiro ...” “... o bonbeiro foi embora...”
Cansada	“... noes tava cam sada ...”
Cantor	“... e o cantor bateu no tambo...” “... camtor emtre o faxineiro desidiram...”
Cantou	“... ia Panpa gaicou na casa nova...”
Cachimbo	“... o cachinbo cai...” “... o ponbo da paz achou um cachinbo ...” “... a popinha achou um caxinbo ...” “... não parava de fumar cachinbo ...” “... e ele estava fumando um caximbo ...” “Um homem estava chupando cachinbo ...” “... fumava cachinbo de baicho de uma sonbra...” “... fumando um cajinbo ...” “... tinha um cachinbo de baixo da tampa.” “... tinha um cachinbo ...” “... eles fizeram um cachinbo ...” “... ele achol um cachinbo ...” “... um carpimteiro fez um caxinbo para o home...” “... foi na direção do cachinbo ...” “... o homem pegou o cachinbo ...”

	"...tava fumando cachinbo ..." "... e cahinbo faz barulho..." "... meu pai chegou com um cahinbo ..." "... o fachineiro fumava cachinbo ..." "... e ele fez um cachinbo ..." "... o saci com seu cachinbo ..." "O tambortoca junto com o cahinbo ..." "Fernando foi fuma cachimbo ..." "... i fomandocaxinbo..."
Carpinteiro	"O carpinteiro falou posso te ajudar..." "... um carpinteiro fez um caxinbo para o home..." "... pedil o carpinteiro ..."
Comprar	"... o senhor conbrar um lugar..." "... ele foi conpra um cachibo..." "... foi conbrar umcachibo..."
Chamaram ⁶	" Chamarão bobero..." "... eles chamarão o homen..." "... e chamarão os bombeiros..."
Chegaram ⁷	"... entao quado chegarão ..."
Companheiro	"...mas seu conpanheiro ..."
Comeram ⁸	"... e comerão ..."
Conheceram ⁹	"... eles conhecerão um fazendeiro..."
Conseguir	"... para comseguir o dinheiro..."
Conseguiu	"...ae o dão dero que com seguiu ..."
Construíram ¹⁰	"... eles mesmos comtruiram ..."
Construindo	"... ele estava comstruindo ..."
Continuou	"... o fazendeiro comtinuou ..."
Convidado	"O faxineiro da escola foi comvidado ..."
Dentro	"A pomba estava dentro da casa..."
Derrubaram ¹¹	"...e derrubarão a árvore..."
Descansar	"... de tantu trabalha foi descamsar ..."
Descansou	"Ela dis cam sou ..."
Destampada	"E deixo a panela destanpada ..." "... deixou a comida destanpada ..."
Divertindo	"Todos estavam si divertindo ..."
Em	"... ai a ponba caiu neuma sobra..." "... vou vazer uma comida len casa." "... ne uma fazenda..."
Embora	"... o carpinteiro foi enbora ..."

⁶Troca entre a consoante nasal e vogal com til.

⁷Troca entre a consoante nasal e vogal com til.

⁸Troca entre a consoante nasal e vogal com til.

⁹Troca entre a consoante nasal e vogal com til.

¹⁰Troca entre a consoante nasal e vogal com til.

¹¹Troca entre a consoante nasal e vogal com til.

	"... aquela boua sonbra foi enbora ..." "... eles forau enbora ..." "... o bonbeiro foi embora ..." "... e foi enbora ..."
"Enchadeiro"	"O emchadeiro falou posso te ajudar..."
Encontraram ¹²	"... encontrarão um bonbeiro..."
Enquanto	"Mas purim quanto a suculemta pomba..." " Emquanto sua filha entrou..." "... e ele falou em quanto ..."
Então	"... em to ome daso e..." "... em tão na casa do cantor..." " Emtam todos os amigos do cantor..." " Emtam resouveram..." "... emtam eles tiveram que..." " Emtão ele matou a pomba..."
Entrou	" Emtrou na casa do homem..."
Enxada	"... i levou a em chada ..." "... qua tou coa imxada ..." "... es tava com a emxada ..." "... capinou com sua imhada ..." "... com a imchada para tirar o mato..."
Eram	"...eles erão cator de tabor..."
Fim	"... e fin ..." "... ele moreu. fin "
Fizeram ¹³	"... vizerão o chou..."
Foram	"... eles forão tirão as férias na fazenda..."
Homem	"Um homen estava cortandro..." "Era uma vez um homen ..." "...o homen foi varrer..." "... só que veio homen ..." "O homen tava lavado a casa..." "... e o homen ligou para o bombeiro..." "Um homen La da fazenda..." "... e o homen teve que e para..." "... um homen foi para cantar..." "... e o omen que trabalhava..." "... eles chamarão o homen ..." "... ele chamaram o homen ..." "... um o men moito..."
Incêndio	"... prouvocou um em sedio ..."
Lembrou	"Mas silenbrou dunha pomba..."
Levaram ¹⁴	"E levarão a enchada..."
Ligaram	"... eles figarão pro bonbeiro..."
Limpa (verbo – adjetivo)	"... ele linpa ..." "... se essa fasenda não estiver linpa ..."
Limpando	"... o homem estava linpando ..."
Limpar	"... e afamilia chomou o fachineiro para linpa a casa..." "... xamou um faxinero pr alinpa ..." "Fernando ia linpar o rio..." "... foi linpar a casa..." "... efoi linpar acasa..." "... o homem da limpeza foi linpar o rancho..." "... um parro para linpar o piso..."

¹²Troca entre a consoante nasal e vogal com til.

¹³Troca entre a consoante nasal e vogal com til.

¹⁴Troca entre a consoante nasal e vogal com til.

Limpam ¹⁵	“... essas pessoas linparam ...”
Limpeza	“... ela foi dar uma linpeza ...” “... tinha que fazer linpeza ...” “...eu fasso a linpesa ...” “... o homem da linpeza ...” “... para faze um linpesa ...”
Limpou	“... que linpou tudo...” “... ele linpou tudo...”
Longe	“... bem lomge da casa...”
Monstro	“... eles caiam no buraco com um moustro ...”
Onde	“... omde a arvore pecou fogo...”
Pegando	“O carro essapegado ...”
Pensei	“... e eu peisei que era...”
Pomba	“... a ponba bem custosa pegou...” “... ele sauvo uma ponba ...” “... ia ichada veio para mata a Ponpa ...” “... tava lavando a ponba ...” “... achou uma ponba ...” “... apareceu uma ponbonda cantando...” “... e escutava a ponba cantar...” “... ela e uma ponba da paz...” “... depois ele foi ora pela ponba ...” “... depois passo uma ponba ...” “... ele tinha uma ponba branca...” “... ai pacou una ponba ...” “... ele viu a bonba da paz...” “... parol por uma ponba ...” “... quando eles viram uma ponba da paz...” “... uma musica da ponba ...” “... a musica [...] foi sobre o ponba ...” “... e veio a ponba da pais...” “... e a ponba da paz...” “... ele tinha uma ponba ...” “... e esa ponba faz sonbra...” “... e uma ponbaentrou ...” “... uma ponba comeu todo arroz...” “... A ponba da Paz trouce...” “... e a ponba veio...” “... e so tendo fé na ponda ...” “... ai vei uma ponba cuidado...” “... e monho ponba ...” “... e a ponba estava lá...”
Pombo	“... um ponbo achou o cachimbo...” “Fernando viu um ponbo ...” “... mirou[...] o ponbo ...” “... mata o ponbo ...” “... foi fazer o ponbo ...” “... comer o ponbo ...” “... e os bonbo cagou na fazenda...” “... eu posso traze o Meu ponbo ...” “... ai o ponbo da paz...” \
Pombinho	“Ai um bonbinho branco sentou na cabeça dela...”
Pronto	“... o aumoço ficava promto ...”
Quiseram ¹⁶	“Eles quiserão tampa a panela...”
Sangue	“... e saiu muito saige ...”

¹⁵Troca entre a consoante nasal e vogal com til.

¹⁶Troca entre a consoante nasal e vogal com til.

Sempre	<p>“... felis para senpre...”</p> <p>“... felis para senper...”</p> <p>“... viveram felizes para senpre.”</p> <p>“... não comeu mais nada pracenpre...”</p>
“Solão”	<p>“... tava um solamquente...”</p>
Sombra	<p>“... foi comer na sonbra...”</p> <p>“... de bacho da sonbra...”</p> <p>“... aquela boua sonbra foi embora...”</p> <p>“... fumava cachinbo de baicho de uma sonbra...”</p> <p>“... descansar em uma sonbra...”</p> <p>“... porque não vazemos um show da sonbra...”</p> <p>“... sentar debaicho da sonbra...”</p> <p>“... uma arvore cheia de sonbra...”</p> <p>“... foi descansar debaixo de uma sonbra...”</p> <p>“... eles viu acondra daarvori...”</p> <p>“... e esa ponba faz sonbra...”</p> <p>“... essa casa tinha uma sonbra...”</p> <p>“... o fachineiro estava na sonbra...”</p> <p>“... e fou para uma sonpra...”</p> <p>“... i veio a sonbra...”</p> <p>“... fez uma bela sonbra...”</p>
Suculenta	<p>“... a suculemta pomba com ziava...”</p>
Tão	<p>“... ele era tam trabalhador...”</p>
Tambor	<p>“... tocou uma musica no tanbou...”</p> <p>“... o cantor tocou o tanbor...”</p> <p>“... e de pois pateu no tanbor...”</p> <p>“... bateo no tanbor...”</p> <p>“... ele foi toka no tanbor...”</p> <p>“... foi canta ro tocando tanbou...”</p> <p>“... Elis estava tocando tanboir...”</p> <p>“... e ele tinha um tanbor...”</p> <p>“... uma bana tocano tonbom...”</p> <p>“... Paulo tava tocando tanbor...”</p> <p>“... ele foi pega o tanbor...”</p> <p>“... e um tanbor toco...”</p> <p>“... o tanbor fez...”</p> <p>“... eu vou toca tanbor...”</p> <p>“... e o outro pegou o tarbor...”</p> <p>“... levou eu para tocar tanbor...”</p> <p>“... ei amei tocar tanbor...”</p> <p>“... ele tocava o tanbor...”</p> <p>“... e tocando tanbor...”</p> <p>“... que tocava tanbor...”</p>
Tampa	<p>“... coando a bio a tanpa...”</p> <p>“... na panela com a tanpa...”</p> <p>“... ele foi para a danda catou e pulou com a tanpa...”</p> <p>“... tirou a tanpa...”</p> <p>“... e fechou a tanpa...”</p> <p>“... e abriu a tanpa da panela...”</p> <p>“... levantou a tanpa...”</p> <p>“... veer o que tinha debaicho da tanpa...”</p> <p>“... ele achol uma tanpa...”</p> <p>“... ea tanpa caio...”</p> <p>“... o cantor colocou uma tanpa de panela...”</p> <p>“... e falta a tanpa...”</p> <p>“... deixou a panela sem tanpa...”</p> <p>“... deichou a panela sem tanpa...”</p> <p>“... ela estava senttanpa...”</p>
Tampar	<p>“... para tanpar o buraco...”</p>

Tanto	“... ele viu aquele tanto de pedaço de nadeira...”
Tampou	“... ele tanpou a panela com a tampa...”
Tinham ¹⁷	“... eles tinhão que fazer um chou...”
Tiram ¹⁸	“... eles forão tirão as férias na fazerda...”
Uns	“... fazer um café e ums bolios...”
Viram ¹⁹	“... virão uma lida pomba...”

Fonte: Autora (2016).

Os casos de troca da nasalidade somaram 266 e ocorreram em 75 palavras diferentes.

O Quadro 14 apresenta os casos de apagamento da nasalidade:

Quadro 14 - Ocorrências de apagamento da nasalidade encontradas nas PIs

Ocorrências de apagamento da nasalidade	
Acendeu	“... ele asedeu o xaruto...”
Acompanhar	“... não coseguiu acopanhar ...”
Arrumando	“... o carpiteiro estavam aromado ...” “... arumado a casa...”
Bagunça	“...dexou a baquesa ...”
Banda	“... a bada comeso...” “Para tocar nua bada ...” “... ele tocou na bada ...” “... a bada tocano...” “... foi tocar na bada ...” “... foi canta na bada ...” “... ele foi na bada dele...” “Era um ma veis uma bada ...” “... veio um cato para a bada ...” “A bada calipido vaicata...” “... foi toca nadarta ...”
Batendo	“Eo tabor batedo ...”
Bombeiro(s)	“... io bopeiro chegou para apaga o fougo...” “E chamarão bobeiro ...” “... ixamarão os boberos ...” “Era uma vez um Bobeiro ...” “... o Bobero foi resgata...” “O bobero sego es ta rogado...” “... quanto não trabalhava de bobeiro ...” “... foi sonau o Boubeiro ...”
Brincar	“... depois ela foi bricar ...” “... foi bricar ...”
Cantar	“... ele foi cata de baixo da avore na sobra...” “A bada calipido vaicata...”
Cantor	“... qua tor coa im xada...” “... ele virou um catou ...” “Ai veio um cator ...” “...veio um cato para a bada...” “Era uma vez um cator ...” “... eles erão cator de tabor...” “... e cator Gustavo lima...” “O cartro soiava entra em um banda...”
Cantou	“... qua tou coa im xada...”

¹⁷Troca entre a consoante nasal e vogal com til.

¹⁸Troca entre a consoante nasal e vogal com til.

¹⁹Troca entre a consoante nasal e vogal com til.

	“... ele foi para a danda catou e pulou com a tanpa...”
Cachimbo	“... um saci com um cachibo ...” “... amigo dele fumava cachibo ...” “... dinovo fumando cachibo ...” “... o cací perere fumando cachibo ...”
Capinando	“... vîo um omem capinado ...”
Carregando	“... ai vei uma ponba caregado ...”
Carpinteiro	“... e chamaram o carpíteiro ...” “... era u carpíteiro ...” “... e o carpíteiro construía a casa...” “... xamou um cainpíteiro ...” “... eas nadera para o capíteiro coseta...” “... 1º bombero 2º Cartempero ...” “... io capíteiro (chegou) para construir...” “... o carpeteíro ...” “... um capíteiro ele fazeia...” “... o carpíteiro li ajudou...” “... quado o capíteiro foi sair...” “... do o capito vie e caro...” “... o filho do carpíteiro ...” “... o capiterio a seide o caisibo...” “... mais virão u capíteiro chegada...” “... seu irmão era capeteíro ...” “... o carpíteiro jogo...” “... vîo carpitero ...” “... o carpíteiro estavam aromado...” “U carpíteiro era um morador...”
Chão	“... deixou cair no chau ...”
Chegando	“... mais virão u capíteiro chegado ...”
Chovendo	“... achou que estava chovedo ...”
Com	“... coeseu pai...” “... qua tor coa im xada...”
Conserta	“... o capitero coseta ...”
Correndo	“... ele saiu corredo ...”
Dançou	“... em to ome dasoe ...”
Descansar	“... o home felis foi tes cassar ...”
Destampou	“... não dechol a ela destapo a panela...”
Doendo	“... ai ta duedo de mas...”
Então	“... itão o dão dero...” “... etão no dia seginte...” “... itão quando chegarão...”
Entrada	“... a etrado e dereau...”
Enxada	“... ia ichada veio para mata aPonpa...” “A ia sada do cais...” “... ome que tava cai isada ...” “... ai aichada o Pedro comso a capina...” “... pegou a echada ...”
Fazenda	“... foi capinar na fazeda deli...” “... ta na fazeda ...” “... eles forão tirão as férias na fazerda ...”
Fazendeiro	“Era uma vez um fazerdeiro ...”
Foram	“... os músicos forau ...” “... eles forau enbora...”
Fumando	“... e ficou fumado ...”
Grande	“... uma pomba bem grade ...” “... avor grade ...”
Homem	“... em to ome daso e...” “... que o home acabou...” “... ome que tava cai isada...”

	"... um carpinteiro fez um caxinbo para o home ..." "... o home felis foi tes cassar..." "... ias dehome quize reaizi..." "Era um hormer ..."
Incêndio	"... chegando no esendio ..." "... que causou o isendio ..."
Instrumentos	"... ele fez alguns estrumentos ..." "... com seus istrumentos ..."
Inteiro	"... ficou dia ideiro ..."
Jardim	"... foi capina La no jadi ..."
Jogando	"O bobero sego es ta rogado ..."
Lavando	"O homen tava lavado a casa..."
Linda	"... virão uma lida pomba..."
Limpando	"... etava lipado a sugeira..."
Limpar	"... para o lipado lipa ..." "... o homem vai lipar ..." "... foi lipa a casa..."
Limpador	"... para o lipado lipa..."
Limpeza	"... e fou para a lipeza ..."
Limpo	"... ficou liporn ..."
Mão	"... olhou sua mau ..." "Ele passou a mau na cabeça..."
Mangueira	"... correndo com sua mageira ..."
Mundo	"... todo mudo ..."
Pegando	"Ai veio um tambor pegado fogo..."
Perguntou	"... o cantor pergutou ..."
Principal	"... tocava na rua pricepal ..."
Pombinha	"... so que uma popinha ..." "... a popinha achou um caxinbo..."
Pomba	"... e o poba i qui do poba..." "... foi ora a Poba da pais..." "... e chegol a poba ..."
Pombo	"... e o pobo foi La pra come o arroz..."
Quando	"... quado foi embora..." "... quado o capiteiro foi sair..." "... quado eles viram uma ponba da paz..." "... virão quado chegarão..."
Quanto	"... quato e otambor..."
Quinze	"... ias dehome quize reaizi..."
Remexendo	"... os pauzinhos Remechedo ..."
Romântica	"... cantou uma musica romatica ..."
Sombra	"... tiam uma sodra ..." "... a árvore que tem uma sobra muito boa." "... de baixo da arvore na sobra ..." "... avore na sobra ..." "... ai a ponba caiu ne uma sobra ..." "... dibacho de uma arvore com sobra ..." "... de baicha da árvore na sobra ..." "... que uma solbra ..." "... veio uma solbra ..." "... mais era sou a solbrada arvore..."
Também	"E a banda dele tabem ..."
Tambor	"... eles erão cator de tabor ..." "... um homem estava tocano tabor ..." "... viu um tabor ..." "... uma mulher paço tocado tabor ..." "... ele tocol um tabo ..." "... levol o tabo pra toca..." "Eo tabor batedo..."

	“... veio o tobo ...”
Tampa	“... deixou a panela de pressão e atapa ...” “... ele esueceua panela eai a tapa ...” “... uma garrafa de gosolina a perto com a tapa ...” “... esceceu de coloca a tapa ...” “... a tapa do arroz...”
Tocando	“... uma mulher paço tocadotabor ...”
Zumbis	“... ele matou todo u zubis ...”

Fonte: Autora (2016).

Os casos de apagamento somaram 173 e aparecem em 64 palavras diferentes.

Em se tratando dos casos de inserção da nasalidade, tivemos 16 ocorrências, vejamos no Quadro 15:

Quadro 15 - Ocorrências de inserções da nasalidade nas PIs

Ocorrências de inserção da nasalidade	
Botou	“... que bontou fogo...”
Bombeiro	“... chamo o bombenro ...”
Carpinteiro	“... xamou um cainpitero ...”
Cozinhando	“A mulher estava conzinhand o...”
Cozinhar	“O carpinteiro foi comzinhar ...”
Cozinha	“... a suculemta pomba com ziava ...”
Cozinheiro	“... e os conjinheiro fazendo pipoca...”
De repente	“... derenpente a arvore começou a pegar fogo...”
Então	“... em tã m memos final feliz...”
Fazendo	“... ele estava fanzendo ...”
Fogo	“... e pegor fongor na casa...”
Limpo	“... ficou liporn ...”
Mortos	“... iai elerefive u dos montos ...”
Panela	“... i sequeceu da panlena no fougho...”
Uma	“Era um ma veis uma bada...”
Igreja	“... foi aimquerja ...”

Fonte: Autora (2016)

Pensando na possibilidade da IP alcançar a diminuição de outros processos fonológicos, estes foram quantificados e os apresentamos na Tabela 2, a seguir:

Tabela 2 - Ocorrências de processos fonológicos no *corpus*

Processos fonológicos encontrados no <i>corpus</i> de 1468 palavras com inadequações	
Apagamento da nasalidade	173 (11,7%)
Troca da nasalidade	266 (18,1%)
Inserção da nasalidade	16 (1,1%)
Outros processos ²⁰	1013 (69,1%)

Fonte: Autora (2016).

²⁰Ocorreram casos de neutralização, alçamento vocálico, ditongação, monotongação, vocalização do L, troca de sonora-surda e surda-sonora, apagamento da vibrante r em posição final, hipossegmentação, hipersegmentação e outros. Esses processos não entram no escopo deste trabalho.

É possível verificar na Tabela 2, foi grande a ocorrência de processos fonológicos em torno da nasalidade, haja vista que essas ocorrências somaram 30,9% do total de 1468 palavras com desvios na escrita. Como já citado, várias palavras sofreram, pelo menos, uma alteração por algum processo fonológico, não esquecendo que algumas apresentaram mais de um processo.

Esse foi o perfil encontrado nas produções iniciais dos alunos participantes, de quarto e quinto anos de uma escola municipal da periferia da cidade de Trindade-GO. Após a análise das produções iniciais, aplicamos a IP e recolhemos mais 74 textos que formaram o *corpus* final dessa pesquisa. Passamos a expor agora os resultados obtidos nas produções finais desses mesmos alunos. Há que lembrar ainda que, 96 alunos foram convidados a participar da pesquisa, todavia 22 foram excluídos devido ao fato de: i) quatro não fizeram a produção inicial; ii) oito escreveram garatuja, iii) cinco não usaram as palavras indicadas na produção; e iv) cinco não fizeram a produção final. Em vista disso, a análise feita agora parte de um *corpus* formado de 74 produções iniciais e 74 finais.

Em se tratando da análise dos processos fonológicos em torno da nasalidade, verificamos uma diminuição do número de alunos que apresentaram em seus textos desvio da escrita da nasalidade ao se comparar suas produções iniciais e finais.

Tabela 3 - Porcentagem de alunos que apresentaram casos de desvio de escrita da nasalidade nas produções iniciais e finais

	TURMA A		TURMA B		TURMA C		TURMA D	
Processos	PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF
Nasalidade	93,3%	93,3%	100%	91,6%	88%	88%	86,3%	81,8%
Apagamento, troca e inserção								

Fonte: Autora (2016).

Nas turmas A e C, o número de alunos com desvio de escrita da nasalidade ficou o mesmo. Nas turmas B, um aluno não apresentou problemas na escrita da nasalidade. E na turma D, mais um aluno não apresentou nenhum processo fonológico em torno da nasalidade juntamente com os três que não haviam grafado desvio na escrita da nasalidade na PI. Contudo, em todas as turmas, constatamos que outros alunos diminuíram os processos

fonológicos em torno da escrita, além das ocorrências de outros processos fonológicos²¹. A seguir apresentamos uma análise detalhada, por turma, de todos os casos em que houve diminuição de desvios na escrita.

Na turma A, na produção inicial, quatorze alunos tiveram inadequações. Na produção final, os quatorze alunos continuaram apresentando algum processo, todavia em nove textos houve diminuição das ocorrências, são eles A1, A2, A3, A8, A9, A14, A22, A25 e A27, contabilizando 64,2% de alunos que conseguiram apresentar na produção final a diminuição dos casos ocorridos na produção inicial. Para a comparação das PI e PF, consideramos a quantidade de linhas escritas pelos alunos, incluindo título e a palavra “*Fim*” no final deles.

O participante A1 grafou *bamda* duas vezes, *homen*, *imchada*, *sonbra* e *cachinbo* em sua PI, já na PF só grafou *bamda* e *linpeza*, o qual representou 66% de adequação.

O participante A2 apresentou 80% de êxito na escrita de palavras com nasalidade resguardadas as devidas proporções dos textos (PI com 23 linhas e PF com 17 linhas), pois teve seis problemas com a nasalidade na PI (*tanpa*, *ponba*, *bonbeiro*, *lipeza*, *sonpra* e *cachinbo*) e apenas um na PF (*ponbinha*).

O participante A3 apresentou a pequena melhora de 14,2%, quando diminuiu de sete ocorrências (*ponba* duas vezes, *caregado*, *bobeiro*, *nepara em*, *sobra* para *sombra* e *vazedero* para *fazendeiro*) para seis (*em com trou* para encontrou, *tanbar* e *tanbro* para tambor, *bobeiro* e *ladeto* para lá dentro) na PF. Além de serem muito pequenos os textos desse participante, apresentaram variados outros processos.

Outro caso de muito sucesso foi do participante A8, que teve treze casos de inadequação da nasalidade na PI (*bonbeiro*, quatro vezes, *ponba*, duas vezes, *linpar*, *tenpo*, *sentanpa*, *carpisteiro*, *tanbor* e *sonbra*) e dois na PF (*tapas* e *cachinbo*).

A PI do participante A9 apresentou-nos quatro palavras com desvio da escrita da nasalidade (*tanpa*, *ponba*, *equando* e *sonbra*) contra uma ocorrência da PF (*sonbra*). Isso representou uma diminuição dos processos em 66,6%.

A diminuição de 50% das ocorrências foi percebida na PF do participante A14, que grafou seis palavras (*carpisteiro*, *bonbeiro* duas vezes, *também*, *tambor*, *bamda*, *nepara em*, *omen* para *homem*) com desvio na PI e somente três (*posoemtrar* para *posso entrar*, *linpava* e *em trool* para *entrou*) na PF.

²¹Neutralização, alçamento vocálico, ditongação, monotongação, vocalização do l, troca de sonoras-surdas ou surdas-sonoras, apagamento da vibrante r em posição final, hiposegmentação, hipersegmentação e outros.

