



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS – UniEVANGÉLICA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO
E AÇÃO COMUNITÁRIA - PROPPE**



**Inovação, Desenvolvimento e Sustentabilidade: Estreitamento
entre Universidade e Setor Produtivo no Estado de Goiás.**

Prof. Dr. Sandro Dutra e Silva
COORDENADOR DA PROPOSTA

Anápolis – GO, 2019.

SUMÁRIO

Identificação da proposta.....	5
Características da instituição proponente.....	6
Síntese orçamentária do projeto.....	8

Projeto 1 Análise da atividade cerebral e do movimento de membros superiores em indivíduos com síndrome de down submetidos à estimulação transcraniana por corrente contínua associada à realidade virtual.....	16
--	-----------

Introdução	18
Contextualização	19
Justificativa	35
Hipóteses	37
Objetivos	38
Plano de trabalho e cronograma de execução	39
Materiais e método	39
Procedimentos	48
Riscos e benefícios	50
Análise dos resultados	51
Orçamentos Capital e Bolsa FAPEG	52
Referências bibliográficas	53

Projeto 2 Planejamento e desenvolvimentos de novos fármacos de origem natural e sintética.	63
--	-----------

Introdução	64
Contextualização	65
Justificativa	68
Objetivos	69

Plano de trabalho e cronograma de execução	70
Materiais e método	70
Procedimentos	82
Métodos Computacionais.....	85
Estudos de dosagem molecular.....	89
Análise estatística	91
Orçamentos Capital e Bolsa FAPEG	92
Referências bibliográficas	95

Projeto 3 Estudo da viabilidade econômico ambiental da implantação de micro usinas fotovoltaicas no nordeste goiano - FOTOVOLT.100

Objetivos	101
Justificativa	104
Metodologia	112
Metas e resultados esperados	115
Especificação dos produtos	117
Orçamentos Capital e Bolsa FAPEG	119
Referências bibliográficas	121

Projeto 4 Acanthaceae do cerrado goiano: ocorrência, fitoquímica