O participante A22 registrou *conpanheiro, tanpa, ponba, cahinbo, tanbor* e *ne* para *em* na PI e *cachinbo, imchada* e *ne* para *em* na sua PF, o que representou queda de 66,6% dos desvios de escrita da nasalidade.

A PI do participante A25 apresentou muitos processos fonológicos, somente de desvio de escrita da nasalidade contabilizamos quinze ocorrências. Sua PF mostrou a diminuição dessas ocorrências para onze, discreta, mas representando 26,6%.

E ainda o participante A27, com quatorzecasos na PI (*lavado* para *lavando, tapa, destanpada, pobo*, duas vezes, *homen*, duas vezes, *capetero, tocado* para *tocando, tabor, carpiteiro, cuado* para *quando, cachibo, sobra* para *sombra e fasedero*) e apenas sete na PF (*pobo, bobero, acharo* para *acharam, sobra, cachibo, ichada, coversado* para *conversando*).

A IP não conseguiu acabar com todos os problemas da grafia da nasalidade, todavia a maioria dos textos finais apresentou diminuição de outros processos. O único caso de texto que não apresentou nenhum avanço foi do participante A13, que faltou oito aulas das dez de aplicação da intervenção.

O quadro abaixo apresenta as ocorrências das palavras na PI e na PF da turma A. Há nele exemplos de 19 palavras em que ocorreu a troca da nasalidade e 6 em que houve o apagamento. No entanto, essas 25 palavras foram grafadas na PF adequadamente. Nos textos da turma A, um 4º ano, apareceram 53 casos de troca e 53 de apagamento na PI, já na PF tivemos 27 casos de troca e 30 de apagamento, ou seja, as atividades aplicadas contribuíram para a diminuição dos dois processos, todavia aqueles alunos que já percebiam a nasalidade e apenas fazia a troca da consoante nasal foram mais beneficiados.

Além de tudo isso, constatamos a diminuição significativa de outros processos fonológicos.²²

²²Neutralização, alçamento vocálico, ditongação, monotongação, vocalização do l, troca de sonoras-surdas ou surdas-sonoras, apagamento da vibrante r em posição final, hiposegmentação e hipersegmentação.

Neutralização e alçamento vocálico		Ditongação e monotongação		Vocalização do l		Troca de sonoras-surdas ou surdas-sonoras		Apagamento da vibrante r em posição final		Hiposegmentação e hipersegmentação	
PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF
108	69	23	12	22	17	5	1	16	11	16	23

Quadro 16 - Comparação das ocorrências das produções iniciais e finais - Turma A

Código	Produção Inicial	Produção Final
A1	“... felipe pra tocar tambor na bamda ...”	“Era uma vez uma banda ...”
	“... e veio a sonbra ...”	“... no meio dessa sombra ...”
	“... chegou o fazendeiro com a imchada ...”	“... pra capinar com sua enxada ...”
A2	“... e foi para a lipeza ...”	“... achou um emprego como limpeza ...”
	“... deichou a panela sem tanpa ...”	“... e lavou toda tampa de panela...”
	“... e foi para uma sonpra ...”	“... uma árvore que tinha sombra ...”
	“... e ele fez um cachinbo ...”	“... deu um cachimbo pra ele...”
	“... e um bonbeiro chegou...”	“... foi trabalhar como bombeiro ...”
A5	“... de trabalhar coma enchada ...”	“... casa abandonada com uma enxada ...”
A8	“O bonbeiro e a ponba salvadora”	“... o pai do primeiro vocalista é bombeiro ...”
A9	“... ele esqueceu de tampa a panela...”	“... esqueceu de colocar a tampa ...”
	“... e a ponba veio...”	“... e a pomba comeu tudo...”
A10	“Um dia um bobeiro ...”	“... o bombeiro apagou o fogo...”
A14	“... e ele tocava o tanbor ...”	“Avia um tambor ...”
	“U carpiteiro era...”	“... o pai dele era carpinteiro ...”
	“... e abensuou a bamda ...”	“... ele viu uma pomba ...”
A15	“... é a ponba da paz...”	“... e era uma pomba ...”
A22	“... e deixou a panela sem tanpa ...”	“... a tampa ficou maluca...”
	“... uma bela ponba ...”	“... falou para a pomba ...”
	“... levou eu para tocar tanbor ...”	“... acho muito legal tocar tambor ...”
A25	“... e chegou a poba ...”	“... ele encontrou uma pomba ...”
	“... coloca a tapa ...”	“... esqueceu de tampa a panela...”
A26	“... deu uma somba ...”	“... debaixo da sombra ...”
	“... e feiz uma bagunça...”	“... e fez uma fumaceira...”
A27	“... com a tapa aberta...”	“... e decho a tampa aberta...”
	“... e seu irmão era capeteiro ...”	“... que era namorada do carpinteiro ...”
	“... paço tocado tabor ...”	“... e tinha um tambor ...”

Fonte: Autora (2016).

Na turma B, o participante B4 não apresentou nenhum desvio na escrita da nasalidade em sua PF, o que não havia acontecido na PI, quando escreveu *cachinbo*, *ponbo* e *carpimteiro*. Além disso, sete (58,3%) participantes, de um total de doze conseguiram diminuir ou manter o número de ocorrências de inadequação da nasalidade, são eles os participantes: B1, B3, B13, B14, B16, B17 e B23. Descrevemos, a seguir, algumas particularidades percebidas na comparação das produções textuais desses participantes.

O participante B1 grafou *cator* e *ponba* na PI e apenas *casada* para cansada na PF.

O participante B3 registrou em sua PI *catou* para cantor, *ponba* e *cahinbo* três vezes. No entanto, em sua PF só registrou *damdo* e *catores*, para dando e cantores.

O texto do participante B13 apresentou uma excelente melhoria. Sua PI teve 25 linhas e sua PF, dezoito. Resguardadas as devidas proporções, na PI, ele escreveu *caxinbo*, *bonbeiro*, *cachinbo*, *bonbeiro*, duas vezes, e *ponbo*, todavia, na PF, o processo ocorreu apenas na palavra *exada*. Isso mostra uma melhoria de 80%.

O participante B14 conseguiu manter o número de ocorrências de desvio de escrita da nasalidade, mesmo escrevendo sua PF maior que a PI.

O participante B16 conseguiu uma melhoria de 50%, pois na PI escreveu *linpar*, *cachinbo*, duas vezes, *u* para *um*, *bonbeiro*, *embora*, *tanpa*, *sonbra* e *tanbor*, já na PF, apenas *linpeza* e *bonbeiro*.

No caso do participante B17, levando em conta o tamanho dos textos (PI com treze e PF com seis linhas), contabilizamos nove ocorrências na PI (*cator*, *guado*, *ponba*, *bonbeiro*, *linparam*, *tanpa*, *sonbra*, *cazinbo* e *tanbor*) e duas na PF (*tanbor* e *linpeza*). Nesse caso, houve uma diminuição de 66% dos casos.

O participante B23 escreveu onze linhas na PI e treze na PF e conseguiu diminuir em 66,6% dos seus erros na representação da nasalidade. Na sua PI, escreveu *caxinbo*, *home*, duas vezes, *tes cassar* para *descansar* e *aichada*, já na PF, somente *costruir* e *home*.

O participante B6 não conseguiu nenhuma diminuição dos processos da nasalidade, todavia, percebemos diminuição dos casos do apagamento da vibrante *r* em final de palavra. O participante B7 é autista e o percebemos muito impaciente para refletir sobre os fonemas da língua, todavia se mostrou o aluno mais criativo de todas as turmas, tanto na história oral quanto na escrita. Este participante não conseguiu diminuir os processos em torno da nasalidade, todavia diminuiu a incidência de hiposegmentação e hipersegmentação na sua PF.

Em nossa breve análise, percebemos que todos os alunos dessa turma apresentaram diminuição de outros processos fonológicos, como hiposegmentação, hipersegmentação e apagamento da coda vibrante *r*²³.

No quadro 17 estão relacionados os casos de adequação de algumas palavras da PI

²³

Neutralização e alçamento vocálico		Ditongação e monotongação		Vocalização do l		Troca de sonoras-surdas ou surdas-sonoras		Apagamento da vibrante <i>r</i> em posição final		Hiposegmentação e hipersegmentação	
PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF
6	8	24	11	14	10	12	18	4	1	20	12

para PF dessa turma.

Quadro 17 - Comparação das ocorrências das produções iniciais e finais - Turma B

Código do participante	Produção Inicial	Produção Final
B1	Título “O cator”	“... um shol com um cantor ...”
	“... foi sobre a ponba ...”	“... uma pomba apareceu...”
B3	“A Ponba da Paz trouxe...”	“Era uma vez uma pomba ...”
	“... capinou com sua innhada ...”	“... uma enxada que...”
	“... junto com o cahinbo ...”	“Era uma vez um cachimbo ...”
B4	“... tava fumando cachinbo ...”	“O cachimbo e a pomba”
	“... um ponbo da paz...”	“... transformou o pombo em...”
	“... pedil o carpinteiro ...”	“... e pegou fogo o carpinteiro ...”
B6	“... rumar o pauc ...”	“... o palco quebrou...”
B7	“... mas nada pracempre ...”	Sem casos de segmentação.
B9	“... Pedro foi toma um pouco de cajimbo ...”	“... la pegou o cachimbo ...”
B13	“... fumano um caxinbo ...”	“... fumano um cachimbo ...”
	“... chegou o bonbeiro ...”	“... e ele ligou pro bombeiro ...”
	“... fasso a linpesa ...”	“... e a mulher da limpesa ...”
	“... posso traze o meu ponbo ?...”	“... e chegou uma pomba ...”
B14	“... não era do cachinbo ...”	“... parece o cachimbo do sasi...”
	“... e sua enchaida ...”	“... a enxada em uma árvore...”
B16	“... estava com cachinbo ...”	“... estava com um cachimbo ...”
	“... colocou uma tanpa ...”	“... achou uma tampa ...”
	“... fez uma bela sonbra ...”	“... tinha muita sombra ...”
B17	“Era uma vez um cator ...”	“Era uma vez um cantor ...”
	“... bonbeiro apagou...”	“... e teve bombeiro ...”
	“... ea tanpa caiu...”	“... carpinteiro tampa ...”
	“... eo carpindeiro ...”	“... carpinteiro tampa...”
	“... tinha uma sonbra ...”	“... enchada sombra ...”
	“... um cazinbo ...”	“... e o saci com cachimbo ...”
B23	“... féis um caximbo ...”	“... fumando calhimbo ...”
	“... cassar ai aichada ...”	“... home da inchada ...”

Fonte: Autora (2016).

Na turma C, tivemos o maior índice de adequação dos processos fonológicos em torno da nasalidade, até porque já apresentavam um entendimento maior da nasalidade, haja vista a pouca incidência de apagamento da nasalidade nos dados da PI.

Nessa turma, de 25 participantes, três (12%) não apresentaram inadequação na escrita de palavras com nasalidade e onze (44%) tiveram pelo menos um caso de adequação, tais como: C1, C3, C9, C12, C13, C17, C27, C29, C34, C35 e C36.

O participante C12 escreveu treze linhas na PI e 17 na PF, e mesmo assim diminuiu os desvios em palavras com nasalidade em 75%, registrou *bonbero*, *sonbra* e *ponba* na PI e somente *carpinteiro* na PF.

O participante C16 também conseguiu diminuir em 33% seus erros, pois em sua PI grafou seis palavras com inadequações (*chau*, *duas vezes*, *dentro*, *emchadeiro*, *duas vezes*, *carpinteiro*) e em sua PF somente quatro (*capiteiro*, *cachinbo*, *penpero para bombeiro* e

camtor).

O participante C17 escreveu *conzinando*, *bonbinhopara* pombinho, *bonbeiros*, *linpeza* e *emquanto* na PI, todavia, na PF, só registrou quatro palavras com inadequação: *homen*, *tanbor*, *bonbeiro* e *descansarão*.

O participante C24 utilizou 52 palavras com nasalidade em sua PI e 42 em sua PF. Na primeira, cometeu quinze inadequações (*em tam*, cinco vezes, *comvidado*, *grade*, *purimquanto*, *com ziava*, *prompto*, *longe*, *adiamtava*, *camtor*, *emtre*, *comtruiram*) e na segunda, apenas oito (*comvidado*, *bamda*, *emtam*, duas vezes, *emcomtrou*, *entam*, *emtão*, *coremdo* e *discamsa*), mostrando a diminuição dos processos em 9%.

O participante C27 apresentou uma PI com dezessete linhas e uma PF com vinte, e ainda assim conseguiu diminuir em 20% a incidência de inadequação da escrita da nasalidade.

O participante C29 conseguiu uma brilhante PF, na qual conseguiu diminuir de dez para três a incidência de inadequações da nasalidade da PI. Nesta, escreveu *linpar*, *ponbo* (seis vezes), *cachinbo* (duas vezes), *senpre*. Em contrapartida, na PF escreveu apenas *omen*, duas vezes, *linpeza* e *bobeiro*, portanto, apresentou 60% de acertos.

Das produções finais, aquela que mais nos impressionou foi a do participante C33, que conseguiu assimilar, de certa forma, traços de nasalidade e grafá-los na sua produção final. Nesta aumentou 94% da produção inicial, e ainda assim manteve o mesmo número de erros dela, o que caracteriza um avanço. Na PI grafou *bada* para a palavra *banda*. Já na PF, grafou *bam da*. Apesar de ocorrer um caso de hipersegmentação, uma característica marcante do autor do texto, é possível verificar que o informante C33 já consegue perceber a nasalidade e a grafa, mesmo que com a consoante nasal inadequada. Outro exemplo de pequenos, mas significantes avanços na escrita do texto foi o exemplo *atapatatampou* da PI, que na PF se tornou *a tampa tampou*. Percebemos o sucesso do informante em grafar a nasalidade e segmentar corretamente.

O participante C36 apresentou uma melhora de 66% na sua PF. Na sua PI, escreveu 30 linhas, onde grafou *bonbero*, três vezes, *respodeu*, *ums*, *esendio para incêndio*, *linpou*, *linpando*, *linpa*, *ponbanba* e *dasava*. No entanto, em sua PF, grafou apenas sete palavras com desvio da nasalidade: *linpando*, *também*, *bonbero*, *muito* (duas vezes), *lonbero para bombeiro* e *sonbra*.

Os participantes C1, C3, C9, C34 e C38 apresentaram poucos casos de processos da nasalidade e os resultados na PF também não sofreram grandes modificações. Por outro lado, percebemos que alguns alunos permaneceram não registrando a nasalidade adequadamente, ou até apresentaram mais inadequações que na PI, tais como: C5, C13, C26, C30 e C31.

Essa turma não teve a IP como as outras, a saber: i) a aplicação das aulas teóricas ainda estava um tanto abstrata; ii) não foi possível usar as aulas com o alfabeto móvel; iii) o baralho não continha as palavras do atual. No entanto, ao analisar outros processos fonológicos, constatamos a diminuição em todos²⁴.

Ao considerarmos a brevidade da nossa IP e todas as particularidades da aplicação das atividades na turma C, há que se concordar que os resultados foram satisfatórios. O quadro 18 apresenta as ocorrências de palavras comparadas na PI e na PF.

Quadro 18 - Comparação das ocorrências das produções iniciais e finais - Turma C

Código do participante	Produção Inicial	Produção Final
C1	“... depois disso como Bonbeiro ...”	“... ele já foi bombeiro ...”
	“... e o hospital espludiu ...”	“... estava vazando gás e explodiu ...”
C3	“... 1º bombero ...”	“... ne um bombeiro ...”
	“... ele salvou uma ponba ...”	“... ne outros pombos ...”
	“... ele lembrol que tinha que...”	“... ele ficou com dor de barriga...”
	“... ele comprol e ele terminou...”	“... ele cago em tudo...”
	“... ele chamol a banda de rock...”	“... o fazendeiro mato ...”
		“... comeu ela...”
		“... e vuou sang pra todo lado...”
		“... e ficou tudo normal...”
C4	“... ai a bando tocou...”	“... contratar uma banda de última hora...”
C9	“... um Ponba branca ela era...”	“... derrepente a pomba passa por la...”
	“O carpinteiro foi e contruil um casa...”	“... ele contruiu uma casa bem bonita...”
	“... chamaram o fachineiro para a limpesa ...”	“... Ele precisava de limpeza ...”
C10	“... camou o trabalhador...”	“... o cantor chamou sua banda...”
	“... o trabalhador com sua enchada ...”	“... seu José com sua enxada fez o buraco...”
C11	“... em quanto o carpinteiro toma...”	“... enquanto ele cantava...”
	“... apagar o fogo procausa do cachimbo...”	Nenhum caso de hipossegmentação.
C12	“... e a ponba estava lá...”	“Era uma vez uma pomba ...”
	“... e chamaro o bonbero ...”	“... e ligou para o bombeiro ...”
	“... e foram para a sonbra ...”	“... debaixo dessa árvore tinha uma sombra ...”
C13	“... e a PonPa gaicou na casa...”	“... feio uma PomPa ...”
C17	“ Emquanto sua filha entrou...”	“... enquanto os outros foram...”
		“... enquanto isso os homens...”
	“Ai um bonbinho branco sentou...”	“... apareceu derrepente um pombo branco...”
		“... parecia que o pombo branco queria...”
C24	“... em tão na casa do cantor...”	“... Emtam ele resolveu...”

24

Neutralização e alçamento vocálico		Ditongação e monotongação		Vocalização do l		Troca de sonoras-surdas ou surdas-sonoras		Apagamento da vibrante r em posição final		Hipossegmentação e hipersegmentação	
PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF
31	17	62	33	16	15	19	15	12	9	60	50

		“... entam quando a banda...”
		“... emtão começou a pegar fogo...”
	“... os amigos do camtor ...”	“... tem um cantor dimais...”
C27	“... só que eles erão cator ...”	“... qui tinha um canto ...”
	“... xamou um faxinero...”	“... ele chamou um faxinero...”
	“... ixamarão os boberos...”	“... chamarão um bobero...”
	“... um faxinero pralinpa ...”	“... um faxinero pra limpa a casa...”
	“Era uma vez um fazerdero ...”	“... e o fazedero ficou triste...”
	Seis casos de segmentação: iai- ideixou- atapa- iderepente- ixamarão- pralinpa	Três casos de hipossegmentação: soque- acasa- jatinha
C28	“... eles puiserão a tama na panela...”	“... ele foi almosar a tampa da panela caiu...”
C29	“... Fernando foi fuma cachinbo ...”	“... ele trabalhava vumando um cachimbo ...”
	“... Fernando ia linpar o rio...”	“... trabalhava de limpar o rio...”
	“... Fernando chamou o bonbeiro ...”	“... Gabriel chamou o bombeiro ...”
	“... a banda ia canta de baixo da sonbra...”	“... a e debeixo da árvore...”
C30	“... quanto e otambor ...”	Nenhum caso de hipossegmentação.
	“... eo bombeiro estava demorado...”	
	“... eo bombeiro veio...”	
	“... ele foia a loja e...”	
C31	“... e de pois pateu no tanbor...”	“... e depoi fomara caxipo...”
	“... pateu no tanbor de paixo da sopra...”	“... e descansar depaixo de uma sonbra...”
	“... o fazendeiro es tava com a emxada...”	“... que estava e capinando...”
		“... ea estava latanbém...”
		“... caí um faxineiro estavalinpando ...”
	“... e o faximero tava lavando...”	“... caí um faxineiro ...”
C33	“Era uma vez o qua xido ...”	“Um caxido dedaxo da avire...”
	“... ae o dão dero que com seguiu...”	“Em toa xamarão um dodero ...”
	“... itão o dão dero que...”	“... em tão a bam da...”
		“ Emtoa xamarão um dodero ...”
	“... e qua tou cõa im xada...”	“ Em tão estava fotado um canto...”
	“... e qua tou cõa im xada ...”	“... capinamo com uma éxada ...”
	“... a bada dexou a baquesa...”	“... em tra na bamda ...”
	“A bada comeso a toqua ...”	“... elas foram toca ...”
	“Nois tava cam sada...”	“Em tão estava fotado um canto...”
	No texto com 17 linhas apresentou 16 casos de segmentação .	No texto com 33 linhas apresentou 18 casos de segmentação , ou seja, 42% menos ocorrências .
C34	“... o carpeteiro enquanto ele estava...”	“... e o carpintero foi plantar flores...”
C35	“... não parava de fumar cachinbo ...”	“... gostava muita de fumar cachimbo ...”
C37	“A istori maluca”	“A estória maluca”
C39	“... e ficou lá na somba ...”	“... resolveu dar uma paradinha em uma sombra ...”
	“... e derrubarão a árvore...”	“... e eles resolveram cantar la...”
		“... e eles deixaram ele entrar...”
		“Dias passaram ...”
		“... e eles resolveram mudar para uma fazenda...”
		“... eles trabalharam ...”
		“... todos viveram felizes...”
	“Era uma vez uma faxineiro e uma bomba ...”	“Era uma vez uma pombinha ...”
	“... não viu uma enchada ...”	“E eles capinou com a enxada ...”

Fonte: Autora (2016).

Por último, analisamos os dados da turma D, com 22 participantes, dos quais três,

D1, D10 e D34 não apresentaram inadequações na escrita de palavras com nasalidade na PI. Após a aplicação das atividades, mais um aluno compôs esse grupo, o participante D11, que escreveu *sonbra* e *estrumentos* em sua PI e não grafou nenhuma palavra com processo fonológico da nasalidade em sua PF.

Os participantes D12 e D26 não apresentaram nenhum tipo de avanço. Os participantes D3, D4, D6, D7, D16, D21, D28, D35 apresentaram diminuição de outros processos, como nos apagamentos da vibrante *r* no final de vocábulo e/ou na segmentação. No entanto, tivemos diminuição dos processos fonológicos na representação da nasalidade em textos de oito participantes: D14, D15, D17, D22, D23, D27, D33 e D36. Considerando os participantes que não tiveram ou diminuíram os desvios da escrita da nasalidade, temos um total de 54,5% de alunos que tiveram pelo menos um caso de adequação da escrita da nasalidade.

O participante D14 escreveu uma PI de doze linhas grafando *tanpa*, *ponBa*, *conprar* e *tanBor*. Já a sua PF teve quinze linhas e apenas quatro inadequações: *linpando*, *home*, *tanBor* e *inbora*. Esse aluno grafou a letra *b* maiúscula no meio das palavras oito vezes na PI, o que aconteceu apenas uma vez na sua PF.

O participante D15 escreveu sua PI com apenas sete linhas, na qual apresentou uma história quase impossível de se entender, com muitos desvios da escrita, entre neutralização, hiposegmentação e hipersegmentação, troca de surda-sonora e sonora-surda, problemas com representação da nasalidade e monotongação. Sua PF foi um texto maior, 21 linhas e de maior compreensão que a PI. Na primeira produção, ocorreram uma troca, três apagamentos e duas inserções da nasalidade, como em: *aimquerca* para igreja, *nadarta* para na banda, *anfere* para árvore, *dacar* para dançar, *cagido* para cachimbo e *ideiro* para inteiro, sobressaindo os apagamentos. Na PF, escreveu a consoante nasal adequada em *bompeiro* para bombeiro, *bomba* para pomba, *limdo* para limpo e *limdol* para limpou. Nesse texto, ocorreu apenas uma inserção, na palavra *anfere* para árvore. Ainda aumentaram os casos de trocas (*imjata* para enxada, *imguta* para enxuta, *gatimdeiro* para carpinteiro, *bamda* para banda, *comseta* para consertar) e os casos de apagamento, resguardadas as devidas proporções, diminuíram 44,4% (*catizeiro* para carpinteiro, *cosseta* para consertar, *cagibo* para cachimbo, *lipo* para limpou, *migue* para ninguém), mostrando que esse participante começou a perceber a nasalidade nas palavras.

O participante D17 apresentou pequeno avanço, pois na sua PF conseguiu grafar corretamente *banda*, *limpar* e não segmentou *um cachimbo*, como na PI.

O participante D27 conseguiu reduzir para apenas um os casos de processos

fonológicos da nasalidade em sua PF, onde escreveu *reicostruiu* para reconstruiu.

O participante D22 apresentou pequena melhora, pois grafou em sua PI *cachinbo*, duas vezes *virão*, *lida ebombenro* para, respectivamente, *cachimbo*, *viram*, *linda e bombeiro*. No entanto, na sua PF, escreveu *chamarão*, *conzinha*, *linpeza* e *cachinbo*.

O participante D23 também apresentou pequeno avanço quando grafou apenas nove casos de nasalidade na sua PI, comparando com os onze da PI, somando um avanço de 18%.

O participante D33 conseguiu assimilar bem os conceitos sobre nasalidade e diminuiu os casos de oito (*sonbra*, *um*, *cachinbo*, *ponba*, *em*, *linpesa*, *tanpa* e *bonbeiro*) na PI para três (*un*, duas vezes e *tanpa*) na PF. Um índice de 62,5% de melhora nos casos.

O participante D36 apresenta em seu texto muitos desvios da escrita mostrando sua enorme dificuldade na escrita. No entanto, na sua PF conseguiu começar a perceber a necessidade de grafar a nasalidade, pois apresentou menos casos de apagamentos e mais de trocas. Sua PI teve treze apagamentos e uma troca. Sua PF teve onze apagamentos e quatro trocas. E no geral, diminuiu os desvios em 25% em um segundo texto 41% maior.

Essa turma foi o maior desafio do nosso trabalho, já que 73% dos participantes apresentavam em seus textos iniciais e finais vários desvios da escrita. Outro fator marcante foi o de que apresentaram alto grau de desmotivação, tanto os alunos quanto a professora. Esse fator é muito subjetivo, mas é importantíssimo nas relações pessoais de um grupo que precisa alcançar um objetivo único: a aprendizagem da escrita e outras. Scliar-Cabral (2003) considera que

Aprender a ler e escrever depende de muitos fatores tais como condições reais para que as crianças se tornem motivadas, experiência funcional prévia com material impresso, exposição a contextos narrativos e um contexto de ensino-aprendizagem inteligente, onde professores e crianças possam em conjunto construir o letramento (SCLiar-CABRAL, 2003, p.41).

O Quadro 19 apresenta todos os casos de adequação da escrita presente na PF da turma D.

Quadro 19 - Comparação das ocorrências das produções iniciais e finais - Turma D

Código do participante	Produção Inicial	Produção Final
D3	“... porque ela e uma ponba ...”	“... am compra uma pomba ...”
D6	“... que era um carpintero ...”	“... de baixo da sombra tinha um carpinteiro ...”
D14	“... pra Banda deles toka ...”	“... depo ele foi toca tanbor...”
	“... ele foi toka ...”	
	“... de pois ele foi canta ...”	“... depois ele foi cantar ...”
	“... foi ora pela ponBa ...”	“... símbolo da pais a pomba ...”
	“... ele foi conpra um cachibo ...”	“... e achou um cachimbo ...”
	“... ele foi de Baixo da arvi...”	“... ele foi pra dibaixo da arvore...”
	Baiou – de Baixo – somBra – Banda – ponBa – símBolo – cachiBo – tanBor (letra maiúscula no meio de frase e de palavra). Oito casos em um texto com 12 linhas.	tanBor . Apenas um caso em um texto com 15 linhas, ou seja, 90% menos ocorrências.
	Capina(r) – chegou – Baiou – foi (10x) – faz (er) – limpa (r)– dormi (r)– toka (r)– ora (r) – pegou – apaga(r) – canta(r) – conpra(r) . Em 23 ocorrências verbais, obteve 14 acertos, ou seja, 60% de acerto.	Capina(r) – foi (9x) – faz (er) – dormi (r)– toca (r) – ora (r) – levou – apagou – canta(r) – conpra(r) – pego (u) – ligo (u) – refresca(r) – quebrou – a rumou – achou . Em 24 ocorrências verbais, obteve 16 acertos, ou seja, 66% de acerto.
D15	“... foi toca nadarta ...”	“... dave muito bem tamd magica...” (banda)
D17	“... foi linpar a casa...”	“... foi limpar a casa...”
	“... foi tocar na bada ...”	“... depois tocar na banda ...”
	“... conbrar umcaxinBo ...”	“... fo fumar um caxinBo ...”
D21	“... abriu a tanpa da panela...”	“... ela tapol com a tampa ...”
	“... mas so tima macarra...”	“... mais tinha outro chow...”
	“... so tocando tanbou ...”	“... a toca o tambor ...”
D22	“... eles chamo o bombenro ...”	“... chamarão o bombero ...”
D23	“... osbonberos apagouopogo ...”	“... a apagou ofogo ...”
	“... i fomandocaxinbo ...”	“... cegetario de sou guair ocachinbo ...”
	“... ai pacou unaponba ...”	“... e a ponba pacou laperto...”
	“... viu acondra daarvori ...”	“... naconba de baixo da arvore ...”
D27	“... eles conhecerao um fazendeiro...”	“ Chamaram o bombeiro...”
	“E levarão a enchada...”	“... chamaram a faxineira...”
		“... e chamaram o construtor...”
D28	“... e ele tinha um tanbor ...”	“... depois ele foi tocar tambor ...”
D33	“... e foi descansar de baixo de uma sonbra ...”	“... descansa em uma sombra ...”
	“... ele achol um cachinbo ...”	“... por causa de un cachimbo ...”
	“... voltando parol por uma ponba ...”	“... ele teve que a pomba ...”
	“... ele foi pega o tanbor ...”	“... teve que retira o bambor ...”
	“... tinha que fazer linpesa ...”	“... La fazendo limpesa ...”
	“... ele vil un bonbiero ...”	“... i chamo o bombeiro ...”
D36	“Eera um ma veis...”	“Eera uma veis...”
	“... veio um cato ...”	“... i tava cantado ...”
	“... a seide o caisibo ...”	“... ele foi fona o caxibo ...”
	“... que tava cai isada ...”	“... i a ixada ...”
	“... e o capiterio a seide o caisibo ...”	“... e o ome foi no campiteiro ...”
	“... que tava cai isada ...”	“... foi capina o lote i a ixada ...”

Fonte: Autora (2016)

Refletindo sobre os dados desse último quadro, podemos observar que vários alunos conseguiram grafar adequadamente outras palavras que sofreram outros processos fonológicos²⁵, comprovando que a IP aplicada conseguiu provocar mudanças gerais na escrita de texto das crianças.

Na análise geral dos dados das produções finais, contabilizamos que 1134 palavras sofreram algum processo fonológico, desses 368 foram de nasalidade, sendo 201 trocas, 146 apagamentos e 12 inserções da nasalidade.

Tabela 4 -Comparação dos casos de processos fonológicos da nasalidade nas produções iniciais e finais

	PRODUÇÃO INICIAL (1404 linhas)	PRODUÇÃO FINAL (1392 linhas)
TROCAS	266	201
APAGAMENTOS	173	146
INSERÇÕES DA NASALIDADE	16	12
TOTAL	455	368

Fonte: Autora (2016).

Se compararmos os dados da PI com os da PF, podemos concluir que:

- Houve uma redução geral dos casos em 17,1%;
- As crianças passaram a perceber e grafar mais a nasalidade, pois o número de apagamentos caiu 9,8%;
- O número de trocas diminuiu 24,1% mostrando que as crianças refletiram sobre as consoantes bilabiais e as não-bilabiais, grafando-as corretamente;
- O número de inserções de nasalidade caiu 20%;
- Os números de ocorrências de troca e de apagamento são os mais expressivos, sendo os de inserção menos significativos, logo se a intervenção a que nos propomos aplicar se ocupar em diminuir os dados das trocas e apagamentos, consequentemente os de inserções diminuirão.

Além de percebermos a ocorrência de processos fonológicos em torno do traço da nasalidade, percebemos a diminuição das ocorrências de outros processos. Na Tabela5

²⁵

Neutralização e alçamento vocálico		Ditongação e monotongação		Vocalização do l		Troca de sonoras-surdas ou surdas-sonoras		Apagamento da vibrante r em posição final		Hiposegmentação e hipersegmentação	
PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF
32	29	46	35	24	15	20	22	32	18	67	58

constam número de palavras que apresentaram os processos citados, tanto na produção inicial quanto na produção final, por turma.

Tabela 5 -Comparação dos casos de variados processos fonológicos nas produções iniciais e finais

TURMAS	A		B		C		D	
Produções textuais	PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF
Nasalidade Apagamento, troca e/ou inserção	131	79	67	42	157	134	100	113
Outros processos	97	68	80	62	200	139	221	177

Fonte: Autora (2016).

Os números comprovam que, após a intervenção, todas as turmas diminuíram os desvios na escrita nos processos da nasalidade e em outros, como podemos constatar nos vários casos apresentados no Quadros 16, 17, 18 e 19.

No entanto, a turma D apresentou aumento de casos com desvios na nasalidade devido ao fato de as atividades propostas não estarem de acordo com a Zona de Desenvolvimento Proximal de 70% dos alunos, por isso os resultados não se mostraram satisfatórios nos casos de troca, apagamento e inserção da nasalidade. Durante as aplicações das aulas, essa turma se mostrou muito dispersa e com aparente falta de interesse nos assuntos tratados. E tudo isso se refletiu nos resultados da produção final. Essa análise contribuiu bastante para a verificação de que, para intervirmos pedagogicamente em determinada turma, faz-se necessária uma avaliação diagnóstica bem ampla e aprofundada, a fim de conhecer todos os fatores que podem influenciar no resultado de um trabalho. Dessa forma, evitamos propor atividades que se caracterizam por aquilo que o aluno pode oferecer. Outro fator importante é o caso dos alunos faltosos, pois 80% dos alunos com baixo rendimento na produção final eram faltosos.

No entanto, nossa IP reuniu aulas teóricas e práticas de Fonética e Fonologia, aliadas aos jogos pedagógicos, com os quais conseguimos contribuir para a ampliação da consciência fonológica dos alunos, já que essas aulas os fizeram refletir sobre os fonemas e as sílabas da Língua Portuguesa.

Todavia, entendemos que quatorze aulas não foram suficientes para turmas com mais dificuldades na escrita, como a turma D, conseguir apresentar melhores resultados. As pesquisas e os dados mostraram que é de suma importância a continuidade desse trabalho até que os participantes alcancem uma melhor adequação na escrita, tanto dos processos em torno da nasalidade quanto de outros.

Com certeza, a aplicação de uma IP, como a que propomos neste trabalho, alcançaria melhores resultados se realizada sem a preocupação de cumprir obrigações de um trabalho para conclusão de curso. Todavia, nosso empenho no desenvolvimento dos trabalhos foi intenso e pensamos ter contribuído positivamente para a ampliação do conhecimento dessas crianças. Além do mais, toda a aplicação da IP foi acompanhada pelas professoras-regentes das turmas, por isso esperamos também ter contribuído para o aprimoramento delas acerca de alguns princípios fonético-fonológicos, que, se incorporados ao cotidiano de sala de aula, podem colaborar para a continuidade do aprendizado que leve os alunos a escreverem com mais propriedade.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo teve como objetivo propor uma intervenção pedagógica pautada no estudo fonético e fonológico da língua que colabore para a melhoria do desempenho de alunos do quarto e quinto anos do EFI nos textos escritos, no que se refere à grafia de palavras com nasalidade.

A nossa experiência na docência no Ensino Fundamental contribuiu para o entendimento de que faltam ao professor da escola básica, na sua maioria pedagogos, estudos na área da Linguística, especificamente de Fonética e Fonologia. Essa disciplina, além de outras ramificações, dispõe de pesquisas que ajudam o professor a refletir sobre o nosso código oral e escrito, analisar dados e propor soluções para os problemas enfrentados em sala de aula, especialmente aqueles relacionados com a escrita. Outro fator que dificulta o trabalho do professor é a falta de tempo de que dispõe para elaborar as próprias intervenções pedagógicas, com base em pesquisas e análises. Esses foram problemas minimizados com o presente trabalho.

Nesse sentido, o presente trabalho cumpriu seus objetivos específicos, a saber: i) investigar as ocorrências de nasalidade em textos de alunos dos quarto e quinto anos do EFI; ii) pesquisar as causas dos desvios da representação da nasalidade em textos escritos de alunos do EFI; iii) elaborar atividades pedagógicas para sanar desvios de escrita da nasalidade.

Para orientar nossa pesquisa, levantamos algumas hipóteses: i) o professor com conhecimento fonético-fonológico da língua consegue ajudar o aluno na representação da nasalidade; ii) os problemas acerca da representação da nasalidade na escrita podem ser sanados com atividades nas quais são contempladas a consciência fonológica; iii) o estudo sobre a fonética articulatória pode ajudar na aquisição da escrita da nasalidade; iv) os jogos pedagógicos podem colaborar para a aquisição da escrita.

Para tanto, escolhemos aplicar nossa pesquisa em uma escola pública municipal da periferia de Trindade-GO, cujos participantes são alunos dos quarto e quinto anos, em um total de 96 discentes, na faixa etária entre nove e quatorze anos, pertencentes às classes baixa e média-baixa.

Esses participantes produziram textos narrativos, que compuseram o nosso *corpus* inicial. Dessa análise, constatamos a incidência de variados processos fonológicos, sobretudo aqueles relacionados à representação da nasalidade: troca, apagamento e inserção.

A análise do livro didático usado pela escola permitiu-nos compreender um pouco

mais sobre o motivo do insucesso dos alunos para grafar a nasalidade, dada a ineficácia das propostas contidas nos livros de primeiro, segundo e terceiro anos, que não colaboraram para sanar esses tipos de desvios até o terceiro ano do EFI. Além disso, nos livros de quarto e quinto anos não se oferecerem nenhuma atividade voltada para a representação da nasalidade. Diante desse contexto, iniciamos nossa pesquisa.

Nossa fundamentação teórica mostrou que o registro do apagamento da nasalidade se deve ao fato de o participante ainda estar no nível silábico-alfabético, no qual o escrevente tenta fazer uma simplificação da escrita, representando-a somente por sílabas simples, ou seja, o molde silábico CV (ABAURRE, 1988). A criança que troca a consoante nasal está no nível alfabético da escrita, pois ela já percebe a nasalidade, todavia não tem a consciência fonoarticulatória desse processo. Isso mostra que a criança não compreendeu ainda que a escolha da consoante nasal depende da característica das consoantes que entram em contato, no caso a nasal no final de uma sílaba com consoante inicial da outra sílaba (SEARA, NUNES E LAZZAROTTO-VOLCÃO, 2015). Os casos de inserção estão relacionados à representação fidedigna da fala, na qual a criança tem uma pronúncia nasalizada, no entanto sem representação na escrita.

Além dessas explicações, incorporamos ao nosso trabalho uma breve noção de vogais orais, vogais nasais, consoante e sílaba. Assim, constituímos nossa base fonética e fonológica necessárias para a aplicação de aulas teóricas e práticas em que os alunos desenvolveram a consciência fonológica, nos três níveis: silábico, intrassilábico e fonêmico. Dando enfoque ao nível fonêmico, desenvolvemos aulas em que os alunos puderam refletir sobre a articulação dos sons da Língua Portuguesa, aulas que possibilitaram a diminuição dos desvios de escrita da nasalidade nas produções finais dos participantes.

Esses participantes somaram 96 alunos matriculados nas turmas referidas. No entanto, foi necessário excluir 22 alunos da pesquisa devido a algumas particularidades, como: i) alunos que não fizeram a produção inicial ou a final, impossibilitando a análise comparativa entre o primeiro e o segundo texto; ii) alunos que só registraram garatujas em seus textos; iii) alunos que não registraram as palavras com nasalidade indicadas nas produções iniciais ou finais.

Das 74 produções iniciais restantes verificamos desvios variados em 1468 palavras, sendo 455 em palavras com nasalidade. Sendo, 266 palavras apresentaram troca da nasalidade, 173 eram casos de apagamento da nasalidade e dezesseis continham inserções da nasalidade. A aplicação da produção inicial e da produção final foram, respectivamente a primeira e a última aula da IP, um total de doze aulas, sendo as demais, quatro aulas teóricas

(1ª - vogais orais; 2ª - vogais nasais; 3ª - consoantes - 4ª sílaba), quatro aulas com jogos (Caça-palavras Nasal, Memória nasal, Bingo dos pares mínimos e Baralho de Sílabas) e duas aulas com o alfabeto móvel.

Nossa IP apresentou aulas que tinham como objetivo provocar uma reflexão fonoarticulatória e fonológica da Língua Portuguesa que, conseqüentemente fez com que as crianças desenvolvessem a consciência fonológica em três níveis: o silábico, o intrassilábico e o fonêmico. Esses níveis tiveram grande importância em nossas aulas teóricas, haja vista que elas requisitaram do aluno a necessidade de esmiuçar e/ou montar palavras.

As aulas teóricas trouxeram para a sala de aula a reflexão fonoarticulatória, buscando apresentar de uma forma inovadora a articulação das vogais e consoantes. Para tanto, o espelho foi de fundamental importância ao levar as crianças a perceberem o formato da boca e a posição dos articuladores passivos e ativos na produção dos sons da nossa língua. O alfabeto móvel foi utilizado em duas aulas, nas quais os alunos refletiram fonemicamente ao construir palavras retiradas dos quadros de amostragem apresentados no capítulo 5 desta dissertação, intitulado “Análise dos dados coletados”, as quais apresentaram desvios de escrita na produção inicial dos alunos, tais como: *tambor, fazenda, cantor, pomba, banda, carpinteiro, sombra, grande, enxada, cachimbo, símbolo, tampa, comprar, quando, brincar, sempre, bagunça e bombeiro*.

Em outra aula, os alunos construíram e dividiram em sílabas as palavras indicadas, observando os variados moldes silábicos encontrados na nossa língua. Pensamos que foi devido a essas aulas que as ocorrências de vários outros processos fonológicos diminuíram na produção final de muitos participantes. Foi emocionante ouvir as exclamações das crianças quando percebiam a modificação da articulação para cada vogal. Ou quando riam devido às particularidades sonoras de algumas consoantes. Realmente as crianças conseguiram explicar como ficaram os articuladores passivos e ativos na produção dos sons vocálicos e consonantais.

Nas aulas teóricas sobre consoantes e sílaba, orientamos que, ao escrevermos palavras com nasalidade, devemos optar pela consoante nasal bilabial *m* se depois dela vier outra consoante bilabial, *p* e *b*. Da mesma forma, optaremos pela consoante não-bilabial *n*, se após ele vier uma consoante não-bilabial *c, d, f, g, j, l, q, r, s, t, v, x* e *z*.

Em nossa IP, apostamos no potencial dos jogos em duplas, colocando em prática os preceitos de Vigotsky (2007), como os conceitos de desenvolvimento, aprendizagem, mediação, instrumentos de mediação e zona de desenvolvimento proximal. O espelho, os jogos e o alfabeto móvel funcionaram como objetos de mediação da aprendizagem, usados

com a colaboração de um mediador, ou o professor ou o colega, afim de que o participante adquirisse mais um nível de desenvolvimento.

Com o objetivo de refletir sobre os sons e sílabas do Português e tentar desenvolver o lúdico, a criatividade e a vivência em equipes no ensino da Língua Portuguesa, criamos quatro jogos – Caça-palavras Nasal, Memória Nasal, Bingo da Nasalidade e Baralho de Sílabas – que foram elaborados a partir de palavras constantes das produções iniciais dos participantes ou da lista de pares mínimos apresentada na seção “Procedimentos de elaboração da intervenção pedagógica”. Apesar das aulas um pouco ruidosas, a participação, o envolvimento e a interação entre as crianças durante os jogos foram ótimos.

Durante toda a aplicação da IP, registramos os conceitos aprendidos na Lista de Constatação, cartazes afixados na sala, pelos quais fazíamos a retomada e a conclusão de cada aula. Esse procedimento já estava previsto em nossa intervenção, entretanto, ao conviver com as turmas participantes, passamos a dar maior importância a esses momentos, pois alguns participantes eram faltosos. A não participação na totalidade das aulas implicou queda no aproveitamento de alguns alunos. Em uma rápida verificação, constatamos que 80% dos alunos que não obtiveram êxito na produção final eram faltosos. Esse fator não foi possível controlar, pois é uma constante no cotidiano das turmas.

Terminada a aplicação da IP, passamos à análise dos dados das 74 produções finais. Primeiramente, constatamos que, na produção inicial, sete (9,4%) textos não apresentaram desvios da escrita da nasalidade e, na produção final, esse número passou para nove (12,1%). Após, contabilizados os participantes que conseguiram diminuir as ocorrências de troca, apagamento e inserção da nasalidade, temos 31 alunos, total de 41,8% do total de participantes. Outros dezessete alunos (22, 9%) não conseguiram sanar os desvios de escrita da nasalidade, todavia apresentaram menos ocorrências de outros processos fonológicos²⁶. Apenas dez alunos (13,5%) não apresentaram nenhuma mudança do padrão de escrita em suas produções finais.

Conclui-se com este trabalho que problemas de escrita da nasalidade podem ser sanados com atividades pedagógicas baseadas em pressupostos teóricos advindos da Fonética e da Fonologia, aliadas à reflexão fonológica por meio do despertar da consciência fonológica e fonoarticulatória dos alunos, fazendo com que eles construam e desconstruam as palavras.

Outra conclusão a que se chega é a de que a ludicidade precisa ser incorporada ao cotidiano da sala de aula, para que, por meio da interação e do envolvimento emocional, as

²⁶Neutralização, alçamento vocálico, ditongação, monotongação, vocalização do L, troca de sonora-surda e surda-sonora, apagamento da vibrante r em posição final, hipossegmentação, hipersegmentação e outros.

crianças se sintam mais desafiadas a aprender e o façam brincando com músicas, brinquedos e jogos. Passamos quatorze aulas com as turmas e os alunos escreveram em apenas três delas: na produção inicial, na listagem de oito palavras que deveriam procurar no caça-palavras e na produção final. Não houve aquela torturante tarefa de copiar enormes textos.

Para que escrevam com mais propriedade, as crianças precisam da reflexão linguística, que mesmo na mais tenra idade é possível se instigar. Após a reflexão, que venha a prática linguística motivada pela consciência fonológica, pensando no viés microestrutural, o que tem faltado nas atuais propostas didáticas. A sala de aula está repleta de atividades nas quais se pensa, interpreta-se, produz-se o texto. Entretanto, as crianças precisam refletir acerca das estruturas menores que formam esse texto, o qual é formado por uma estrutura menor, a palavra. A palavra é formada por uma estrutura menor, a sílaba, que por sua vez é formada por letras, que por sua vez representam uma realidade sonora. E essas unidades constroem o texto.

Pensamos que há muito que se fazer para minimizar os problemas causados por uma alfabetização deficitária. Para muitas crianças, a solução é urgente. Ou isso ou teremos mais analfabetos funcionais vivendo à margem da sociedade. Para o momento, fica a felicidade do dever cumprido e o compromisso de continuar colaborando para a melhoria da Educação do nosso país.

No mais, esperamos que este trabalho suscite nos professores a vontade de trilhar pelos caminhos da Fonética e da Fonologia e, por meio deles, encontrarem respostas às dúvidas advindas da prática de escrita de seus alunos.

7 REFERÊNCIAS

- ABAURRE, M.B.M. O que revelam os textos espontâneos sobre a representação que a criança faz do objeto escrito. In: KATO, M. (Org.) **A concepção da escrita pela criança**. 2. ed. Campinas, SP: Pontes, 1988, p. 135-142.
- ABAURRE, M.B.M.; PAGOTTO, E.G. Nasalização do Português do Brasil. In: KOCH, I.G.V. (Org.). **Gramática do Português falado**. Campinas: Fapesp, 1996. p.495-526, (Vol. VI).
- ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 14.724, de 17.03.2011**. Informação e documentação, trabalhos acadêmicos, apresentação. Válida a partir de 17.04.2011. Rio de Janeiro, 2011.
- ADAMS, M. J. et al. **Consciência fonológica em crianças pequenas**. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- ALBUQUERQUE, E.; LEAL, T. **Alfabetização: apropriação do sistema de escrita alfabética**. Belo Horizonte: Autêntica, 2005, p. 71-88.
- ALENCAR, E. S. de; FLEITH, D. de S. **Criatividade: múltiplas perspectivas**. 3.ed. Brasília: Universidade de Brasília, 2003, 2009 (reimpressão).
- ALVES, U. K. O que é consciência fonológica? In: LAMPRECHT, R. et al. **Consciência dos sons da língua: subsídios teóricos e práticos para alfabetizadores, fonoaudiólogos e professores de língua inglesa**. Porto Alegre: Edipucrs, 2012. 352p.
- ANTUNES, C. **A Teoria das Inteligências Libertadoras**. 2. ed. Petrópolis, RJ: Vozes, 2000.
- ANTUNES, I. **Língua, texto e ensino: outra escola possível**. São Paulo: Parábola, 2009.
- BATTISTI, E.; VIEIRA, M. J. B. O sistema vocálico do Português. In: BISOL, L. (Org.) **Introdução aos estudos de fonologia do português brasileiro**. 3. ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2001. p. 159-194.
- BISINOTTO, A.G.; SILVA, L.L.P. A contribuição de estudos fonéticos e fonológicos na formação do docente alfabetizador. **Revista de Divulgação Científica em Língua Portuguesa**, Linguística e Literatura, ano 09, n.16, 1º sem. de 2013.
- BISOL, L. **Fonética e Fonologia na alfabetização**. Porto Alegre: PUC-RS, URGs, 1974.
- _____. A nasalidade, um velho tema. **D.E.L.T.A.** n. 14(especial), p. 27-46, 1998.
- _____. (Org.) **Introdução aos Estudos de Fonologia do Português Brasileiro**. 4. ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2005.
- BORTONI-RICARDO, S. M. Métodos de alfabetização e consciência fonológica: o tratamento de regras de variação e mudança. **SCRIPTA**, Belo Horizonte, v. 9, n. 18, p. 201-220, 1º sem. 2006.
- BRASIL. **Parâmetros Curriculares Nacionais: 2. Língua Portuguesa**. Brasília: Ministério da Educação, Secretaria de Educação Fundamental, 144p.
- CALLOU, D.; LEITE, Y. **Introdução à Fonética e à Fonologia**. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 2003.

CAMARA JR., J. M. **Estrutura da Língua Portuguesa**. Petrópolis: Vozes, 1970.

_____. **Problemas de linguística descritiva**. Petrópolis: Vozes, 1998.

CAPOVILLA, A.G.S.; DIAS, N.M.; MONTIEL, J.M. Desenvolvimento dos componentes da consciência fonológica no Ensino Fundamental e correlação com a nota escolar. **Psico**, USF, 12(1), p. 55-64.

CARPANEDA, I.P. de M.; BRAGANÇA, A. D. **Porta Aberta: letramento e alfabetização**, 1º, 2º, 3º, 4º e 5º. São Paulo: FTD, 2011.

CHEN, L.F.; VOKES, E.E. **Peptic ulcer diseases**. ACP Medicine, 2008.

COLLISCHONN, G. A Sílabas em Português. In: BISOL, L. (Org.). **Introdução aos Estudos de Fonologia do Português Brasileira**. Porto Alegre: EDIPURS, 2005. p.101-133.

COSTA, S. D. **Fonologia do Português**. (Apostila) Monte Carmelo: Funcamp, 2014.

CRISTÓFARO-SILVA, T.; YEHA, H. C. **Sonoridade em Artes, Saúde e Tecnologia**. Belo Horizonte: Faculdade de Letras, 2009. Disponível em: <<http://Fonologia.org>>. Acesso em: junho/2016.

DOHME, V. D'A. **32 ideias divertidas que auxiliam o aprendizado**. Série Ideias. São Paulo: Informal, 1998.

DOMINGOS, M. S. **Nasalidade Vocálica em Português: Pistas para identificação forense de falantes**. Tese de Mestrado em Linguística, LISBOA, 2011.

FERREIRA NETO, C. A. **Matricidade e Jogo na Infância**. Rio de Janeiro: Sprint, 1996.

FERREIRO, E.; TEBEROSKY, A. **Psicogênese da Língua Escrita**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1985.

FREITAS, G. C. M. **Consciência fonológica e aquisição da escrita: um estudo longitudinal**. Tese (doutorado em Letras), PUCRS, Porto Alegre, 2004.

GINDRI, G.; KESKE-SOARES, M.; MOTA, H.B. **Memória de trabalho, consciência fonológica e hipótese de escrita**. *Pró-Fono*, 19(3), p. 313-22, 2007.

HORA, D. da. **Fonética e Fonologia**. Disponível em: <http://biblioteca.virtual.ufpb.br/files/fonatica_e_fonologia_1360068796.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2015.

KISHIMOTO, T.M. (Org.). **Jogo, brinquedo, brincadeira e a educação**. 4. ed. São Paulo: Cortez, 2000.

KOSHINO, I.L.; MARTINS, J.B. Questões do desenvolvimento infantil em Vygotsky e seus desdobramentos para educação. **Anais...** X Congresso nacional de Educação- EDUCERE, PUC-PR, 2011.

LAMPRECHT, R. et al. **Consciência dos sons da língua: subsídios teóricos e práticos para alfabetizadores, fonoaudiólogos e professores de língua inglesa**. Porto Alegre: Edipucrs, 2012. 352p.

LEMLE, M. **Guia Teórico do Alfabetizador**. São Paulo: Ática. 2000.

LUCKESI, C.C. Desenvolvimento dos estados de consciência e ludicidade. **Cadernos de Pesquisa**, do Núcleo de FAGED/UFBA, vol. 2, n.21, 1998.

MACEDO, L. de; PETTY, A. L. S.; PASSOS, N. C. **Aprender com jogos e situações-problema**. Porto Alegre: Artmed, 2000. p.13-27

MATZENAUER, C.L.B. Introdução à teoria fonológica. In: BISOL, L. (org.). **Introdução a estudos de fonologado português brasileiro**. 4 ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2005, v. 1, p. 11-81.

MENDONÇA, C. S. I. de. A sílaba em fonologia. In: **Programa de Pós-Graduação PG-UFSC. Workingpapers em Linguística**. Florianópolis, UFSC, n.7, 2003.

MOOJEN, S. et al. **CONFIAS – Consciência Fonológica**: instrumento de avaliação sequencial. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2003. 38 p.

MORAIS, A. G.; ALBUQUERQUE, E. B. C. de; LEAL, T. F. (Org.). **Alfabetização: apropriação do sistema de escrita alfabética**. Belo Horizonte: Autêntica, 2005.

MORAIS, A. G.; LEITE, T.S. Como promover o desenvolvimento das habilidades de reflexão fonológica dos alfabetizandos? In MORAIS, A.; ALBUQUERQUE, E.; LEAL, T. **Alfabetização: apropriação do sistema de escrita alfabética**. Belo Horizonte: Autêntica, 2005, pp. 71-88.

MORAIS, J. Phonological awareness: a bridge between language and literacy. In.: SAWYER, Diane J., FOX, Barbara J. **Phonological awareness in reading – the evolution of current perspectives**. New York: Springer-Verlag, 1990.

NOBILE, G. G.; BARRERA, S. D. Análise de erros ortográficos em alunos do ensino público fundamental que apresentam dificuldades na escrita. **Psicologia em Revista**, 15, 36-55, 2009.

OLIVEIRA, M. A. de. Da forma sonora da fala. A forma gráfica da escrita. **Cadernos de Estudos Linguísticos**, v. 16, n.2, p. 5-30, 1989.

_____. **Conhecimento linguístico e apropriação do sistema de escrita**: caderno do formador. Belo Horizonte: Ceale/FaE/UFMG, 2005.

_____. A apropriação do princípio alfabético: compreensão do processo. **Revista Virtual de Estudos da Linguagem**. 2005; 3(5). Disponível em: <<http://www.revelhp.cjb.net>> Acesso em: dez. 2006.

OLIVEIRA, M. A. de; NASCIMENTO, M do. Da análise de erros aos mecanismos envolvidos na aprendizagem da escrita. **Educacao em revista**, v. 12, n.1, p. 33-43, 1990.

OTHERO, G. Á. Processos fonológicos na aquisição da linguagem pela criança. **ReVEL**, v. 3, n. 5, 2005. Disponível em: www.revel.inf.br. Acesso em: 27 jun. 2015.

PATRÍCIO, C. de O. P. **O letramento na alfabetização de jovens e adultos - a importância dos jogos educativos no processo de educação de jovens e adultos**. Disponível em <http://www.cereja.org.br/arquivos_upload/20041029_cristiane.pdf> Acesso em: ago. 2016.

PIAGET, J. **A formação do símbolo na criança: imitação, jogo, imagem e representação**. Rio de Janeiro: ZAHAR, 1976.

_____. **Nascimento da inteligência na criança**. ed. Rio de Janeiro: Zahar, 1978.

PINTO, G. R.; LIMA, V. R. C. **O Dia-a-Dia do Professor**. Jogos Pedagógicos no Processo Ensino-Aprendizagem. 2. ed. Belo-Horizonte, MG: Fapi.

QUEIROGA, B. A. M. de; ZORZI, J. L.; GARCIA, V. L. (org.) **Fonoaudiologia Educacional**: reflexões e relatos experiência. Brasília: Kiron, 2015.

RIZZO, G. **Jogos Inteligentes**: a construção do raciocínio na escola natural. Rio de Janeiro: Bertrand. Brasil, 1998.

SANTOS, R.M. Sobre consciência fonoarticulatória. In: LAMPRECHT R., et al. **Consciência dos sons da língua**: subsídios teóricos e práticos para alfabetizadores, fonoaudiólogos e professores de língua inglesa. Porto Alegre: Edipucrs; 2012. 352p.

SCLIAR-CABRAL, L. **Princípios do sistema alfabético do Português do Brasil**. São Paulo: Contexto, 2003.

SEARA, I. C.; NUNES, V. G.; LAZZAROTTO-VOLCÃO, C. **Fonética e Fonologia do Português brasileiro**. 2º período. Florianópolis: LLV/CCE/UFSC, 2015.

SIGNORINI, A. **La conciencia fonológica y la lectura**. Teoría e investigación acerca de una relación compleja. Lectura y Vida, set. 1998.

SILVA, A. H. P. **Língua Portuguesa I**: fonética e fonologia. Curitiba: IESDE Brasil, 2007.

SILVA, C. Aprender ortografia: o caso das regras contextuais. **Análise Psicológica**(2009), 4 (XXVII): 553-561.

SILVA, C. C. **Aquisição da regra de assimilação de vozeamento em Português brasileiro**. São Paulo: FFLCH/USP, 2010. 206 p. (Produção acadêmica premiada).

SILVA, T.C. **Fonética e Fonologia do Português**: roteiro de estudos e guia de exercícios. São Paulo: Contexto, 2002.

VIGOTSKY, L. S. **A formação social da mente**: o desenvolvimento dos processos psicológicos superiores. 7. ed. São Paulo: Martins Fontes, 2007.

WEISS, H. E. **Fonética articulatória**. Guia e exercícios. 2. ed. Brasília: SIL, 1980.

WETZELS, Leo. Mid vowel neutralization in Brazilian Portuguese. **Cadernos de Estudos Linguísticos**, Campinas, SP: 23: 1992, 19-55.

ZORZI, J. L. **Aprendizagem e distúrbios da linguagem escrita**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

Sites consultados:

<<https://www.ufpe.br/cead/eletras/fonologiaFonologia/index.php?pag=abertura>>

<<http://www.paulohernandes.pro.br/glossario/e/epentese.html>> (pesquisado em 13/01 às 9:15 horas)

ANEXOS

Anexo 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE LETRAS E LINGUÍSTICA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado(a) senhor(a), o(a) menor, pelo qual o(a) senhor(a) é responsável, está sendo convidado(a) para participar da pesquisa intitulada A NASALIDADE NA ESCRITA DE ALUNOS DO QUARTO E QUINTO ANOS DO ENSINO FUNDAMENTAL I – ANÁLISE DESCRITIVA E INTERVENÇÃO PEDAGÓGICA, sob a responsabilidade do pesquisador Prof^o Dr^o José Sueli Magalhães.

Nesta pesquisa, nós buscamos pesquisar sobre os processos fonológicos em torno da nasalidade são encontrados em textos escritos de alunos de quarto e quinto anos, e propor a elaboração de intervenção pedagógica para sanar dificuldades fonético-fonológicas apresentadas.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pela assistente de pesquisa Éllis Márcia Batista Rodrigues, no horário normal de aula, na Escola Municipal João de Deus Guimarães. Na participação do(a) menor, ele(a) produzirá textos e responderá atividades pedagógicas, as quais serão coletadas para futuras análises. Em nenhum momento o(a) menor será identificado(a). Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

O(A) menor não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa. O risco, da participação do(a) menor na pesquisa, consiste na possibilidade de ser identificado como sujeito de pesquisa, o que contraria a Resolução CNS 466/12. Contudo, a equipe executora se compromete com o sigilo absoluto da identidade do menor, portanto ele (a) na corre risco algum na participação da pesquisa. Os benefícios que podem acontecer caso aceite participar da pesquisa, é contribuir para a criação de atividades pedagógicas que podem ajudar as crianças escreverem adequadamente palavras com nasalidade.

O(A) menor é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o(a) senhor(a), responsável legal pelo(a) menor.

Se você tiver alguma dúvida ou caso aconteça algo errado, você pode nos procurar no endereço: Reitoria da Universidade Federal de Uberlândia - Av. João Naves de Ávila, 2121 - Santa Mônica, Uberlândia - MG, 38408-100 ou pelo fone: (34) 3239-4411. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-3239-4131.

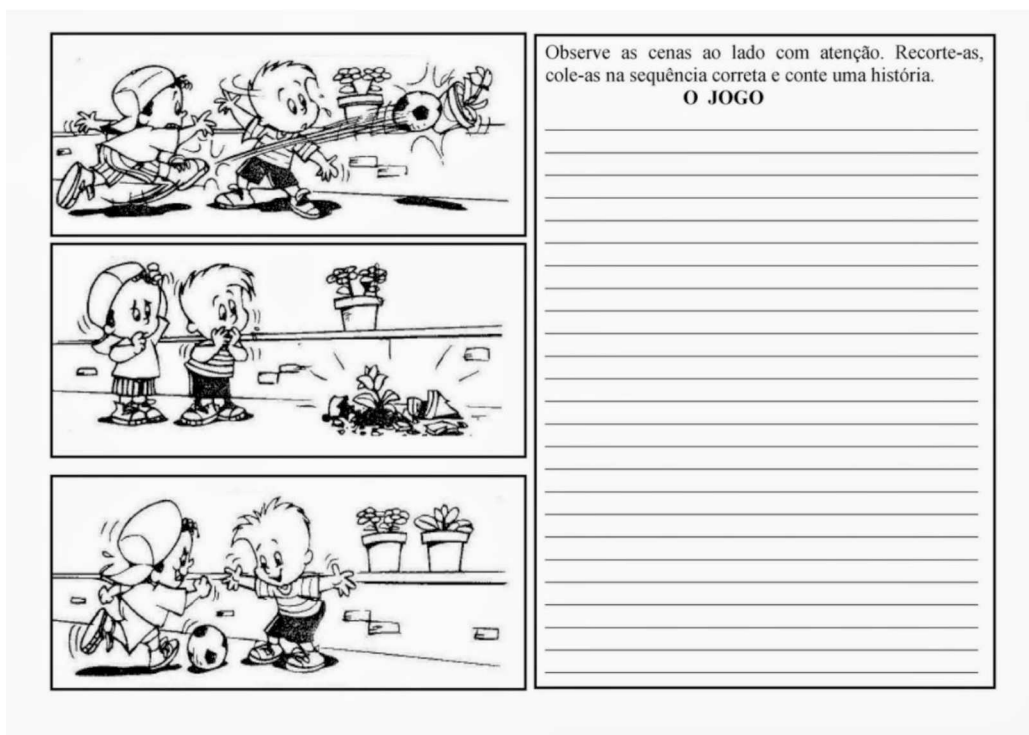
Trindade-GO, ____ de _____ de 2016.

Prof. Dr. José Sueli de Magalhães


Eu, _____ responsável legal pelo(a)
menor _____ consinto na sua participação no projeto citado acima, caso
ele(a) deseje, após ter sido devidamente esclarecido.

Responsável pelo (a) menor participante da pesquisa

Anexo 2- Produção de texto 1 para coleta de dados



Anexo 3- Produção de texto 2 para coleta de dados

	<p>Observe a cena ao lado com atenção. Conte uma história usando-a.</p> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>
---	---

Anexo 4- Produção de texto 3 para coleta de dados



3º produção de texto. Observe a sequência ao lado, enumere os quadros na ordem em que os fatos acontecem e escreva uma história em que você seja um dos personagens.

CÓDIGO DO ALUNO: _____

This image shows a single sheet of white paper with horizontal blue or grey ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There is no handwriting or other markings on the paper.


Anexo 5- Material para o Jogo de Memória da Nasalidade

ABAS	AMBAS	AJO	ANJO	ATA	ANTA	ATENAS	ANTENAS
BABA	BAMBA	BACO	BANCO	BOBA	BOMBA	CADEIA	CANDEIA
CAÍDO	CAINDO	CAPO	CAMPO	CASA	CANSA	CATA	CANTA
CATO	CANTO	CITO	CINTO	COTA	CONTA	FICA	FINCA
FUGA	FUNGA	GRADE	GRANDE	FRACO	FRANCO	JUTA	JUNTA
LEBRE	LEMBRE	LEDA	LENDIA	LIDA	LINDA	LIPO	LIMPO
LOBO	LOMBO	MATA	MANTA	MATO	MANTO	METE	MENTE
MITO	MINTO	MUDO	MUNDO	PACA	PANCA	PAPA	PAMPA
PESA	PENSA	POPA	POMPA	POTE	PONTE	PRATO	PRANTO
QUE	QUEM	QUINCA	QUICA	RAPA	RAMPA	SACA	SANCA
SEDA	SENDIA	SETA	SENTA	SI	SIM	SOBRA	SOMBRA
TAPA	TAMPA	TATO	TANTO	TRAÇA	TRANÇA	TROCO	TRONCO
TUBA	TUMBA	VETO	VENTO	JOGO DE MEMÓRIA 	JOGO DE MEMÓRIA 	JOGO DE MEMÓRIA 	JOGO DE MEMÓRIA 

Anexo 6 - Material para o Bingo da Nasalidade

Lista de palavras:

B	I	N	G	O
B abas	I cata	N Leda	G papa	O seta
B ambas	I canta	N lenda	G pampa	O senta
B ajo	I cato	N lida	G pesa	O se
B anjo	I canto	N linda	G pensa	O sem
B ata	I cito	N lipo	G popa	O sobra
B anta	I cinto	N limpo	G pompa	O sombra
B Atenas	I cota	N lobo	G pote	O tato
B Antenas	I conta	N lombo	G ponte	O tanto
B baba	I dó	N Mata	G prato	O tapa
B bamba	I dom	N manta	G pranto	O tampa
B baco	I fica	N mato	G que	O traça
B banco	I finca	N manto	G quem	O trança
B boba	I fraco	N mete	G Quinca	O troco
B bomba	I franco	N mente	G quica	O tronco
B cadeia	I fuga	N mito	G rapa	O tuba
B candeia	I funga	N minto	G rampa	O tumba
B caído	I grade	N mudo	G ri	O vê
B caindo	I grande	N mundo	G rim	O vem
B capo	I juta	N nu	G saca	O veto
B campo	I junta	N num	G sanca	O vento
B casa	I lebre	N paca	G seda	O vi
B cansa	I lembre	N panca	G senda	O vim


B	I	N	G	O
ATENAS	CANTA	NUM	PRANTO	SEM SENTA
ATA	FRANCO	MATO	RAMPA	VI
CAPO	COTA		PAMPA	VETO
BAMBA	FRACO	MINTO	PENSA	SENTA
BANCO	DÓ	MUNDO	PRANTO	TRANÇA

B	I	N	G	O
CADEIA	CATA	PANCA	SEDA	SETA
ANTA	FUGA	METE	RIM	SOMBRA
BOMBA	JUNTA		PAPA	TRONCO
CAÍDO	FINCA	MITO	POTE	TUMBA
ATENAS	JUTA	LOMBO	POMPA	TAMPA


B	I	N	G	O
ANJO	CITO	MITO	RI	SEM
CANDEIA	FRACO	LINDA	QUE	SOBRA
ATENAS	GRANDE		POPA	TRANÇA
CANSA	LEMBRE	PACA	QUICA	TATO
CAPO	DÓ	LIDA	SENDA	VETO


B	I	N	G	O
CADEIA	CONTA	MINTO	RAMPA	SEM
ATA	CATO	MATA	RIM	TRAÇA
BABA	GRADE		SACA	VENTO
AMBAS	JUTA	LIMPO	PRATO	TROCO
BOBA	DOM	NU	PONTE	TUBA

B	I	N	G	O
BOMBA	CINTO	MINTO	RIM	SOBRA
BACO	CATO	LEDA	PAMPA	VI
BABA	FRACO		POPA	VENTO
ANJO	LEBRE	MANTA	SANCA	VETO
CAPO	CANTA	MATO	PAPA	VEM


B	I	N	G	O
CAMPO	CATA	LIPO	POTE	VIM
CASA	DÓ	MUNDO	PAMPA	TANTO
CADEIA	COTA		POMPA	VÊ
BOMBA	FUGA	MATO	PRANTO	TAPA
AJO	FRANCO	LEDA	QUINCA	TUMBA

B	I	N	G	O
CAÍDO	CATO	NUM	PRATO	SOBRA
BACO	LEBRE	LOMBO	QUEM	TAMPA
CAINDO	JUNTA		RAPA	VEM
BOMBA	CINTO	LINDA	SANCA	TRONCO
BAMBA	FUGA	LIDA	SACA	VÊ


B	I	N	G	O
AMBAS	GRADE	LOBO	POMPA	SE
ABAS	FRANCO	MUDO	PESA	TAPA
BAMBA	CINTO		QUICA	SOMBRA
BABA	CATO	MANTO	QUE	VEM
CAÍDO	JUTA	PACA	PAPA	TUMBA

B	I	N	G	O
BAMBA	DÓ	MANTO	PRATO	SE
ANTA	CANTO	LIMPO	POMPA	TROCO
BABA	CATA		PONTE	TUMBA
CAINDO	CITO	LENDA	QUE	SENTA
ATENAS	CANTA	LOBO	PAPA	VI


B	I	N	G	O
CADEIA	JUNTA	METE	SENDA	SE
BACO	FUNGA	CANTA	CINTO	SEM
CASA	CANTA		RAPA	TAMPA
CAPO	CINTO	NU	POTE	SOMBRA
ANTENAS	LEBRE	LEDA	QUEM	TUBA


B	I	N	G	O
ATENAS	LEBRE	MATA	SANCA	SENTA
BOMBA	GRADE	LIPO	POPA	TAMPA
BANCO	JUTA		PENSA	VENTO
CAPO	COTA	NU	PAPA	VI
BABA	FICA	MUDO	QUEM	TUBA


B	I	N	G	O
BABA	DÓ	MANTA	PRANTO	TANTO
ANTA	CINTO	LIDA	QUEM	SOBRA
AMBAS	CATO		SANCA	VETO
BOMBAS	FRANCO	LINDA	QUICA	SETA
CADEIA	JUTA	MATA	PENSA	VIM


B	I	N	G	O
ABAS	LEBRE	MINTO	RAPA	VIM
ATA	FINCA	PACA	QUICA	TAMPA
BANCO	COTA		RAMPA	SOMBRA
BABA	DÓ	MUNDO	RI	TRANÇA
ANTENAS	FRACO	LINDA	SEDA	TRONCO

B	I	N	G	O
ABAS	LEBRE	LOBO	RIM	TAMPA
CASA	CINTO	LOMBO	QUICA	VETO
CAINDO	DÓ		PRATO	SOBRA
CAMPO	FUNGA	MATA	POMPA	SEM
CANDEIA	GRADE	MITO	PENSA	TUMBA

B	I	N	G	O
CAMPO	FICA	LOBO	QUICA	TRONCO
CAÍDO	CANTA	MANTA	RAPA	TRANÇA
ANTENAS	FUNGA		RIM	TANTO
CADEIA	JUTA	LOMBO	PAPA	VÊ
ANJO	LEMBRE	METE	SEDA	VEM


B	I	N	G	O
CADEIA	CATA	MUDO	QUINCA	VI
CAINDO	FICA	LOMBO	RIM	TUMBA
CAÍDO	CANTO		SANCA	TRAÇA
AJO	CANTA	METE	SEDA	TATO
BANCO	CINTO	MUNDO	POMPA	VEM


B	I	N	G	O
CAINDO	JUTA	LOBO	PESA	TUMBA
ABAS	CATO	MANTO	PONTE	SE
CAPO	DOM		SEDA	TUBA
ANJO	FUGA	MINTO	QUEM	SOBRA
BAMBA	LEMBRE	MUNDO	QUE	VENTO


B	I	N	G	O
ATA	FRACO	MANTO	SENDA	VÊ
BOMBA	FINCA	NUM	PONTE	VETO
BANCO	DÓ		QUINCA	TRAÇA
CAINDO	CATO	MUNDO	PAPA	SEM
BACO	LEMBRE	LOBO	POMPA	SOMBRA

B	I	N	G	O
BOMBA	GRANDE	MUNDO	PRATO	SENTA
BABA	CANTA	NU	QUEM	VEM
CASA	JUNTA		PRANTO	SOBRA
BOBA	CINTO	PACA	QUE	SE
ANJO	GRADE	MENTE	TANTO	TANTO


B	I	N	G	O
CAÍDO	DOM	MANTO	RAPA	SOBRA
BABA	FRACO	MATA	PENSA	SENTA
BOBA	CANTA		RI	SE
ATENAS	FUNGA	PACA	QUE	VI
BANCO	GRADE	LIDA	PAPA	VETO

B	I	N	G	O
CAÍDO	GRADE	PANCA	SEDA	SE
CADEIA	FRANCO	LIDA	PESA	SEM
BABA	DOM		RIM	TAMPA
CANSA	CATA	MUNDO	QUICA	VEM
CAMPO	GRANDE	LIMPO	SENDA	SOBRA


B	I	N	G	O
CADEIA	LEMBRE	LOBO	PENSA	VEM
BACO	LEBRE	MITO	PONTE	VETO
BABA	FRACO		SANCA	VIM
CAPO	DÓ	MATA	POPA	VENTO
AMBAS	JUTA	LOMBO	PESA	SOBRA


B	I	N	G	O
AMBAS	FINCA	MANTA	PENSA	VÊ
AJO	FUGA	METE	PAMPA	TATO
CAINDO	CANTO		SENDA	TANTO
BACO	CANTA	LIPO	QUICA	TRANÇA
BOMBA	FUNGA	MITO	POPA	TROCO

B	I	N	G	O
CADEIA	CINTO	MANTA	SACA	VI
CAPO	LEMBRE	MUNDO	PAMPA	VENTO
ANTA	CATO		POMPA	TAMPA
AMBAS	CATA	MATA	PAPA	SEM
CASA	JUTA	LOBO	RI	TANTO

B	I	N	G	O
AJO	JUTA	MUDO	RIM	SETA
ATENAS	FUNGA	LIMPO	SEDA	VENTO
BANCO	FUGA		PONTE	VEM
CAMPO	FRANCO	MATA	POPA	TROCO
BOBA	FINCA	LOMBO	POTE	SEM

B	I	N	G	O
CAPOO	CINTO	MATO	RAPA	VENTO
BABA	GRANDE	MANTO	POMPA	TUBA
BAMBA	LEMBRE		SEDA	TRONCO
ANJO	GRADE	PACA	SACA	VÊ
BACO	CITO	METE	RI	SOBRA


B	I	N	G	O
ANJO	JUNTA	LIDA	RAMPA	TROCO
AJO	COTA	PANCA	PENSA	SEM
BACO	DOM		PESA	SE
AMBAS	LEMBRE	PACA	QUINCA	VIM
BABA	DÓ	MINTO	SEDA	TUMBA

B	I	N	G	O
ATA	DOM	LENDA	QUE	SOMBRA
AJO	CATO	MANTO	QUE	VETO
CAPO	CONTA		PAPA	TROCO
ATENAS	COTA	LOBO	SACA	VIM
BABA	CANTO	PACA	PRANTO	SETA


B	I	N	G	O
ANTA	CANTA	METE	RAPA	SOBRA
BABA	DOM	MANTO	POTE	SEM
AMBAS	DÓ		SEDA	TRAÇA
CAPO	LEBRE	MITO	PRANTO	TAMPA
ANJO	CINTO	LIDA	PESA	VETO

B	I	N	G	O
BOBA	CATA	MATO	PRANTO	VIM
CAPO	CATO	PACA	SANCA	SENTA
ATENAS	COTA		QUE	SETA
ANJO	DOM	LOBO	RI	TROCO
BANCO	FRANCO	MANTA	QUINCA	TRONCO


B	I	N	G	O
ATENAS	CANTO	MITO	RAMPA	TRONCO
BOMBA	CATA	PACA	PENSA	TROCO
ANJO	CITO		SENDA	TUMBA
BAMBA	LEBRE	MENTE	PAPA	TAMPA
CAMPO	CONTA	METE	SACA	TUBA


B	I	N	G	O
BANCO	LEMBRE	LOBO	PAMPA	VENTO
BAMBA	FINCA	LIDA	RAPA	TANTO
ATENAS	FRANCO		PENSA	TRANÇA
CADEIA	CATO	NUM	SACA	TAPA
BOMBA	CITO	MENTE	PRATO	VETO

B	I	N	G	O
CAINDO	JUTA	LIPO	POMPA	TUMBA
CAPO	FICA	LIMPO	SANCA	VÊ
AJO	CINTO		SENDA	TRONCO
ATA	FUNGA	MUDO	PRANTO	SETA
CADEIA	CANTA	LIDA	RIM	TRANÇA

B	I	N	G	O
AMBAS	JUTA	PACA	POMPA	SOBRA
ANTA	DÓ	NUM	RAMPA	SOMBRA
ATA	CANTO		POPA	TUBA
BACO	LEMBRE	LIMPO	PRATO	VI
CAPO	LEBRE	MUNDO	SANCA	SE

B	I	N	G	O
BANCO	FINCA	PANCA	SEDA	TRONCO
ANJO	COTA	METE	SACA	VIM
ANTA	JUNTA		PRANTO	SOMBRA
CASA	FRANCO	LOBO	POTE	VI
ABAS	CINTO	MATO	RI	SOBRA

B	I	N	G	O
ABAS	CINTO	MUNDO	RI	TRANÇA
CAINDO	DOM	MANTA	QUINCA	SETA
CANDEIA	CATA		PENSA	TRAÇA
CAMPO	FRANCO	MUDO	PRANTO	SOBRA
CANSA	FUNGA	LIMPO	QUICA	VIM

B	I	N	G	O
ABAS	JUTA	LENDA	PESA	TUMBA
CANDEIA	FUGA	MENTE	RAPA	TUBA
AJO	DOM		POTE	VETO
CADEIA	FUNGA	LIPO	POPA	SE
BOBA	FINCA	MUNDO	SENDA	TATO

B	I	N	G	O
BABA	CONTA	LINDA	QUEM	TAPA
ANJO	CANTO	MATA	SENDA	TROCO
ANTENAS	FRANCO		SANCA	SE
CANSA	FRACO	PACA	PRATO	VÊ
AMBAS	COTA	LOMBO	SACA	SOBRA

B	I	N	G	O
ANTA	LEMBRE	MUDO	POTE	SEM
ABAS	DÓ	MANTO	PRATO	VÊ
ANJO	CANTO		QUINCA	TRAÇA
ANTENAS	COTA	MENTE	SANCA	TUBA
CASA	CITO	NU	PONTE	VETO

B	I	N	G	O
ANTENAS	DÓ	NUM	RIM	TAPA
CANDEIA	JUNTA	PACA	QUICA	SE
CAÍDO	CATO		PRANTO	VIM
BABA	JUTA	MUNDO	PAMPA	VETO
BACO	DOM	LIDA	SANCA	TUMBA



ban

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

BAN

za

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

ZA

pe

baralho de
sílabas

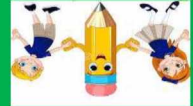


BARALHO DE
SÍLABAS

PE

lim

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

LIM

tor

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

TOR

can

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

CAN

ro

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

RO

bei

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

BEI

bom

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

BOM

pa

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

PA

tam

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

TAM

bra

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

BRA

sim

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

SIM

ro

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

RO

dei

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

DEI

zen

baralho de
sílabas

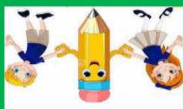


BARALHO DE
SÍLABAS

ZEN

fa

baralho de
sílabas

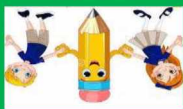


BARALHO DE
SÍLABAS

FA

da

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

DA

zen

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

ZEN

fa

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

FA

bo

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

BO

chim

baralho de
sílabas

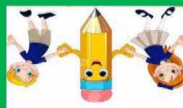


BARALHO DE
SÍLABAS

CHIM

ca

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

CA

da

baralho de
sílabas



BARALHO DE
SÍLABAS

DA

çar

baralho de sílabas



BARALHO DE SÍLABAS

ÇAR

dan

baralho de sílabas



BARALHO DE SÍLABAS

DAN

ca

baralho de sílabas



BARALHO DE SÍLABAS

CA

nun

baralho de sílabas



BARALHO DE SÍLABAS

NUN

sar

baralho de sílabas



BARALHO DE SÍLABAS

SAR

can

baralho de sílabas



BARALHO DE SÍLABAS

CAN

des

baralho de sílabas



BARALHO DE SÍLABAS

DES

to

baralho de sílabas



BARALHO DE SÍLABAS

TO

quan

baralho de sílabas



BARALHO DE SÍLABAS

QUAN

en

baralho de sílabas



BARALHO DE SÍLABAS

EN

lo

baralho de sílabas



BARALHO DE SÍLABAS

LO

bo

baralho de sílabas



BARALHO DE SÍLABAS

BO



COSTAS DAS CARTAS



Anexo 8 - Alfabeto Móvel

A	A	A	A	A	A	A
Â	Ã	Á	B	B	B	B
C	C	C	C	Ç	D	D
D	D	E	E	E	E	E
E	E	É	Ê	F	F	F
F	G	G	G	G	H	H
H	H	I	I	I	I	I
I	I	Í	J	J	J	J
K	K	K	K	L	L	L
L	M	M	M	M	N	N
N	N	O	O	O	O	P
P	P	P	Q	Q	Q	Q
R	R	R	R	S	S	S
S	T	T	T	T	U	U
U	U	V	V	V	V	X
X	X	X	Y	Y	Y	Y
W	W	W	W	Z	Z	Z
Z						

a	a	a	a	a	a	a
â	ã	á	b	b	b	b
c	c	c	c	ç	d	d
d	d	e	e	e	e	e
e	e	é	ê	f	f	f
f	g	g	g	g	h	h
h	h	i	i	i	i	i
i	i	í	j	j	j	j
k	k	k	k	l	l	l
l	m	m	m	m	n	n
n	n	o	o	o	o	p
p	p	p	q	q	q	q
r	r	r	r	s	s	s
s	t	t	t	t	u	u
u	u	v	v	v	v	x
x	x	x	y	y	y	y
w	w	w	w	z	z	z
z						

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**TRADUÇÃO E ADAPTAÇÃO CULTURAL DA *PEDIATRIC EOSINOPHILIC
ESOPHAGITIS SYMPTOM SCORE* (PEESS v2.0)**

MARIA FERNANDA OLIVEIRA SANTOS

UBERLÂNDIA

2017

MARIA FERNANDA OLIVEIRA SANTOS

Tradução e adaptação cultural da *Pediatric Eosinophilic Esophagitis*

Symptom Score (PEESS v2.0)

Fundamentação teórica e artigo submetido apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientadora: Helena Borges Martins da Silva Paro

**UBERLÂNDIA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S237t
2017

Santos, Maria Fernanda Oliveira, 1989
Tradução e adaptação cultural da Pediatric Eosinophilic Esophagitis
Symptom Score (PEESS v2.0) / Maria Fernanda Oliveira Santos. - 2017.
56 f. : il.

Orientadora: Helena Borges Martins da Silva Paro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Esofagite eosinofílica - Teses. 3.
Gastroenterologia - Teses. 4. - Teses. I. Paro, Helena Borges Martins da
Silva, 1977- . II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

Maria Fernanda Oliveira Santos

Tradução e adaptação cultural da *Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score* (PEESS v2.0)

Fundamentação teórica e artigo submetido apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Uberlândia, 22 de fevereiro de 2017

Banca Examinadora

Titular: Profa. Dra. Débora Cristiane Gomes

Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Titular: Profa. Dra. Maria Bernadete Jeha Araújo

Universidade Federal de Uberlândia

Presidente da banca: Profa. Dra. Helena Borges Martins da Silva Paro

Universidade Federal de Uberlândia

À minha família e ao Pedro, pelo carinho e incondicional apoio
dedicado à minha formação.

AGRADECIMENTOS

A execução e conclusão deste projeto não seria possível sem o incentivo e participação de várias pessoas. Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de viver e aprender, por me guiar nas escolhas e nos caminhos da vida.

Aos meus pais, Luiz Fernando e Rosana, pelo amor, incentivo e educação. Pelo apoio incondicional à minha formação profissional e na conclusão deste projeto.

À minha irmã Maria Thereza, pelo carinho e incentivo constante.

Aos meus avós, José, Sylvia e Aurea, pelas orações e por me apoiarem em todos os momentos com tanto carinho.

Ao meu noivo Pedro, pelo amor e companheirismo, pela paciência, ensinamentos e apoio fundamental para conclusão deste projeto.

A Profa Dra Helena Borges Martins da Silva Paro, obrigada por todos os ensinamentos, pelas orientações e confiança durante todo este projeto. Obrigada pelo incentivo e paciência, por me ensinar a vencer minhas dificuldades e inseguranças. Obrigada pela amizade formada nestes anos e pelo carinho sempre.

A Profa Ms Cristina Palmer de Barros, obrigada por ter acreditado e confiado este projeto à mim. Pelo incentivo e apoio constantes e por sempre estar ao meu lado. Pelos ensinamentos que me enriqueceram tanto. Pelo seu carinho e amizade.

Ao Prof Dr Carlos Henrique Martins da Silva, obrigada pelos ensinamentos e orientações desde o início de minha residência em Pediatria. Por incentivar e apoiar este projeto, sempre receptivo e atencioso.

Ao Departamento de Pediatria da Universidade Federal de Uberlândia, em especial à Profa Dra Maria Bernadete Jeha e Dra Isabel Cristina R. Guimarães Roscoe. Obrigada pelo incentivo de sempre, pelo apoio e carinho constantes desde meu início na Pediatria. Sinto-me grata por terem me acolhido tão bem e me fazerem amar ainda mais o que faço.

Aos colaboradores no processo de tradução, obrigada pela eficiência e disposição. Agradeço principalmente à Laurieny, por estar sempre disponível e pelo suporte na tradução.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, obrigada pelos ensinamentos e formação científica.

Aos pacientes do ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica da Universidade Federal de Uberlândia e seus pais/responsáveis, que participaram deste estudo e acreditaram na capacidade de contribuir para melhoria do seguimento clínico da doença.

A todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho,
minha gratidão eterna.

RESUMO

Introdução: A Esofagite Eosinofílica (EEo), é uma entidade clínico-patológica mediada por mecanismos imunes e antigênicos e apresenta-se com sintomas de caráter inespecífico, principalmente em lactentes e pré escolares. Representa uma causa importante de morbidade do trato gastrointestinal alto, com aumento significativo de sua incidência e prevalência nas últimas décadas. Instrumentos que avaliam a gravidade da EEo têm sido desenvolvidos para auxílio diagnóstico e terapêutico da doença. No entanto, poucos questionários consideram a percepção do próprio paciente sobre a gravidade de seus sintomas ou a resposta ao tratamento.

Objetivo: Traduzir e adaptar culturalmente a *Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score* (PEESS version2.0), um instrumento utilizado para identificar os sintomas relatados pelos pacientes ou seus pais/responsáveis para a avaliação da Esofagite Eosinofílica (EEo) pediátrica. **Método:** Realizamos o processo de tradução a partir da tradução inicial, retrotradução, seguida da etapa de obtenção de consenso por revisores independentes por meio da técnica Delphi. Aplicamos a versão pré-final a cinco pacientes de oito a dezoito anos e dez pais de pacientes de dois a dezoito anos, no serviço de Gastroenterologia Pediátrica (pré-teste). **Resultados:** No processo de tradução, não encontramos traduções de difícil consenso no processo de revisão ou discordâncias gramaticais. No pré-teste, identificamos dificuldades de entendimento de termos pouco convencionais, como “náusea”, com sugestão de substituição para o termo “enjoo”. Outra dificuldade encontrada relacionou-se aos advérbios de frequência da escala, como, por exemplo, “quase nunca”, sendo sugerida a substituição pelo termo “raramente”. Essas dificuldades podem ser inerentes à faixa etária pediátrica. A idade dos pacientes a partir de oito anos deve ser considerada adequada para o uso de escores de autorrelato. **Conclusões:** A tradução do Escore de Sintomas da Esofagite Eosinofílica Pediátrica (ESEEP) produziu uma escala adaptada à cultura brasileira, que, após validação, poderá ser introduzida como instrumento de investigação clínica e de pesquisa em

pacientes com sintomas sugestivos de doenças esofágicas. É um importante avanço na avaliação dos sintomas, já que valoriza o relato dos próprios pacientes que convivem com essa doença.

Palavras-chave: Esofagite eosinofílica. Traduções. Autorrelato. Criança. Adolescente.

ABSTRACT

Introduction: Eosinophilic Esophagitis (EEO) is a clinical-pathological entity mediated by immune and antigenic mechanisms with non-specific symptoms, especially in infants and pre-school children. It represents an important cause of high gastrointestinal tract morbidity, with a significant increase in its incidence and prevalence in the last decades. Instruments that assess EEO severity have been developed to support diagnosis and treatment of this disease.

Objectives: To translate and culturally adapt the Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score (PEESS version 2.0), an instrument used to assess pediatric eosinophilic esophagitis symptoms through patients' and/or parents' report.

Methods: The PEESS was translated through the following stages: initial translation, backtranslation and consensus of independent reviewers through the Delphi technique. We applied the pre-final version of the PEESS to five eight-to-18-year-old patients and to ten parents of two-to-18-year-old patients from a outpatient Pediatric Gastroenterology service (pre-test).

Results: We did not observe translations of difficult consensus or grammar inconsistencies during the translation stages.

During pre-testing, we identified difficulties in comprehension of some unconventional terms, e.g., "nausea". Adverbs of frequency, such as "almost never" were also identified as of difficult understanding by patients and parents. Such difficulties may be inherent to the pediatric age group. Eight-year-old or older children should be considered suitable for self-reporting their own symptoms.

Conclusions: We have produced a Brazilian version of the Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score (PEESS), which is adapted to the Brazilian culture. This version may be introduced as a clinical and research instrument for the assessment of patients with esophageal disease symptoms. The PEESS represents a breakthrough in the evaluation of symptoms of the pediatric eosinophilic esophagitis, since it reinforces the importance of self-report of patients who experience this disease.

Keywords: Eosinophilic esophagitis. Translations. Self-report. Child. Adolescent.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fluxograma do processo de tradução e adaptação cultural da PEES em ESEEP.....	38
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Itens do escore para pais de crianças de dois a dezoito anos enviados aos revisores independentes para obtenção de consenso por meio da técnica DELPHI.....	39
Tabela 2. Processo de tradução (tradução, reconciliação e retrotradução) do escore para pacientes de oito a dezoito anos.....	41
Tabela 3. Itens da versão pré-final, sugestões do pré-teste e versão final, do escore para pais/responsáveis de pacientes de dois a 18 anos e pacientes de oito a 18 anos.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CGA	Campo de grande aumento
DRGE	Doença do Refluxo Gastroesofágico
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
EEo	Esofagite Eosinofílica
Eos	Eosinófilos
ESEEP	Escore de Sintomas da Esofagite Eosinofílica Pediátrica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FW1	Tradutor 1
FW2	Tradutor 2
IBP	Inibidor de Bomba de Prótons
PEESS	<i>Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score</i>
PRO	<i>Patient- Reported Outcomes</i>
REC	Reconciliação

Sumário

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
Introdução	14
Fundamentação Teórica.....	18
Objetivos.....	22
Cópia do artigo submetido.....	23
Referências	44
Anexos.....	47

1 Introdução

A Esofagite Eosinofílica (EEo) é uma entidade clínico-patológica mediada por mecanismos imunes e antigênicos que representa uma causa importante de morbidade do trato gastrointestinal alto, com aumento significativo de sua incidência e prevalência nas últimas décadas (LIACOURAS et al., 2011; CIANFERONI; SPERGEL, 2016).

No ano de 2007, foi publicado o primeiro consenso internacional para diagnóstico e manejo da EEo em crianças e adultos (FURUTA et al., 2007). Em revisões atuais, a doença é definida clinicamente por sintomas de disfunção esofágica e histologicamente pelo predomínio de processo inflamatório eosinofílico (LIACOURAS et al., 2011; PAPADOPOULOU et al., 2014). A inflamação é caracterizada pela presença de 15 ou mais eosinófilos por campo de grande aumento (eos/CGA) em no mínimo um fragmento de tecido esofágico extraído por biópsia na endoscopia digestiva alta (EDA); e/ou a presença de outras alterações microscópicas como abscessos eosinofílicos, sua disposição linear ou grânulos eosinofílicos extracelulares (LIACOURAS et al., 2011). Clinicamente, os sintomas apresentam caráter inespecífico, principalmente em lactentes e pré-escolares e manifestam-se por náuseas, vômitos, dor abdominal, déficit de crescimento e dificuldade na introdução de alimentos sólidos. Escolares e adolescentes podem relatar disfagia e impactação de alimentos no esôfago que são sintomas mais específicos e semelhantes ao adulto (CIANFERONI; SPERGEL, 2016; LIACOURAS, 2011).

A ausência de especificidade dos sintomas da EEo e a sua semelhança a outras condições patológicas próprias da idade, como a doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), representam um desafio diagnóstico para o pediatra geral ou especialista. Há ainda que se considerar a necessidade da indicação oportuna de procedimentos invasivos como a EDA sob sedação para viabilizar a realização das biópsias. Uma vez confirmado o diagnóstico, a instituição do tratamento visa controlar os sintomas dessa doença de caráter crônico e prevenir complicações como as estenoses, que levam a sintomas como impactação de alimentos (CIANFERONI; SPERGEL, 2016). A avaliação adequada desses sintomas por meio de instrumentos válidos e confiáveis torna-se imprescindível para fins diagnósticos e terapêuticos (FRANCIOSI et al., 2011).

Instrumentos que avaliam a gravidade da EEo têm sido desenvolvidos para auxílio diagnóstico e terapêutico da doença (DOHIL et al., 2011; ACEVES et al., 2009). No entanto, poucos questionários consideram a percepção do próprio paciente sobre a gravidade de seus sintomas ou a resposta ao tratamento.

Instrumentos que englobam a percepção do paciente (*Patient-reported outcomes* – PRO) têm sido reconhecidos como medidas-chaves para a avaliação do tratamento de doenças crônicas ao longo da última década (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2009). Apesar de existirem outras escalas publicadas com o intuito de avaliar os sintomas da EEO, em revisão de literatura, encontramos apenas um instrumento validado que valoriza os sintomas relatados pelos pacientes ou seus pais/responsáveis para a avaliação da EEO pediátrica, a escala *Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score* (PEESS v2.0) (FRANCIOSI et al., 2011).

A PEESS v2.0 foi desenvolvida a partir de uma versão preliminar, a PEESS v1.0, elaborada por Pentiuk et al. (2009). Essa escala consistia em um escore com sintomas elencados por especialistas com o objetivo de avaliar, por meio de escores, a frequência e a intensidade das manifestações clínicas da EEO. Os escores de sintomas foram correlacionados com achados histológicos obtidos a partir de biópsias de esôfago. No estudo, os autores observaram que indivíduos com EEO não tratada tiveram maiores escores da PEESS do que pacientes tratados. No entanto, apesar da escala conseguir discriminar pacientes com EEO e outras doenças crônicas da criança em relação aos sintomas específicos da doença, ela não era capaz de discriminar pacientes com sintomas inespecíficos, como dor abdominal (PENTIUK et al., 2009).

A partir dos achados obtidos com a PEESS v1.0, Franciosi et al. (2011) desenvolveram e validaram a *Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score* (PEESS v2.0™), com o objetivo de valorizar os sintomas da EEO relatados por pacientes e seus pais/responsáveis. A PEESS v2.0™ é um escore norte americano desenvolvido a partir de entrevistas focais e cognitivas com pacientes diagnosticados com EEO e seus pais. A frequência e a gravidade dos sintomas relacionados à EEO foram o foco para formulação das perguntas das entrevistas. A partir das respostas e descrições dos pacientes com EEO e seus familiares e das diretrizes do *Food and Drug Administration (FDA)*, surge a PEESS v2.0 como a primeira escala de sintomas validada para uso por pacientes com sintomas de doenças esofágicas e/ou seus pais (DESHPANDE et al., 2011; FRANCIOSI et al., 2011).

No Brasil, inexistem instrumentos validados para o diagnóstico e avaliação de sintomas da EEO a partir da percepção dos pacientes. Para utilizarmos a PEESS v2.0 no contexto brasileiro, a tradução e adaptação cultural de acordo com o rigor metodológico preconizado em diretrizes internacionais torna-se fundamental (BEATON et al., 2000; EREMENCO; CELLA; ARNOLD, 2005). Os itens não devem apenas ser traduzidos na forma linguística, mas também devem ser adaptados culturalmente para manter a validade do conteúdo do

instrumento a diferentes culturas, numa base conceitual, mantendo a equivalência entre o instrumento original e a versão alvo (BEATON et al., 2000; EREMENCO; CELLA; ARNOLD, 2005).

Estudos ressaltam a importância do seguimento das etapas de tradução e adaptação cultural para a obtenção de instrumentos com equivalência às versões originais (GJERSING; CAPLEHORN; CLAUSEN, 2010; SOUSA; ROJJANASRIRAT, 2011). Geralmente, são testadas diversas equivalências nas etapas de tradução e adaptação de instrumentos: 1. equivalência conceitual e de itens, que corresponde à exploração do construto de interesse e é testada por grupo de especialistas; 2. Equivalência semântica, representada pela transferência de sentido dos conceitos contidos no instrumento original para a versão alvo. Essa equivalência garante um efeito semelhante dos itens nos respondentes das duas culturas e geralmente é testada em todas as fases da tradução e no pré-teste; 3. Equivalência operacional, que consiste na comparação entre os aspectos de utilização de um instrumento nas populações-alvo e original, testada a partir da avaliação do desenho do instrumento e da sua forma de aplicação; 4. equivalência de mensuração, representada pela investigação das propriedades psicométricas do instrumento vertido, visando avaliar a validade e confiabilidade de construto; e 5. equivalência funcional, dada pelas equivalências identificadas nas demais etapas de avaliação (REICHENHEIM; MORAES, 2007).

O processo de tradução e adaptação cultural de um instrumento segue as seguintes etapas (BEATON et al., 2000; EREMENCO; CELLA; ARNOLD, 2005):

1ª Etapa - Tradução inicial: a tradução é feita da versão de origem para a língua-alvo, por dois tradutores profissionais bilíngues, nativos da própria língua-alvo, sendo duas traduções independentes simultaneamente. Em seguida é feita a reconciliação, da tradução do 1º e 2º tradutor, para resolver qualquer discrepância e assegurar compatibilidade linguística entre elas. É realizada por um profissional não envolvido com o processo de tradução, permitindo outras possíveis interpretações.

2ª Etapa - Retrotradução da escala: a versão reconciliada é traduzida para a língua original por um tradutor nativo da língua de origem, fluente na linguagem alvo, sem formação médica, sem envolvimento com o processo de tradução e nem com a escala original, pois se trata de uma maneira de checar a validação, destacando inconsistências grosseiras ou erros conceituais na tradução.

3ª Etapa – Comparação da retrotradução com a escala original: Nesta etapa ocorre a revisão de cada item da retrotradução, com identificação de itens com traduções inapropriadas ou com maior dificuldade de consenso durante as etapas de tradução e do processo de reconciliação.

4ª Etapa - Revisores independentes: Os itens com maior dificuldade de consenso ou com traduções inapropriadas são enviados para a etapa dos revisores independentes. São selecionados cinco revisores, bilíngues, podendo estar envolvidos nos estágios anteriores, que analisam conjuntamente as traduções, a reconciliação e a versão original, por meio da técnica Delphi modificada (KEENY et al., 2006; HSU; SANDFORD, 2007; ROWE; WRIGHT, 1999), com o principal propósito de avaliar a equivalência semântica, idiomática, experimental e conceitual entre o escore original e a retrotradução. A técnica Delphi modificada (técnica para tomada de decisão por meio de rodadas eletrônicas iterativas) baseia-se na construção de um questionário composto por todas as etapas de tradução e a escala original e por questões qualitativas e quantitativas relativas aos itens com necessidade de revisão (GIOVINAZZO, 2001; HSU; SANDFORD, 2007). Os revisores têm acesso à representação estatística da distribuição dos resultados das rodadas anteriores, de maneira a direcionar o consenso do grupo. O processo é encerrado, de acordo com critérios pré-definidos pelos pesquisadores, que geralmente é estabelecido a partir do mínimo de 80% de concordância entre os revisores (KEENY et al., 2006; HSU; SANDFORD, 2007; ROWE; WRIGHT, 1999).

5ª Etapa - Processo pré-final de revisão: Após a etapa dos revisores independentes, a versão pré-final é avaliada e definida pelos coordenadores de pesquisa e por um coordenador de linguagem experiente em tradução.

6ª Etapa - Pré-teste: O pré-teste consiste na aplicação da versão pré-final da escala a pacientes, com a finalidade de identificar e corrigir possíveis dificuldades de compreensão de itens e sugestões para melhoria da tradução, obtidas através de entrevistas orais cognitivas e retrospectiva.

7ª Etapa - Incorporação dos resultados do pré-teste no processo de tradução: As observações feitas no pré-teste são consideradas para determinar a adaptação cultural da versão traduzida. Itens com relatos de dificuldades de compreensão são substituídos e enviados para prova de leitura pelo coordenador de linguagem. Após a revisão gramatical final, a versão deve ser enviada para aprovação final do autor.

Essas etapas de tradução adquirem especial importância em pesquisas de doenças raras ou emergentes, em que a troca de informações e instrumentos entre pesquisadores de saúde pode ser promissora (SOUSA; ROJJANASRIRAT, 2011).

2 Fundamentação Teórica

A Esofagite Eosinofílica (EEo) vem sendo descrita nas últimas três décadas, desde casos isolados de pacientes com eosinofilia esofágica proeminente até um distúrbio clínico bem definido. No passado, era descrita como uma forma de esofagite alérgica ou idiopática. Atualmente, sabemos que a EEo é uma doença distinta (FURUTA et al., 2007; LIACOURAS et al., 2014).

Em uma revisão atual sobre EEo, estudiosos afirmam que a incidência e prevalência da doença tem apresentado um aumento significativo, se espelhando no aumento da prevalência de doenças alérgicas (asma, rinite alérgica, dermatite atópica e alergia alimentar) nas últimas décadas. Dados do *CDC National Health Information Survey* (NHIS) confirmam o aumento de todas as doenças atópicas nos últimos anos (FURUTA et al., 2007; LIACOURAS et al., 2014). Em dados atuais, 5% a 10% dos pacientes pediátricos e 6% dos adultos com DRGE mal controlada parecerem apresentar o diagnóstico de EEo (LIACOURAS et al., 2014).

A EEo é considerada uma doença crônica atópica emergente, com condições clínico-patológicas, definida pela infiltração de eosinófilos no epitélio esofágico e, se não tratada, resulta em fibrose e disfunção esofágica, provocando sintomas suspeitos da doença esofágica (CIANFERONI; SPERGEL, 2016).

Frequentemente, esses sintomas imitam a DRGE, mas não respondem a medicação anti-refluxo otimizada (como inibidores da bomba de prótons [IBP]). Sintomas causados pela fibrose em curso, como disfagia e impactação de alimentos, são comuns na apresentação da doença em adolescentes e adultos (FURUTA et al., 2007).

Uma vez que a EEo é suspeitada a partir dos sintomas, a EDA diagnóstica é indicada após completar a terapia anti-DRGE com IBP (1 mg/kg em crianças uma ou duas vezes por dia durante 8 a 12 semanas). O diagnóstico é confirmado se a biópsia esofágica mostrar pelo menos 15 eosinófilos por campo de alta potência (eos / hpf) em um ou mais de pelo menos quatro segmentos obtidos aleatoriamente do esôfago (CIANFERONI; SPERGEL, 2016).

Pacientes com EEo podem apresentar um ampla gama de sintomas, desde apresentações facilmente reconhecíveis como impactação do bolo alimentar e disfagia até sintomas inespecíficos como recusa alimentar e dor abdominal (LIACOURAS et al., 2011). Sintomas característicos em lactentes e crianças pequenas são descritos como dificuldade de alimentação, déficit de crescimento e sintomas clássicos da DRGE. Por outro lado, crianças com idade escolar têm maior probabilidade de apresentar vômitos, dor abdominal e regurgitação (CIANFERONI; SPERGEL, 2016).

Em quase todos os casos de EEO pediátrica, verificou-se uma alergia alimentar associada, sendo na maioria dos pacientes um mecanismo IgE não-mediado. Os alimentos causadores dos sintomas são, principalmente, leite, trigo, ovo e soja. A partir dessas evidências, a alergia alimentar vem sendo investigada com o diagnóstico de EEO (GONSALVES, 2007; SPERGEL et al., 2009). Outros estudos sugerem que aeroalérgenos também podem desencadear a EEO em pacientes adultos e pediátricos. Apesar de incipientes, estudos demonstram que os aeroalérgenos têm papel mais importante nos adultos e os alérgenos alimentares em crianças (WANG et al., 2007). Como em muitas doenças alérgicas, o manejo atual da EEO é baseado na utilização de esteróides para suprimir a inflamação e/ou evitar alérgenos alimentares, com testes de restrição alimentar (CIANFERONI; SPERGEL, 2016).

Ao diagnosticar essa doença de caráter crônico e iniciar tratamento, é importante o controle dos sintomas para prevenção de complicações como as estenoses que levam a impactação de alimentos. No entanto, para fins diagnósticos e terapêuticos, é imprescindível a avaliação adequada dos sintomas.

Atualmente, o diagnóstico e o acompanhamento da EEO ainda é feito por meio de EDA, já que ainda não existem ferramentas de sintomas disponíveis, biomarcadores ou outros elementos que possam substituir essa monitorização do diagnóstico clínico-patológico. Apesar de resultados anteriores buscarem identificar marcadores moleculares associados aos achados histopatológicos e sintomas da doença (MARTIN et al., 2015), os achados ainda são incipientes e insuficientes para sugerirem avanços diagnósticos.

O desenvolvimento de escores de sintomas da EEO parece promissor para o arsenal diagnóstico e terapêutico da doença. No entanto, a maioria dos estudos existentes para o desenvolvimento de instrumentos para avaliar os sintomas da EEO pediátrica têm-se centrado em correlações entre escores de sintomas não-validados e resultados histológicos, especificamente o número de contagem de eosinófilos no esôfago (ACEVES et al., 2009; DOHIL et al., 2010; PENTIUK et al., 2009).

A primeira tentativa de desenvolver um questionário de sintomas a partir do relato de pacientes e pais foi publicada em 2008, por Flood et al. (2008). Os autores relatam o uso de entrevistas cognitivas em um questionário de sintomas da EEO pediátrica (*Symptom Questionnaire for Eosinophilic Esophagitis*), desenvolvido por especialistas na área e para pacientes com idade de oito a dezessete anos e pais de pacientes com idade de dois a sete anos. O escore foi desenvolvido a partir da opinião de especialistas e de entrevistas individuais com pacientes e cuidadores. As entrevistas, com perguntas abertas, abordavam questionamentos sobre os sintomas e seu impacto na vida cotidiana dos pacientes com

diagnóstico de EEO. Os participantes preencheram o questionário de sintomas apropriado e foram solicitados a fornecer *feedback* sobre a relevância, abrangência e clareza de cada item e outras questões do questionário. Apesar do rigor metodológico do estudo, os autores consideraram a amostra de pacientes limitada, fato que não permitiu a validação do questionário para uso em pacientes com EEO (FLOOD et al., 2008). Além disso, após revisão de literatura, evidenciamos que esse questionário não tem sido utilizado em pesquisas clínicas.

Outro instrumento desenvolvido para avaliação dos sintomas da EEO foi a PEES v1.0 (PENTIUK et al., 2009), publicada em 2009. Esse instrumento também ainda não foi validado, mas foi utilizado como versão inicial para o desenvolvimento da PEES v2.0. No mesmo ano, Aceves et al. (2009) também desenvolveram um escore de sintomas por meio da modificação de uma escala métrica utilizada para doenças pépticas pediátricas. A pontuação incluía sete categorias (azia/regurgitação, dor abdominal, despertar noturno, náuseas/vômitos, anorexia/saciedade precoce, disfagia/odinofagia e sangramento gastrointestinal). Essa ferramenta, desenvolvida a partir da opinião de especialistas e da associação de sintomas com a histologia esofágica também não foi validada. No estudo de Aceves et al. (2009), a pontuação total de sintomas foi maior entre os pacientes com EEO e DRGE do que entre pacientes do grupo controle. Apenas sintomas de disfagia e anorexia/saciedade precoce foram capazes de discriminar significativamente entre pacientes com EEO e DRGE e podem ser considerados como sintomas de gravidade dessas doenças (ACEVES et al., 2009).

Em 2010, Dohil et al. (2010) também utilizaram a mesma escala não validada para doenças pépticas pediátricas e monitoraram pacientes por meio da pontuação de sintomas. Os escores foram utilizados para diferenciação entre pacientes com EEO, DRGE, atópicos ou não. Os escores também foram comparados com os achados endoscópicos e histológicos de acordo com a corticoterapia oral. Os sintomas foram avaliados pela pontuação final da escala realizada no último mês de tratamento e os resultados evidenciaram que a terapêutica foi eficaz para melhoria dos sintomas e dos achados endoscópicos e histológicos (DOHIL et al., 2010).

Os escores de sintomas para EEO desenvolvidos até então, dependendo unicamente da opinião de especialistas, ainda não consideravam a percepção do paciente sobre a gravidade de seus sintomas ou da resposta ao tratamento, aspectos cada vez mais importantes nos desfechos de saúde e qualidade de vida. O autorrelato de pacientes e pais, quando adequadamente desenvolvido e validado, tem sido cada vez mais considerado como medida-chave para avaliação do resultado no tratamento de doenças crônicas ao longo da última década

(FRANCIOSI et al., 2011). Internacionalmente, os PROs (*Patient Reported Outcomes*) têm sido identificados como fatores importantes na investigação clínica, uma vez que valorizam as características da doença que os pacientes e seus familiares consideram importantes (CELLA et al., 2007; REEVE et al., 2007). De acordo com o FDA, um PRO é “qualquer relatório do estado da condição de saúde de um paciente que vem diretamente dele, sem interpretação da resposta por meio de um clínico ou qualquer outra pessoa” (DESHPANDE et al., 2011).

Os resultados relatados pelos pacientes (PROs) parecem ser mais importantes no futuro do que quaisquer outros resultados clínicos, fisiológicos ou relatados pelos cuidadores. Melhorias na aderência ao tratamento e mudanças de comportamento necessárias para o manejo de doenças crônicas são mais facilmente obtidas por meio de atenção adequada ao relato dos pacientes (DESHPANDE et al., 2011).

Dessa forma, a valorização do relato de pacientes e pais em um escore de sintomas da EEO pediátrica propiciará a avaliação dos sintomas considerados relevantes pelas pessoas que vivenciam a doença. A PEESS v2.0 surge como único instrumento validado para a avaliação dos PROs no cenário atual da EEO (FRANCIOSI et al., 2011). O escore é validado apenas para a população norte americana e deverá ser adequadamente traduzido, adaptado e validado para uso em outras culturas.

3 Objetivos

Objetivo geral: Traduzir e adaptar culturalmente a *Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score* (PEESS) para a língua portuguesa do Brasil para obtermos uma versão brasileira com equivalência conceitual, semântica e cultural à escala original.

4 Cópia do artigo submetido**Artigo 1. Tradução e adaptação cultural da *Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score* (PEESS v2.0)**

Título abreviado: Tradução e adaptação cultural da PEESS

Submetido à revista “Jornal de Pediatria”

Resumo

Objetivo: Traduzir e adaptar culturalmente a *Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score* (PEESS version 2.0), um instrumento utilizado para identificar os sintomas relatados pelos pacientes ou seus pais/responsáveis para a avaliação da Esofagite Eosinofílica (EEo) pediátrica. **Método:** Realizamos o processo de tradução a partir da tradução inicial, retrotradução, seguida da etapa de obtenção de consenso por revisores independentes por meio da técnica Delphi. Aplicamos a versão pré-final a cinco pacientes de oito a dezoito anos e dez pais de pacientes de dois a dezoito anos, no serviço de Gastroenterologia Pediátrica (pré-teste). **Resultados:** No processo de tradução, não encontramos traduções de difícil consenso no processo de revisão ou discordâncias gramaticais. No pré-teste, identificamos dificuldades de entendimento de termos pouco convencionais, como “náusea”, com sugestão de substituição para o termo “enjoo”. Outra dificuldade encontrada relacionou-se aos advérbios de frequência da escala, como, por exemplo, “quase nunca”, sendo sugerida a substituição pelo termo “raramente”. Essas dificuldades podem ser inerentes à faixa etária pediátrica. A idade dos pacientes a partir de oito anos deve ser considerada adequada para o uso de escores de autorrelato. **Conclusões:** A tradução do Escore de Sintomas da Esofagite Eosinofílica Pediátrica (ESEEP) produziu uma escala adaptada à cultura brasileira, que poderá ser introduzida como instrumento de investigação clínica e de pesquisa em pacientes com sintomas sugestivos de doenças esofágicas. É um importante avanço na avaliação dos sintomas, já que valoriza o relato dos próprios pacientes que convivem com essa doença.

Palavras-chave: Esofagite eosinofílica; Traduções; Autorrelato; Criança; Adolescente.

Abstract

Objectives: To translate and culturally adapt the Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score (PEESS version 2.0), an instrument used to assess pediatric eosinophilic esophagitis symptoms through patients' and/or parents' report. **Methods:** The PEESS was translated through the following stages: initial translation, backtranslation and consensus of independent reviewers through the Delphi technique. We applied the pre-final version of the PEESS to five eight-to-18-year-old patients and to ten parents of two-to-18-year-old patients from a outpatient Pediatric Gastroenterology service (pre-test). **Results:** We did not observe translations of difficult consensus or grammar inconsistencies during the translation stages. During pre-testing, we identified difficulties in comprehension of some unconventional terms, e.g., "nausea". Adverbs of frequency, such as "almost never" were also identified as of difficult understanding by patients and parents. Such difficulties may be inherent to the pediatric age group. Eight-year-old or older children should be considered suitable for self-reporting their own symptoms. **Conclusions:** We have produced a Brazilian version of the Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score (PEESS), which is adapted to the Brazilian culture. This version may be introduced as a clinical and research instrument for the assessment of patients with esophagic disease symptoms. The PEESS represents a breakthrough in the evaluation of symptoms of the pediatric eosinophilic esophagitis, since it reinforces the importance of self-report of patients who experience this disease.

Keywords: Eosinophilic esophagitis; Translations; Self-report; Child; Adolescent.

Introdução

A Esofagite Eosinofílica (EEo), é uma entidade clínico-patológica mediada por mecanismos imunes e antigênicos que representa uma causa importante de morbidade do trato gastrointestinal alto, com aumento significativo de sua incidência e prevalência nas últimas décadas^{1, 2}.

No ano de 2007, foi publicado o primeiro consenso internacional para diagnóstico e manejo da EEo em crianças e adultos³. Em revisões atuais, a doença é definida clinicamente por sintomas de disfunção esofágica e histologicamente pelo predomínio de processo inflamatório eosinofílico^{1, 4}. A inflamação é caracterizada pela presença de 15 ou mais eosinófilos por campo de grande aumento (eos/CGA) em no mínimo um fragmento de tecido esofágico extraído por biópsia na endoscopia digestiva alta (EDA); e/ou a presença de outras alterações microscópicas como abscessos eosinofílicos, sua disposição linear ou grânulos eosinofílicos extracelulares¹. Clinicamente, os sintomas apresentam caráter inespecífico, principalmente em lactentes e pré-escolares, manifestado por náuseas, vômitos, dor abdominal, déficit de crescimento e dificuldade na introdução de alimentos sólidos. Escolares e adolescentes podem relatar disfagia e impactação de alimentos no esôfago que são sintomas mais específicos e semelhantes ao adulto^{2, 5}.

A ausência de especificidade dos sintomas da EEo e a sua semelhança a outras condições patológicas próprias da idade, como a doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), representam um desafio diagnóstico para o pediatra geral ou especialista. Há ainda que se considerar a necessidade da indicação oportuna de procedimentos invasivos como a EDA sob sedação para viabilizar a realização das biópsias. Uma vez confirmado o diagnóstico, a instituição do tratamento visa controlar os sintomas dessa doença de caráter crônico e prevenir complicações como as estenoses, que levam a sintomas como impactação de alimentos². A

avaliação adequada desses sintomas por meio de instrumentos válidos e confiáveis torna-se imprescindível para fins diagnósticos e terapêuticos⁶.

Instrumentos que avaliam a gravidade da EEO têm sido desenvolvidos para auxílio diagnóstico e terapêutico da doença^{7,8}. No entanto, poucos questionários consideram a percepção do próprio paciente sobre a gravidade de seus sintomas ou a resposta ao tratamento. Instrumentos que englobam a percepção do paciente (*Patient-reported outcomes* – PRO) têm sido reconhecidos como medidas-chaves para a avaliação do tratamento de doenças crônicas ao longo da última década. Apesar de existirem outras escalas publicadas com o intuito de avaliar os sintomas da EEO, em revisão de literatura, encontramos somente um instrumento validado que valoriza os sintomas relatados pelos pacientes ou seus pais/responsáveis para a avaliação da EEO pediátrica, o escore *Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score* (PEESS version 2.0).

A PEESS v2.0TM foi desenvolvida nos Estados Unidos, a partir de entrevistas focais e cognitivas, com a utilização da percepção de pacientes e seus pais, tendo a frequência e a gravidade dos sintomas relacionados à EEO como foco para formulação das perguntas. A partir das respostas e descrições dos pacientes com EEO e seus familiares, e das diretrizes do FDA, surge a PEESS v2.0 como o primeiro escore de sintomas validado^{6,9} para uso por pacientes pediátricos com sintomas de doenças esofágicas e/ou seus pais.

No Brasil, inexistem instrumentos validados para o diagnóstico da EEO a partir da percepção dos pacientes. Para utilizarmos a PEESS v2.0 no contexto brasileiro, a tradução e adaptação cultural de acordo com o rigor metodológico preconizado em diretrizes internacionais torna-se fundamental¹⁰. Os itens não devem apenas ser traduzidos na forma linguística, mas também devem ser adaptados culturalmente para manter a validade do conteúdo do instrumento a diferentes culturas, numa base conceitual, mantendo a equivalência entre o instrumento original e a versão alvo¹⁰. Este estudo objetiva traduzir e adaptar culturalmente a PEESS v2.0

para obtermos uma versão brasileira com equivalência conceitual, semântica e cultural à escala original.

Métodos

Estudo de tradução, transversal, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) (Protocolo CEP/UFU 048050/2015).

Após a autorização de utilização do *Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score* (PEESS v2.0) pela *Mapi Research Trust* (<http://mapigroup.com/tag/mapi-research-trust/>), realizamos a tradução do escore para língua portuguesa, com uso de metodologias de tradução e adaptação cultural, em conformidade com normas internacionais de tradução de instrumentos^{10,11} para validação linguística, em sete etapas (Figura 1).

Na terceira etapa de tradução, os coordenadores da pesquisa realizaram a comparação da retrotradução com a escala original, com o objetivo de identificar itens com traduções inapropriadas ou com maior dificuldade de consenso durante as etapas de tradução e do processo de reconciliação. Esses itens foram selecionados para o processo de revisores independentes (4ª etapa). Os revisores analisaram conjuntamente as traduções, a reconciliação e a versão original, por meio da técnica Delphi modificada^{12,13,14}, com o principal propósito de avaliar a equivalência semântica, idiomática, experimental e conceitual entre o escore original e a retrotradução. A técnica Delphi modificada (técnica para tomada de decisão por meio de rodadas eletrônicas) baseou-se na construção de um questionário composto por todas as etapas de tradução e a escala original e por questões qualitativas e quantitativas relativas aos itens com necessidade de revisão¹².

Os links dos questionários foram enviados por e-mail para os revisores, que foram solicitados a responder o formulário em um tempo de vinte dias. Os dados das respostas eram encaminhados imediatamente ao coordenador de pesquisa por e-mail através de um site de

livre acesso e o anonimato dos respondentes foi mantido (http://armstrong.wharton.upenn.edu/delphi2/admin/reset_pw.php?ac=1rlaxC).

Na primeira rodada, os revisores escolhiam a melhor entre as opções de tradução (FW1 e FW2) e a reconciliação (REC), ou sugeriam outra opção, de acordo com seu conhecimento. A cada rodada havia a representação estatística da distribuição dos resultados, por meio da porcentagem de concordância entre os revisores e a retroalimentação (“*feedback*”) das respostas do grupo para reavaliação na rodada subsequente¹⁵. A segunda rodada foi feita a partir das análises dos resultados da primeira rodada, para identificar convergência e mudança nos julgamentos e opiniões dos respondentes. Os revisores tiveram acesso à representação estatística da distribuição dos resultados, de maneira a direcionar o consenso do grupo. O processo foi encerrado, de acordo com critérios pré-definidos pelos pesquisadores, com o consenso mínimo de 80% de concordância entre os revisores.

Após a etapa de revisão pré-final do escore pela coordenadora de linguagem, a versão pré-final foi aplicada pela pesquisadora principal a 17 respondentes após a assinatura do Termo de Consentimento e/ou Assentimento Livre e Esclarecido. A amostra do pré-teste foi definida de acordo com as orientações de tradução da empresa responsável pelos direitos autorais do escore¹¹: seis pacientes entre oito e dezoito anos, cinco pais de pacientes entre dois e oito anos e seis pais de pacientes entre oito e dezoito anos, em seguimento no ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), para investigação diagnóstica ou seguimento clínico de Esofagite Eosinofílica. Pais ou pacientes não alfabetizados foram excluído do estudo. Essa etapa teve como finalidade identificar e corrigir possíveis dificuldades de compreensão de itens e sugestões para melhoria da tradução.

A análise qualitativa foi realizada pela pesquisadora principal por meio de duas breves entrevistas orais, a entrevista retrospectiva e cognitiva. Durante a entrevista retrospectiva, os

sujeitos foram questionados sobre a compreensão do escore de sintomas, sobre a importância dos itens e sobre sugestões para melhorar o entendimento do escore.

A entrevista cognitiva teve o objetivo de identificar se o significado de cada item dado pelo autor do escore tinha o mesmo entendimento dado pelo entrevistado. Os sujeitos identificavam em cada item problemas de tradução e sugestões de tradução. As observações dos pacientes e pais de pacientes foram consideradas para determinar a adaptação cultural da versão traduzida. Itens com relatos de dificuldade de compreensão e sugestões feitas por pais e pacientes foram incorporados para nova prova de leitura pelo revisor de linguagem. Após a revisão gramatical final, a versão foi enviada para aprovação final da empresa detentora dos direitos autorais do escore.

Questionários

Questionário Sócio-demográfico

Dados como idade, sexo e escolaridade dos pais e pacientes participantes do pré-teste foram colhidos, por meio de entrevista oral, antes das entrevistas cognitiva e retrospectiva.

Escore Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score (PEESS v2.0)

A PEESS é um escore que avalia a frequência e a intensidade dos sintomas relacionados à EEO. É composta por vinte itens, sendo onze itens relacionados à frequência e nove itens relacionados à intensidade dos sintomas. As respostas de cada item são distribuídas em uma escala com pontuação que varia de zero a quatro. Nos itens referentes à frequência, zero corresponde a “nunca” e quatro corresponde a “quase sempre” (duas ou mais vezes no dia). Nos itens referentes à intensidade, zero corresponde a “nada mal” e quatro corresponde a “muito mal”. Os escores são transformados em uma escala de zero a cem, conforme orientações a seguir: 0=0, 1=25, 2=50, 3=75, 4=100. Quanto maior é a pontuação, maior é a gravidade e a frequência dos sintomas. Existem dois escores para autoaplicação, sendo um

para pacientes de oito à dezoito anos e outro para pais ou responsáveis de crianças de dois à dezoito anos^{6,16}.

Resultados

Após o processo de tradução inicial, reconciliação e retrotradução, o título, as orientações do escore, as categorias de resposta de gravidade e dois itens foram enviados para revisão e obtenção de consenso por meio da técnica Delphi. Apenas o título do escore foi enviado para uma segunda rodada, quando atingiu 80% de concordância entre os revisores. Os revisores escolheram a versão reconciliada nas orientações do escore, categorias de resposta de gravidade e nos itens 3 e 20 (80%) (Tabela 1).

Após a finalização da etapa de revisão, o escore foi enviado para revisão gramatical. Nessa etapa, foram corrigidos os itens 5 e 6 na tradução de “stomach aches or belly aches”, inicialmente como “dores de estômago ou de barriga” na reconciliação, para “dor de estômago ou de barriga” na versão corrigida (Tabela 2).

Um pai e um paciente de 15 anos foram excluídos do estudo devido à ausência de escolaridade. Dessa maneira, a amostra do pré-teste foi constituída, por 15 respondentes. A idade dos pais ou responsáveis variou de 28 a 48 anos, sendo 30% do sexo masculino e 70% sexo feminino. O nível de escolaridade variou entre ensino fundamental a ensino superior completo. A idade dos pacientes variou de dez a dezessete anos, sendo 20% sexo feminino e 80% masculino e o nível de escolaridade entre ensino fundamental e ensino médio. A ausência de pacientes com idade entre oito a dez anos foi considerada uma limitação.

Na entrevista retrospectiva, todos os respondentes referiram ter entendido o escore de sintomas, considerando importante a sua aplicação. Nas sugestões dadas, cinco pais de pacientes de dois a dezoito anos e dois pacientes de oito a dezoito anos sugeriram que nas categorias de resposta da frequência, fosse modificada a opção “Quase nunca (menos de uma vez por semana)”, traduzida a partir de “Almost never (less than once a week)” na

reconciliação, por opções como “Raramente (uma ou mais vezes por mês)” ou “De vez em quando (mensalmente)”. Tal modificação foi sugerida devido à dificuldade de entendimento da frequência entre as categorias “Nunca” e “Às vezes (uma ou mais vezes por semana)”. Segundo a opinião do revisor de linguagem, a opção “Raramente” seria mais adequada para a frequência entre “Nunca” e “Às vezes”.

Na entrevista cognitiva, os respondentes apresentaram dificuldade de entendimento e sugeriram mudanças em cinco itens, porém, em apenas três itens (15, 19 e 20), os coordenadores de linguagem e pesquisa consideraram relevantes as dificuldades de entendimento e sugestões apresentadas pelos respondentes, tendo critérios para modificação (Tabela 3). Sugestões foram feitas para substituir o termo “náusea” por “enjoo” ou mesmo pela expressão idiomática “embrulhar o estômago”, facilitando a compreensão do item. Os coordenadores optaram pela primeira sugestão, “enjoo”, não havendo discordância gramatical, definindo o item na versão final como “Com que frequência seu(sua) filho(a) sente enjoos (sente que vai vomitar, mas não vomita)?”.

Ainda durante a entrevista cognitiva, dois pais e um paciente sugeriram a substituição do termo “outras crianças” pelo termo “outras pessoas” nos itens 19 e 20 (“Com que frequência seu(sua) filho(a) come menos do que as outras crianças?” e “Com que frequência seu(sua) filho(a) precisa de mais tempo para comer do que as outras crianças?”). Consideramos que a sugestão melhoraria o entendimento desses itens, sendo assim, considerada a versão final de tradução “Com que frequência seu(sua) filho(a) come menos do que as outras pessoas?” e “Com que frequência seu(sua) filho(a) precisa de mais tempo para comer do que as outras pessoas?” (Tabela 3).

Discussão

Este estudo traduziu e adaptou culturalmente a versão brasileira da *Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score* (PEESS v2.0) para avaliação de sintomas da Esofagite Eosinofílica em crianças e adolescentes.

A percepção dos sintomas do paciente pediátrico e o relato dos pais são de extrema importância para avaliação das opções terapêuticas atuais da EEO e da evolução da doença⁶. Atualmente, sabemos que a gravidade histológica da inflamação da EEO medida pela contagem de eosinófilos no tecido e a presença e intensidade dos sinais endoscópicos pode não estar relacionado diretamente com a gravidade dos sintomas vivenciados pelos pacientes^{17,18}. Dessa maneira, a introdução da *Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score* (PEESS v2.0) como um escore de sintomas relatados pelos pais e/ou pacientes com suspeita e diagnóstico de Esofagite Eosinofílica pode representar um importante avanço na investigação e pesquisa dessa doença.

No processo de tradução, não encontramos traduções de difícil consenso ou discordâncias gramaticais. Na etapa dos revisores independentes, a técnica Delphi foi aplicada até a segunda rodada para obtenção de consenso relacionado ao título do escore. Essa técnica propiciou maior autenticidade ao processo de tradução e pode ser considerada um instrumento de apoio na tomada de decisão, já que permitiu a participação de um grupo de especialistas em tradução e em gastroenterologia pediátrica¹⁵.

Na revisão gramatical, o único ajuste sugerida foi a tradução de “stomach aches or belly aches”, expressão inicialmente traduzida como “dores de estômago ou de barriga”, para o singular “dor de estômago ou de barriga”. Ao considerarmos a convencionalidade sintática na tradução, no português, a palavra “dor” tem significado abrangente e generalizado¹⁹, sendo a frequência com que ela acontece dada no plural. Além disso, a forma no singular, considerada convencional, ou seja, “de uso ou de praxe, consolidada pelo uso ou pela prática”²⁰, deve ser preferida em escalas para uso com a população. A convencionalidade sintática também foi a

justificativa para a substituição da palavra “náusea” por “enjoo”¹⁹, por sugestão de pacientes e pais após a entrevista cognitiva. Essas palavras são consideradas sinônimas, porém a palavra “enjoo” foi considerada popularmente de mais fácil entendimento.

Outra sugestão fornecida no pré-teste foi a substituição de “quase nunca (menos que uma vez por semana)”, tradução de “Almost never (less than once a week)”, para o advérbio sinônimo “raramente (uma ou mais vezes por mês)”. Ambos são indicadores de frequência, porém, a sugestão feita pelos pacientes e pais na entrevista cognitiva foi referida como de mais fácil compreensão. Também durante a entrevista cognitiva, percebemos que os pacientes de dez a dezessete anos compreenderam bem os indicadores de frequência utilizados nas categorias de resposta do escore, fato consistente com resultados prévios²¹. A facilidade de compreensão entre pacientes nessa faixa etária evidencia que crianças maiores possuem uma boa compreensão dos advérbios de frequência e uma memória declarativa mais desenvolvida do que crianças menores de oito anos²². Essas evidências reforçam a possibilidade do uso de escores de autorrelato em crianças a partir de oito anos de idade.

A faixa etária a partir de oito anos de idade foi considerada fator determinante para melhor entendimento dos itens do escore, principalmente ao considerarmos a capacidade de leitura e compreensão dos pacientes, entretanto, não conseguimos aplicar o pré-teste para pacientes entre oito e dez anos, sendo uma limitação do trabalho. Crianças a partir de oito anos têm capacidade de discutir e expressar suas experiências de doença²³. O cuidado na metodologia em utilizar escalas específicas e adequadas à faixa etária e de acordo com variações do desenvolvimento cognitivo dos respondentes é critério importante para o uso do escore tanto em pesquisa como na prática clínica²⁴.

No item “Com que frequência você precisa de mais tempo para comer do que as outras crianças?”, as crianças compreendiam o significado do item, mas não conseguiam se relacionar pessoalmente com ele. Isso decorreu, provavelmente, pelo fato de não terem a

experiência de conviver em ambiente familiar com outras crianças da mesma idade, já que sabemos que o comportamento alimentar pode variar de acordo com a faixa etária²⁵. Outra possível explicação para esses resultados pode ser a idade dos respondentes, que, entre dez e dezessete anos, parecem não se considerar mais “crianças”. Outros estudos também relatam dificuldades semelhantes em crianças e adolescentes^{23,24}. A experiência prévia relacionada aos sintomas ou comportamentos medidos pelo item é um aspecto importante a ser considerado em processos de validação posteriores do escore. Consideramos que essas dificuldades de entendimento sejam inerentes da idade.

Outra dificuldade inerente à faixa etária pediátrica emergiu na entrevista cognitiva com os pais e responsáveis. Os pais relataram ter certa dificuldade para responder alguns itens. Isso porque não sabiam tais informações sobre seus filhos ou porque não conseguiram observar a criança o suficiente para desenvolver uma conclusão a respeito do item. Tal fato foi observado principalmente em pais de crianças pequenas, abaixo de cinco anos, com dificuldade de expressar sintomas mais subjetivos como por exemplo, “azia” e “enjoo”. Apesar de sabermos que o uso do relato dos pais ou responsáveis em crianças é altamente confiável e válido²⁶, chamamos a atenção para a interpretação de itens relacionados a sintomas mais subjetivos, que carregam maior dificuldade de expressão pelas crianças menores de oito anos^{23, 24}.

A tradução do Escore de Sintomas da Esofagite Eosinofílica Pediátrica (ESEEP) produziu uma escala adaptada à cultura brasileira, que poderá ser introduzida como instrumento de investigação clínica e pesquisa de sintomas para pacientes com suspeita diagnóstica de EEO. Estudos posteriores de validação do escore devem elucidar os parâmetros psicométricos dos itens, em especial, aqueles com maior dificuldade de compreensão de crianças, adolescentes, pais ou responsáveis no pré-teste. O ESEEP representa um importante avanço na avaliação dos sintomas da EEO, já que valoriza o relato dos próprios pacientes que convivem com essa doença, no cenário de uma doença de caráter crônico, com diagnóstico e acompanhamento

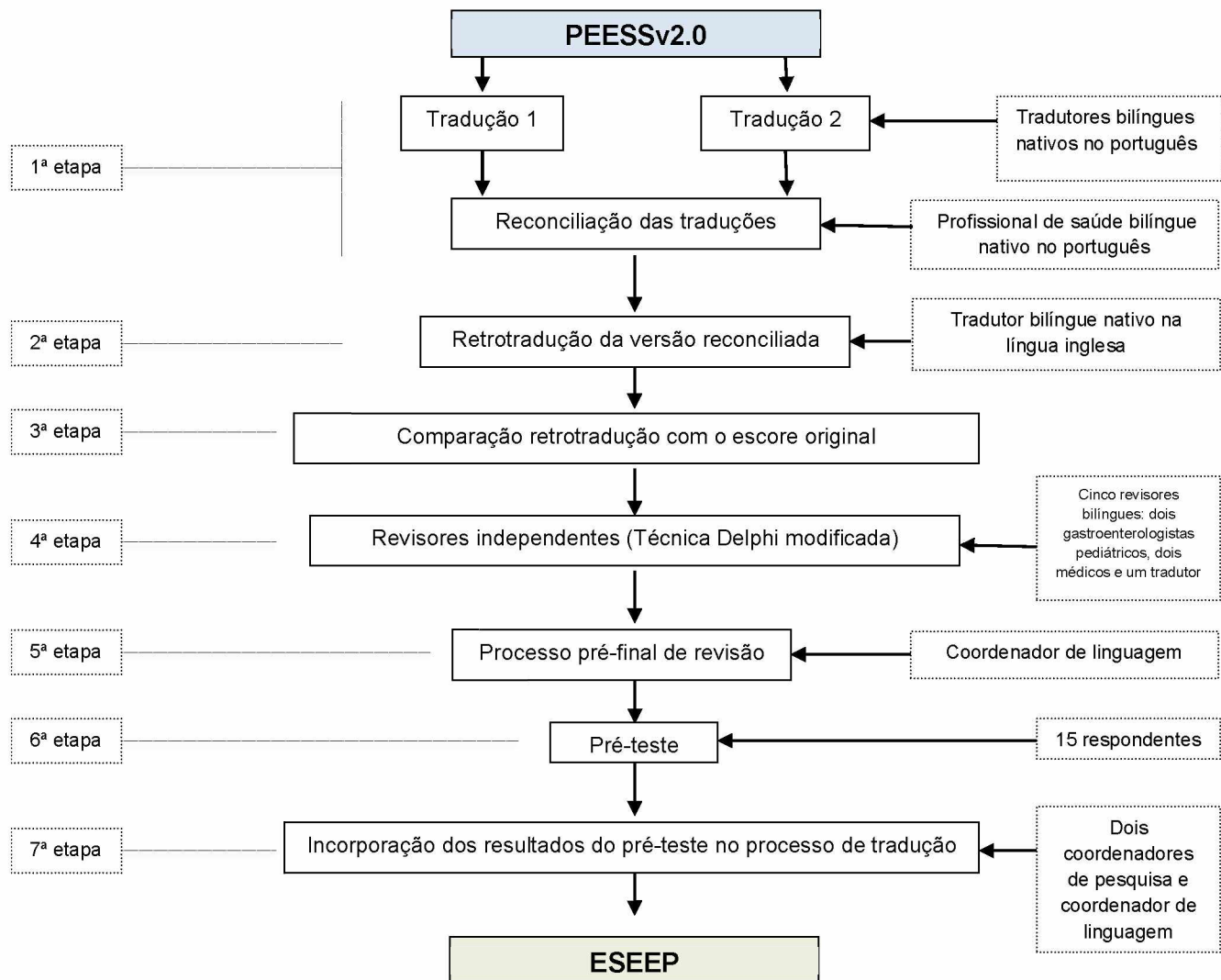
invasivos, que requer avaliação minuciosa da evolução dos sintomas para o planejamento terapêutico adequado.

Referências Bibliográficas

1. Liacouras CA, Furuta GT, Hirano I, Atkins D, Attwood SE, Bonis PA, et al. Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(1):3–20.
2. Cianferoni A, Spergel J. Eosinophilic Esophagitis: A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016;50(2):159-74.
3. Furuta GT, Liacouras CA, Collins MH, Gupta SK, Justinich C, Putnam PE, et al. Eosinophilic esophagitis in children and adults: a systematic review and consensus recommendations for diagnosis and treatment. *Gastroenterology*. 2007;133(4):1342–63.
4. Papadopoulou A, Koletzko S, Heuschkel R, Dias JA, Allen KJ, Murch SH, et al. Management guidelines of eosinophilic esophagitis in childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;58(1):107–18.
5. Liacouras CA. Clinical presentation and treatment of pediatric patients with eosinophilic esophagitis. *Gastroenterol Hepatol*. 2011;7(4):264-7.
6. Franciosi JP, Hommel KA, DeBrosse CW, Greenberg AB, Greenler AJ, Abonia JP, et al. Development of a validated patient-reported symptom metric for pediatric Eosinophilic Esophagitis: qualitative methods. *BMC Gastroenterol*. 2011;11:126.
7. Dohil R, Newbury R, Fox L, Bastian J, Aceves S. Oral viscous budesonide is effective in children with eosinophilic esophagitis in a randomized, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2011;139:418-429.
8. Aceves SS, Newbury RO, Dohil MA, Bastian JF, Dohil R. A symptom scoring tool for identifying pediatric patients with eosinophilic esophagitis and correlating symptoms with inflammation. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2009;103:401-406.
9. Deshpande PR, Rajan S, Sudeepthi BL, Abdul Nazir CP. Patient-reported outcomes: A new era in clinical research. *Perspect Clin Res*. 2011;2:137-44.
10. Beaton DE, Bombardier C, Guillemin F, Ferraz MB. Guidelines for the process of cross-cultural adaptation of self-report measure. *Spine*. 2000;25:3186-91.
11. Mapi Research Institute. Linguistic validation of a Patient Reported Outcomes Measure. Lyon: Mapi Research Institute, 2005.
12. Hsu, CC, Sandford BA. The Delphi technique: Making sense of consensus. *Practical Assessment, Research & Evaluation*. 2007;12(10):1-8.
13. Keeney S, Hasson F, McKenna H. Consulting the oracle: ten lessons from using the Delphi technique in nursing research. *J Adv Nurs*. 2006;53(2):205-212.
14. Rowe G, Wright G. The Delphi technique as a forecasting tool: Issues and analysis. *Int J Forecast*. 1999;15(4):353-375.

15. Giovinazzo RA. Modelo de aplicação da metodologia Delphi pela internet: vantagens e ressalvas. *Administração On Line*. 2001;2(2).
16. Mapi Research Institute. PEESV2.0 Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Severity Module version 2.0: Scaling and scoring version 1.0. Lyon: Mapi Research Institute, 2014.
17. Rothenberg ME, Pentiuk S, Putnam PE, Collins MH. Dissociation between symptoms and histological severity in pediatric eosinophilic esophagitis. *J Pediatric Gastr Nutr*. 2009; 48(2):152-160.
18. Martin LJ, Franciosi JP, Collins MH, Abonia JP, Lee JJ, Hommel KA, et al. Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Scores (PEESV2.0) identify histologic and molecular correlates of the key clinical features of disease. *J Allergy clin immunol*. 2015;135(6):1519-1528.
19. Tagnin SEO. O jeito que a gente diz. Combinações consagradas em inglês e português. Barueri: DISAL, 2013.
20. Houaiss A, Villar MS. Dicionário Houaiss de Língua Portuguesa. Elaborado pelo Instituto Antônio Houaiss de Lexicografia e Banco de Dados da Língua Portuguesa S/C Ltda. Rio de Janeiro: Objetiva, 2009.
21. Reeve BB, McFatrigh M, Pinheiro LC, Weaver MS, Sung L, Withycombe JS, et al. Eliciting the child's voice in adverse event reporting in oncology trials: Cognitive interview findings from the Pediatric Patient-Reported Outcomes version of the Common Terminology Criteria for Adverse Events initiative. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 Mar;64(3). [Epub ahead of print].
22. Murphy K, McKone E, Slee J. Dissociations between implicit and explicit memory in children: the role of strategic processing and the knowledge base. *J Exp Child Psychol*. 2003;84(2):124–165.
23. Jacobson CJ, Susmita K, Farrelle J, Barnett K, Goldschneider K, Dampier C, et al. Qualitative Evaluation of Pediatric Pain-Behavior, -Quality and -Intensity Item Candidates and the PROMIS Pain Domain Framework in Children with Chronic Pain. *J Pain*. 2015;16(12):1243-1255.
24. Stanford EA, Chambers CT, Craig KD. The role of developmental factors in predicting young children's use of a self-report scale for pain. *Pain*. 2006;120(1-2):16–23.
25. Wardle J, Guthrie CA, Sanderson S, Rapoport L. Development of the children's eating behaviour questionnaire. *J Child Psychol. Psychiat*. 2001;42(7):963-970.
26. Correia L. L.; Linhares M. B. M.; Assessment of the behavior of children in painful situations: literature review. *J Ped (Rio J)*. 2008;84(6):477-486.

Figura 1 – Fluxograma do processo de tradução e adaptação cultural da PEES em ESEEP



Legenda: PEES: Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score; ESEEP: Escore de Sintomas da Esofagite Eosinofílica Pediátrica.
Produzido pelos autores.

Tabela 1 – Itens do escore para pais de crianças de dois a dezoito anos enviados aos revisores independentes para obtenção de consenso por meio da técnica DELPHI

Item original	Opções de tradução	1ª Rodada Delphi (%)	2ª Rodada Delphi (%)	Versão Pré-Final
TÍTULO: Pediatric Eosinophilic Esophagitis (EoE) Symptom Score.	FW1: Gravidade dos sintomas de Esofagite Eosinofílica (EoE). FW2: Esofagite Eosinofílica (EoE) – Análise da intensidade dos sintomas. REC: Escala de registro dos sintomas da Esofagite Eosinofílica Pediátrica (EEo). SUGESTÃO	FW1: 0% FW2: 40% REC: 40% SUGESTÃO: 20% ESCORE DE SINTOMAS DA ESOFAGITE EOSINOFÍLICA PEDIÁTRICA (EEo).	FW1: 0% FW2: 20% REC: 0% SUGESTÃO: 80%	TÍTULO: Escore de sintomas da esofagite eosinofílica pediátrica (EEo).
Tell us about your child's problems with EoE in the past MONTH.	FW1: Conte-nos como seu filho passou no último mês. FW2: Conte-nos sobre como foram os sintomas do seu filho com (EoE) no último mês. REC: Conte-nos sobre quais foram as dificuldades do (a) seu (sua) filho (a) com EEo no último mês. SUGESTÃO	FW1: 0% FW2: 20% REC: 80% SUGESTÃO: 0%	- - - -	Conte-nos sobre quais foram as dificuldades do(a) seu(sua) filho(a) com EEo no último mês.
Not bad at all / A little bad / Kind of bad/ Bad/ Very bad.	FW1: Normal/ Não tão mal/ Um pouco mal/ Mal/ Muito mal. FW2: Normal/ Um pouco mal/ Mais ou menos mal/ Mal/ Muito mal. REC: Nada mal/ Um pouco mal/ Mais ou menos mal/ Mal/ Muito mal. SUGESTÃO: -	FW1: 0% FW2: 0% REC: 100% SUGESTÃO: -	- - - -	Nada mal/ Um pouco mal/ Mais ou menos mal/ Mal/ Muito mal.

Item original	Opções de tradução	1ª Rodada Delphi (%)	2ª Rodada Delphi (%)	Versão Pré-Final
3. How often does your child have heartburn (burning in the chest, mouth, or throat)?	FW1: Com que frequência seu filho sente azia (queimação no peito, boca ou garganta)?	FW1: 20%	-	3. Com que frequência seu(sua) filho(a) sente azia (queimação no peito, boca ou garganta)?
	FW2: Com que frequência seu filho (a) sente queimação na boca, peito ou garganta?	FW2: 0%	-	
	REC: Com que frequência seu (sua) filho (a) sente azia (queimação no peito, boca ou garganta)?	REC: 80%	-	
	SUGESTÃO: -	SUGESTÃO: -	-	
20. How often does your child need more time to eat than others?	FW1: Com que frequência seu filho precisa de mais tempo do que as outras pessoas para terminar suas refeições?	FW1: 20%	-	20. Com que frequência seu(sua) filho(a) precisa de mais tempo para comer do que as outras crianças?
	FW2: Você sente que seu filho (a) precisa de mais tempo para comer do que as outras pessoas?	FW2: 0%	-	
	REC: Com que frequência seu(sua) filho(a) precisa de mais tempo para comer do que as outras crianças?	REC: 80%	-	
	SUGESTÃO: -	SUGESTÃO: -	-	

Legenda: FW1 – tradutor 1; FW2 – tradutor 2; REC: Reconciliação

Tabela 2 – Processo de tradução (tradução, reconciliação e retrotradução) do escore para pacientes de oito a dezoito anos®

ORIGINAL	REC	BT	PRÉ-FINAL
Pediatric Eosinophilic Esophagitis (EoE) Symptom Score	Escala de registro dos sintomas da Esofagite Eosinofílica Pediátrica (EEo)	Eosinophilic Esophagitis symptoms in children Scale	Escore de sintomas da Esofagite Eosinofílica Pediátrica (EEo).
Children and teens report (ages 8 - 18)	Relatório para crianças e adolescentes (8- 18 anos)	Children and adolescents (8 - 18) Report	Relatório para crianças e adolescentes (8- 18 anos)
Tell us about your problems with EoE in the past MONTH.	Conte-nos sobre quais foram suas dificuldades com (EEo) no último mês.	Tell us the difficulties that you have had with (EEo) during the last month.	Conte-nos sobre quais foram suas dificuldades com a Esofagite no último MÊS.
There are no right or wrong answers. Please circle the best number.	Não há respostas certas ou erradas. Por favor, circule o número que melhor representa sua escolha.	There are no right or wrong answers. Please mark the number that best represents your choice.	Não há respostas certas ou erradas. Por favor, circule o número que melhor representa sua escolha.
Please answer the question in the Frequency section and then the related question in the Severity section.	Por favor, responda à pergunta na seção de Frequência e depois à pergunta relacionada na seção Gravidade.	Please respond to the questions in the Frequency section and then the questions related to the Seriousness section.	Por favor, responda à pergunta na seção de Frequência e, depois, à pergunta relacionada na seção Gravidade.
Never/ Almost never (less than once a week) / Sometimes (1 or more times a week) / Often (1 time a day) / Almost always (2 or more times a day)	Nunca / Quase nunca (menos de uma vez por semana) / Às vezes (uma ou mais vezes por semana) / Frequentemente (Uma vez por dia) / Quase sempre (duas ou mais vezes ao dia)	Never / Almost never (less than once a week) / Sometimes (once or more a week) / Frequently (once a day) / Almost always (twice or more a day)	Nunca / Quase nunca (menos de uma vez por semana) / Às vezes (uma ou mais vezes por semana) / Frequentemente (Uma vez por dia) / Quase sempre (duas ou mais vezes ao dia)
Not bad at all / A little bad / Kind of bad/ Bad/ Very bad.	Nada mal/ Um pouco mal/ Mais ou menos mal/ Mal/ Muito mal.	Don't feel anything/ Not so bad/ Pretty bad/ Terrible/ Really terrible	Nada mal/ Um pouco mal/ Mais ou menos mal/ Mal/ Muito mal.
1. How often do you have chest pain, ache, or hurt?	1. Com que frequência você sente dor no peito?	1. How often do you have chest pains?	1. Com que frequência você sente dor no peito?
2. How bad is the chest pain, ache, or hurt?	2. Como você se sente quando está com dor no peito?	2. How do you feel when you have chest pains?	2. Como você se sente quando está com dor no peito?
3. How often do you have heartburn (burning in your chest, mouth, or throat)?	3. Com que frequência você sente azia (queimação no peito, boca ou garganta)?	3. How often do you have heartburn? (a burning feeling in the chest, mouth or throat?)	3. Com que frequência você sente azia (queimação no peito, boca ou garganta)?
4. How bad is your heartburn (burning in your chest, mouth, or throat)?	4. Como você se sente quando está com azia (queimação no peito, boca ou garganta)?	4. How do you feel when you have heartburn? (burning in the chest, mouth or throat?)	4. Como você se sente quando está com azia (queimação no peito, boca ou garganta)?
5. How often do you have stomach aches or belly aches?	5. Com que frequência você sente dores de estômago ou de barriga?	5. How often do you have stomach or abdominal pain?	5. Com que frequência você sente dor de estômago ou de barriga?
6. How bad are the stomach aches or belly aches?	6. Como você se sente quando está com dores de estômago ou de barriga?	6. How do you feel when you have stomach or abdominal pain?	6. Como você se sente quando está com dor de estômago ou de barriga?
7. How often do you have trouble swallowing?	7. Com que frequência você tem dificuldade para engolir?	7. How often do you have difficulty swallowing?	7. Com que frequência você tem dificuldade para engolir?
8. How bad is the trouble swallowing?	8. Como você se sente quando está com dificuldade para engolir?	8. How do you feel when you have difficulty swallowing?	8. Como você se sente quando está com dificuldade para engolir?
9. How often do you feel like food gets stuck in your throat or chest?	9. Com que frequência você sente como se a comida ficasse parada em sua garganta ou peito?	9. How often do you feel that your food is stuck in your throat or in your chest?	9. Com que frequência você se sente como se a comida ficasse presa em sua garganta ou peito?

ORIGINAL	REC	BT	PRÉ-FINAL
10. How bad is it when food gets stuck in your throat or chest?	10. Como você se sente quando a comida fica parada na sua garganta ou no peito?	10. How do you feel when food is stuck in your throat or chest?	10. Como você se sente quando a comida fica presa em sua garganta ou peito?
11. How often do you need to drink a lot to help swallow your food?	11. Com que frequência você precisa beber algo para ajudar a engolir a comida?	11. How often do you need to drink something to help swallow your food?	11. Com que frequência você precisa beber algo para ajudar a engolir a comida?
12. How bad is it if you don't drink a lot to help swallow your food?	12. Como você se sente se não bebe algo para ajudar a engolir a comida?	12. How do you feel if you don't drink something to help swallow your food?	12. Como você se sente se não bebe algo para ajudar a engolir a comida?
13. How often do you vomit (throw up)?	13. Com que frequência você vomita?	13. How often do you vomit or throw up?	13. Com que frequência você vomita?
14. How bad is the vomiting (throwing up)?	14. Como você se sente quando vomita?	14. How do you feel when you vomit?	14. Como você se sente quando vomita?
15. How often do you feel nauseous (feel like you're going to throw up, but don't)?	15. Com que frequência você sente náuseas (quando você sente que vai vomitar, mas não vomita)?	15. How often do you feel nauseated? (when you feel like vomiting but don't vomit?)	15. Com que frequência você sente náuseas (sente que vai vomitar, mas não vomita)?
16. How bad is the nausea (feeling like you're going to throw up, but don't)?	16. Como você se sente quando está com náusea (quando você sente que vai vomitar, mas não vomita)?	16. How do you feel when you're nauseated? (feel like vomiting but don't)	16. Como você se sente quando está com náuseas (sentindo que vai vomitar, mas não vomita)?
17. How often does food come back up your throat when eating?	17. Com que frequência a comida volta pela sua garganta quando você está comendo?	17. How often does the food come back up into your throat after swallowing?	17. Com que frequência a comida volta pela sua garganta quando você está comendo?
18. How bad is the food coming back up your throat when eating?	18. Como você se sente quando a comida volta pela sua garganta quando você está comendo?	18. How do you feel when the food comes back up into your throat?	18. Como você se sente quando a comida volta pela garganta quando você está comendo?
19. How often do you eat less food than others?	19. Com que frequência você come menos do que as outras crianças?	19. How often do you eat less than other people?	19. Com que frequência você come menos do que as outras crianças?
20. How often do you need more time to eat than others?	20. Com que frequência você precisa de mais tempo para comer do que as outras crianças?	20. How often do you need more time to eat than other people?	20. Com que frequência você precisa de mais tempo para comer do que as outras crianças?

© Todos direitos reservados (Mapi Research Trust). REC: Reconciliação; BT: *Backtranslation* (retrotradução)

Tabela 3 – Itens da versão pré-final, sugestões do pré-teste e versão final, do escore para pais/responsáveis de pacientes de dois a 18 anos e pacientes de oito a 18 anos®

Item versão pré-final	Sugestão pré-teste	Item final
Opção de frequência: Quase nunca (menos de uma vez por semana)	Raramente (uma ou mais vezes por mês) ou De vez em quando (mensalmente)	Raramente (uma ou mais vezes por mês)
15. Com que frequência seu(sua) filho(a) sente náuseas (sente que vai vomitar, mas não vomita)? (versão para pais/responsáveis)	Enjoo	15. Com que frequência seu(sua) filho(a) sente enjoos (sente que vai vomitar, mas não vomita)?
15. Com que frequência você sente náuseas (sente que vai vomitar, mas não vomita)? (versão para pacientes)	Enjoo Ou “Embrulhar o estômago”	15. Com que frequência você sente enjoos (sente que vai vomitar, mas não vomita)?
19. Com que frequência seu(sua) filho(a) come menos do que as outras crianças?	Outras pessoas	19. Com que frequência seu(sua) filho(a) come menos do que as outras pessoas?
19. Com que frequência você come menos do que as outras crianças?	Outras pessoas	19. Com que frequência você come menos do que as outras pessoas?
20. Com que frequência seu(sua) filho(a) precisa de mais tempo para comer do que as outras crianças?	Outras pessoas	20. Com que frequência seu(sua) filho(a) precisa de mais tempo para comer do que as outras pessoas?
20. Com que frequência você precisa de mais tempo para comer do que as outras crianças?	Outras pessoas	20. Com que frequência você precisa de mais tempo para comer do que as outras pessoas?

® Todos direitos reservados (Mapi Research Trust)

REFERÊNCIAS

- ACEVES, S. S. et al. A symptom scoring tool for identifying pediatric patients with eosinophilic esophagitis and correlating symptoms with inflammation. **Annals of Allergy Asthma Immunology**, v. 103, n. 5, p. 401-406, 2009.
- BEATON DE et al. Guidelines for the process of cross-cultural adaptation of self-report measure. **Spine**, v.25, n. 24, p. 3186-3191, 2000.
- CELLA, D. et al. The patient-reported outcomes measurement information system (PROMIS): progress of an NIH roadmap cooperative group during its first two years. **Medical Care**, v. 45, p. S3-S11, 2007.
- CIANFERONI, A; SPERGEL, J. Eosinophilic Esophagitis: a comprehensive review. **Clinical Reviews in Allergy Immunology**, v. 50, p. 159-174, 2016.
- DESHPANDE, P. R. et al. Patient-reported outcomes: a new era in clinical research. **Perspectives in Clinical Research**, v. 2, n. 4, p. 137-144, 2011.
- DOHIL, R. et al. Oral viscous budesonide is effective in children with eosinophilic esophagitis in a randomized, placebo-controlled trial. **Gastroenterology**, v. 139, p.418–429, 2010.
- EREMENCO, S. L.; CELLA, D.; ARNOLD, B. J. A comprehensive method for the translation and cross-cultural validation of health status questionnaires. **Evaluation & the Health Professions**, v. 28, n. 2, p. 212–232, 2005.
- FLOOD, E. M. et al. Patient and caregiver perspective on pediatric eosinophilic esophagitis and newly developed symptom questionnaires*. **Current Medical Research and Opinion**, v. 24, n.12, p.3369-81, 2008.
- FRANCIOSI, J. P. et al. Development of a validated patient-reported symptom metric for pediatric eosinophilic esophagitis: qualitative methods. **BMC Gastroenterology**, v. 11, n. 126, 2011.
- FURUTA, G. T. et al. Eosinophilic esophagitis in children and adults: a systematic review and consensus recommendations for diagnosis and treatment. **Gastroenterology**, v. 133, n. 4, p. 1342–63, 2007.
- GIOVINAZZO, R. A. Modelo de aplicação da metodologia Delphi pela internet: vantagens e ressalvas. **Administração On Line**, v. 2, n.2, 2001.
- GJERSING, L.; CAPLEHORN, J. R. M.; CLAUSEN, T. Cross-cultural adaptation of research instruments: language, setting, time and statistical considerations. **BMC medical research methodology**, v. 10, p. 13, 2010.
- GONSALVES, N. Food allergies and eosinophilic gastrointestinal illness. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 36, n.1, p.75-91, vi. 2007.

HSU, C.C.; SANDFORD, B.A. The Delphi technique: making sense of consensus. **Practical Assessment, Research & Evaluation**, v. 12, n.10, p.1-8, 2007.

KEENEY, S.; HASSON, F.; MCKENNA, H. Consulting the oracle: ten lessons from using the Delphi technique in nursing research. **Journal of Advanced Nursing**, v. 53, n.2, p.205-212, 2006.

LIACOURAS, C. A. et al. Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 128, n. 1, p. 3–20, 2011.

LIACOURAS, C.A. et al. Eosinophilic esophagitis: clinical presentation in children. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 43, n. 2, p. 219–29, 2014.

MARTIN, L. J. et al. Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Scores (PEESS v2.0) identify histologic and molecular correlates of the key clinical features of disease. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 135, n. 6, p. 1519-1528, 2015.

PENTIUK, S. et al. Dissociation between symptoms and histological severity in pediatric eosinophilic esophagitis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 48, n.2, p.152-160, 2009.

PAPADOPOULOU, A. et al. Management guidelines of eosinophilic esophagitis in childhood. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 58, n.1, p.107-118, 2014.

REEVE, B. B. et al. Psychometric evaluation and calibration of health-related quality of life item banks: plans for the Patient-Reported Outcomes Measurement Information System (PROMIS). **Medical care**, v. 45, p. S22-S31. 2007.

REICHENHEIM, M. E.; MORAES, C. L. [Operationalizing the cross-cultural adaptation of epidemiological measurement instruments]. **Revista De Saude Publica**, v. 41, n. 4, p. 665–673, 2007.

ROWE, G.; WRIGHT, G. The Delphi technique as a forecasting tool: Issues and analysis. **International Journal Forecasting**, v. 15, n. 4, p. 353-375, 1999.

SOUSA, V. D.; ROJJANASRIRAT, W. Translation, adaptation and validation of instruments or scales for use in cross-cultural health care research: a clear and user-friendly guideline: Validation of instruments or scales. **Journal of Evaluation in Clinical Practice**, v. 17, n. 2, p. 268–274, 2011.

SPERGEL, J. M. et al. 14 years of eosinophilic esophagitis: clinical features and prognosis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 48, n. 1, p. 30–6, 2009.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES et al. Guidance for Industry. Patient-Reported Outcome Measures: use in medical product development to support labeling claims. **Clinical/Medical**, 2009.

WANG, F. Y.; GUPTA, S. K.; FITZGERALD, J. F. Is there a seasonal variation in the incidence or intensity of allergic eosinophilic esophagitis in newly diagnosed children? **Journal Clinical Gastroenterol**, v. 41, n. 5, p.451-453, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO PELO CEP (COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA).

The screenshot displays the 'Plataforma Brasil' web interface. The top header includes the 'Saúde' logo and 'Ministério da Saúde'. Below this, the 'Plataforma Brasil' logo is on the left, and 'principal' and 'sair' buttons are on the right. A navigation bar contains 'Público', 'Pesquisador', and 'Alterar Meus Dados' buttons. The user is identified as 'Maria Fernanda Oliveira Santos - Pesquisador | V3.0' with a session expiration of '38min 48'. The main content area is titled 'DETALHAR PROJETO DE PESQUISA'. It features a section 'DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA' with the following details: 'Título da Pesquisa: Tradução, adaptação cultural e validação da Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score (PEESS v2.0)', 'Pesquisador Responsável: Helena Borges Martins da Silva Paro', 'Área Temática: Versão: 3', 'CAAE: 45527715.3.0000.5152', 'Submetido em: 11/11/2015', 'Instituição Proponente: Faculdade de Medicina', 'Situação da Versão do Projeto: Aprovado', 'Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável', and 'Patrocinador Principal: Financiamento Próprio'. A circular stamp with 'COORDENADOR' and 'PLATAFORMA BRASIL' is visible. Below this, a 'Comprovante de Receção' is shown with a PDF icon and the file name 'PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_413539'. A section 'DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA' is partially visible at the bottom.

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Tradução, adaptação cultural e validação da Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score (PEESS v2.0)
Pesquisador Responsável: Helena Borges Martins da Silva Paro
Área Temática:
Versão: 3
CAAE: 45527715.3.0000.5152
Submetido em: 11/11/2015
Instituição Proponente: Faculdade de Medicina
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Comprovante de Receção: PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_413539

DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO TRADUÇÃO DO ESCORE PELO MAPI RESEARCH TRUST.



PEESS (ID: 37225)

In response to the Research Ethics Committee of the University of Uberlândia, we certify that **Cristina Palmer de Barros** is granted permission to translate, validate and use the Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptoms Severity Module version 2.0 (PEESS v.2) © Children's Hospital Medical Center, 2010, in the non-funded research project named "Phenotypic characterization of Pediatric Patients with Esophageal Eosinophilia and Biomarker Research Applied to the Diagnosis of Eosinophilic Esophagitis", as stated in the User Agreement Special and General terms signed by the aforementioned researcher.

Agreed to and accepted by:

Mapi Research Trust

27 rue de la Villette
69003 LYON
France

Name:
Christelle BERNE

Title:
PRO information Support Team Manager

Signature

Date:
29th October 2015

ANEXO C – TCLE PARA PACIENTES E PAIS / RESPONSÁVEIS

TERMO DE ASSENTIMENTO PARA O MENOR (ENTRE OITO E DEZOITO ANOS DE IDADE)

Você está sendo convidado(a) para participar da pesquisa intitulada “**Tradução, adaptação cultural e validação da *Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score (PEESS v2.0)***”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Profa. Helena Borges Martins da Silva Paro, Profa. Cristina Palmer Barros e Maria Fernanda Oliveira Santos.

Nesta pesquisa nós estamos buscando traduzir, adaptar linguisticamente e validar uma escala de frequência e intensidade de sintomas relacionados à esofagite eosinofílica - a escala PEESS.

Na sua participação, você responderá um questionário referente à frequência e à intensidade dos sintomas que o levaram a necessitar da endoscopia digestiva alta. Responderá também um questionário com dados como idade, sexo, presença de doenças gastrointestinais prévias, utilização de tratamento prévio e seu tempo de duração, antecedentes de doenças/sintomas alérgicas.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar da pesquisa.

Apesar dos pesquisadores envolvidos comprometerem-se com o uso dos questionários apenas para a finalidade da pesquisa e responsabilizarem-se pela não divulgação dos dados de identificação obtidos, você poderá sentir algum tipo de desconforto na abordagem para participação da pesquisa. Como estratégia para minimizar esse desconforto, você será abordado pelo pesquisador, que não tem envolvimento com a equipe médica responsável pelas endoscopias. Sinta-se à vontade para a recusa na participação da pesquisa. Não há riscos financeiros ou biológicos nessa pesquisa.

Os benefícios serão a validação e adaptação de uma escala de sintomas de Esofagite Eosinofílica na pediatria para a língua portuguesa do Brasil. A escala poderá contribuir para os procedimentos necessários para o diagnóstico dessa doença.

Mesmo seu responsável legal tendo consentido na sua participação na pesquisa, você não é obrigado a participar da mesma se não desejar. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma via original deste Termo de Esclarecimento ficará com você.

Em caso de qualquer dúvida a respeito da pesquisa você poderá entrar em contato com Maria Fernanda Oliveira Santos ou Profa. Dra. Helena Borges Martins da Silva Paro, na secretaria do Programa de Pós-graduação: Av. Pará 1720, bloco H, Campus Umuarama – Uberlândia- MG, CEP: 38405- 320, fone: (34) 3218-2389. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: (34) 3239-4131.

Uberlândia, de de 20.....

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PARA
PAIS/RESPONSÁVEIS DE CRIANÇAS ENTRE DOIS A DEZOITO ANOS**

Você está sendo convidado(a) para participar da pesquisa intitulada “**Tradução, adaptação cultural e validação da *Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score (PEESS v2.0)***”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Profa. Helena Borges Martins da Silva Paro, Profa. Cristina Palmer Barros e Maria Fernanda Oliveira Santos.

Nesta pesquisa nós estamos buscando traduzir, adaptar linguisticamente e validar uma escala de frequência e intensidade de sintomas relacionados à esofagite eosinofílica - a escala PEESS.

Na sua participação, você responderá um questionário referente à frequência e à intensidade dos sintomas que levaram o(a) seu(sua) filho(a) a necessitar da endoscopia digestiva alta. Responderá também um questionário com dados sobre seu(sua) filho(a) como idade, sexo, presença de doenças gastrointestinais prévias, utilização de tratamento prévio e seu tempo de duração, antecedentes de doenças/sintomas alérgicas.

Em nenhum momento você ou seu(sua) filho(a) serão identificados. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar da pesquisa.

Apesar dos pesquisadores envolvidos comprometerem-se com o uso dos questionários apenas para a finalidade da pesquisa e responsabilizarem-se pela não divulgação dos dados de identificação obtidos, você poderá sentir algum tipo de desconforto na abordagem para participação da pesquisa. Como estratégia para minimizar esse desconforto, você será abordado pelo pesquisador, que não tem envolvimento com a equipe médica responsável pelas endoscopias. Sinta-se à vontade para a recusa na participação da pesquisa. Não há riscos financeiros ou biológicos nessa pesquisa.

Os benefícios serão a validação e adaptação de uma escala de sintomas de Esofagite Eosinofílica na pediatria para a língua portuguesa do Brasil. A escala poderá contribuir para os procedimentos necessários para o diagnóstico dessa doença.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma via original deste Termo de Esclarecimento ficará com você.

Em caso de qualquer dúvida a respeito da pesquisa você poderá entrar em contato com Maria Fernanda Oliveira Santos ou Profa. Dra. Helena Borges Martins da Silva Paro, na secretaria do Programa de Pós-graduação: Av. Pará 1720, bloco H, Campus Umuarama – Uberlândia-MG, CEP: 38405- 320, fone: (34) 3218-2389. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: (34) 3239-4131.

Uberlândia, de de 20.....

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - PARA RESPONSÁVEL LEGAL DO MENOR DE IDADE

Prezado(a) senhor(a), o(a) menor, pelo qual o(a) senhor(a) é responsável, está sendo convidado(a) para participar da pesquisa intitulada **Tradução, adaptação cultural e validação da *Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score (PEESS v2.0)***, sob a responsabilidade dos pesquisadores Profa. Helena Borges Martins da Silva Paro, Profa. Cristina Palmer Barros e Maria Fernanda Oliveira Santos.

Nesta pesquisa nós estamos buscando traduzir, adaptar linguisticamente e validar uma escala de frequência e intensidade de sintomas relacionados à esofagite eosinofílica - a escala PEESS.

Na participação do(a) menor, ele(a) responderá um questionário referente à frequência e à intensidade dos sintomas que o levaram a necessitar da endoscopia digestiva alta. Responderá também um questionário com dados como idade, sexo, presença de doenças gastrointestinais prévias, utilização de tratamento prévio e seu tempo de duração, antecedentes de doenças/sintomas alérgicas.

Em nenhum momento o(a) menor será identificado(a). Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

O(A) menor não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar da pesquisa.

Apesar dos pesquisadores envolvidos comprometerem-se com o uso dos questionários apenas para a finalidade da pesquisa e responsabilizarem-se pela não divulgação dos dados de identificação obtidos, o(a) menor poderá sentir algum tipo de desconforto na abordagem para participação da pesquisa. Como estratégia para minimizar esse desconforto, o(a) menor será abordado(a) pelo pesquisador, que não tem envolvimento com a equipe médica responsável pelas endoscopias. O(a) menor deverá sentir-se à vontade para a recusa na participação da pesquisa. Não há riscos financeiros ou biológicos nessa pesquisa.

O(A) menor é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o(a) senhor(a), responsável legal pelo(a) menor.

A pesquisadora responsável por este projeto é a Profa. Dra. Helena Borges Martins da Silva Paro, Professora Adjunto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, tendo esse documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética dessa instituição.

Em caso de qualquer dúvida a respeito da pesquisa você poderá entrar em contato com Maria Fernanda Oliveira Santos ou Profa. Dra. Helena Borges Martins da Silva Paro, na secretaria do Programa de Pós-graduação: Av. Pará 1720, bloco H, Campus Umuarama – Uberlândia- MG, CEP: 38405- 320, fone: (34) 3218-2389. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: (34) 3239-4131.

Uberlândia, dede 20.....

Assinatura dos pesquisadores

Eu, responsável legal pelo(a) menor _____, consinto na sua participação no projeto citado acima, caso ele(a) deseje, após ter sido devidamente esclarecido(a).

Responsável pelo(a) menor participante da pesquisa

ANEXO D – ESCORE DE SINTOMAS DA ESOFAGITE EOSINOFÍLICA PEDIÁTRICA (ESEEP)

RELATÓRIO PARA PAIS DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES (2-18 ANOS)






ESCORE DE SINTOMAS DA ESOFAGITE EOSINOFÍLICA PEDIÁTRICA (EEo)

RELATÓRIO PARA OS PAIS DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES (2-18 ANOS)

Conte-nos sobre quais foram as dificuldades do(a) seu(sua) filho(a) com a Esofagite no último MÊS.

Não há respostas certas ou erradas. Por favor, circule o número que melhor representa sua escolha.

Por favor, responda à pergunta na seção de **Frequência** e, depois, à pergunta relacionada na seção **Gravidade**

FREQUÊNCIA					GRAVIDADE				
Nunca	Raramente (uma ou mais vezes por mês)	As vezes (uma ou mais vezes por semana)	Frequente- mente (Uma vez por dia)	Quase sempre (duas ou mais vezes ao dia)	Nada mal	Um pouco mal	Mais ou menos mal	Mal	Muito mal
									
Com que frequência seu(sua) filho(a) fica doente?					Como ele(a) se sente quando fica doente?				
0	1	2	3	4	0	1	2	3	4

Para uso exclusivo dos pesquisadores

Número de identificação da pesquisa:	Numero de identificação do sujeito de pesquisa:	Date do preenchimento:	Dia	Mês	Ano
1. Com que frequência seu(sua) filho(a) sente dor no peito?					
0	1	2	3	4	
3. Com que frequência seu(sua) filho(a) sente azia (queimação no peito, boca ou garganta)?					
0	1	2	3	4	
5. Com que frequência seu(sua) filho(a) tem dor de estômago ou de barriga?					
0	1	2	3	4	
2. Como seu(sua) filho(a) se sente quando está com dor no peito?					
0	1	2	3	4	
4. Como seu(sua) filho(a) se sente quando está com azia (queimação no peito, boca ou garganta)?					
0	1	2	3	4	
6. Como seu(sua) filho(a) se sente quando tem dor de estômago ou de barriga?					
0	1	2	3	4	

Conte-nos sobre quais foram as dificuldades do(a) seu(sua) filho(a) com a Esofagite no último **MÊS**

FREQUENCIA				
Nunca	Raramente (uma ou mais vezes por mês)	As vezes (uma ou mais vezes por semana)	Frequenteme n-te (Uma vez por dia)	Quase sempre (duas ou mais vezes ao dia)

7. Com que frequência seu(sua) filho(a) tem dificuldade para engolir?

0	1	2	3	4
---	---	---	---	---

9. Com que frequência seu(sua) filho(a) sente como se a comida ficasse presa em sua garganta ou peito?

0	1	2	3	4
---	---	---	---	---

11. Com que frequência seu(sua) filho(a) precisa beber algo para ajudar a engolir a comida?

0	1	2	3	4
---	---	---	---	---

13. Com que frequência seu(sua) filho(a) vomita?

0	1	2	3	4
---	---	---	---	---

15. Com que frequência seu(sua) filho(a) sente enjoos (sente que vai vomitar, mas não vomita)?

0	1	2	3	4
---	---	---	---	---

17. Com que frequência a comida volta pela garganta do(a) seu(sua) filho(a) quando ele(a) come?

0	1	2	3	4
---	---	---	---	---

19. Com que frequência seu(sua) filho(a) come menos do que as outras pessoas?

0	1	2	3	4
---	---	---	---	---

20. Com que frequência seu(sua) filho(a) precisa de mais tempo para comer do que as outras pessoas?

0	1	2	3	4
---	---	---	---	---

GRAVIDADE				
Nada mal	Um pouco mal	Mais ou menos mal	Mal	Muito mal
				

8. Como seu(sua) filho(a) se sente quando está com dificuldade para engolir?

0	1	2	3	4
---	---	---	---	---

10. Como seu(sua) filho(a) se sente quando a comida fica presa em sua garganta ou peito?

0	1	2	3	4
---	---	---	---	---

12. Como seu(sua) filho(a) se sente se não bebe algo para ajudar a engolir a comida?

0	1	2	3	4
---	---	---	---	---

14. Como seu(sua) filho(a) se sente quando vomita?

0	1	2	3	4
---	---	---	---	---

16. Como seu(sua) filho(a) se sente quando está com enjoos (sentindo que vai vomitar, mas não vomita)?

0	1	2	3	4
---	---	---	---	---

18. Como seu(sua) filho(a) se sente quando a comida volta pela garganta?

0	1	2	3	4
---	---	---	---	---

Muito obrigado(a) por participar!

ANEXO E – ESCORE DE SINTOMAS DA ESOFAGITE EOSINOFÍLICA PEDIÁTRICA (ESEEP)

RELATÓRIO PARA CRIANÇAS E ADOLESCENTES (8-18 ANOS)






ESCORE DE SINTOMAS DA ESOFAGITE EOSINOFÍLICA PEDIÁTRICA (EEo)

RELATÓRIO PARA CRIANÇAS E ADOLESCENTES (8-18 ANOS)

Conte-nos sobre quais foram suas dificuldades com a Esofagite no último MÊS.

Não há respostas certas ou erradas. Por favor, circule o número que melhor representa sua escolha.

Por favor, responda à pergunta na seção de **Frequência** e, depois, à pergunta relacionada na seção **Gravidade**

FREQUÊNCIA					GRAVIDADE				
Nunca	Raramente (uma ou mais vezes por mês)	As vezes (uma ou mais vezes por semana)	Frequente mente (Uma vez por dia)	Quase sempre (duas ou mais vezes ao dia)	Nada mal	Um pouco mal	Mais ou menos mal	Mal	Muito mal
									
Com que frequência você fica doente?					Como você se sente quando fica doente?				
0	1	2	3	4	0	1	2	3	4

Para uso exclusivo dos pesquisadores

Número de identificação da pesquisa:	Numero de identificação do sujeito de pesquisa:	Date do preenchimento:			
			Dia	Mês	Ano

1. Com que frequência você sente dor no peito?				
0	1	2	3	4
3. Com que frequência você sente azia (queimação no peito, boca ou garganta)?				
0	1	2	3	4
5. Com que frequência você sente dor de estômago ou de barriga?				
0	1	2	3	4

2. Como você se sente quando está com dor no peito?				
0	1	2	3	4
4. Como você se sente quando está com azia (queimação no peito, boca ou garganta)?				
0	1	2	3	4
6. Como você se sente quando está com dor de estômago ou de barriga?				
0	1	2	3	4

Conte-nos sobre quais foram suas dificuldades com a Esofagite no último **MÊS**

FREQUENCIA				
Nunca	Raramente (uma ou mais vezes por mês)	As vezes (uma ou mais vezes por semana)	Frequentemente (Uma vez por dia)	Quase sempre (duas ou mais vezes ao dia)

7. Com que frequência você tem dificuldade para engolir?	0	1	2	3	4
--	---	---	---	---	---

9. Com que frequência você se sente como se a comida ficasse presa em sua garganta ou peito?	0	1	2	3	4
--	---	---	---	---	---

11. Com que frequência você precisa beber algo para ajudar a engolir a comida?	0	1	2	3	4
--	---	---	---	---	---

13. Com que frequência você vomita?	0	1	2	3	4
-------------------------------------	---	---	---	---	---

15. Com que frequência você sente enjoos (sente que vai vomitar, mas não vomita)?	0	1	2	3	4
---	---	---	---	---	---

17. Com que frequência a comida volta pela sua garganta quando você está comendo?	0	1	2	3	4
---	---	---	---	---	---

19. Com que frequência você come menos do que as outras pessoas?	0	1	2	3	4
--	---	---	---	---	---

20. Com que frequência você precisa de mais tempo para comer do que as outras pessoas?	0	1	2	3	4
--	---	---	---	---	---

GRAVIDADE				
Nada mal	Um pouco mal	Mais ou menos mal	Mal	Muito mal
				

8. Como você se sente quando está com dificuldade para engolir?	0	1	2	3	4
---	---	---	---	---	---

10. Como você se sente quando a comida fica presa em sua garganta ou peito?	0	1	2	3	4
---	---	---	---	---	---

12. Como você se sente se não bebe algo para ajudar a engolir a comida?	0	1	2	3	4
---	---	---	---	---	---

14. Como você se sente quando vomita?	0	1	2	3	4
---------------------------------------	---	---	---	---	---

16. Como você se sente quando está com enjoos (sentindo que vai vomitar, mas não vomita)?	0	1	2	3	4
---	---	---	---	---	---

18. Como você se sente quando a comida volta pela garganta quando você está comendo?	0	1	2	3	4
--	---	---	---	---	---

Muito obrigado(a) por participar!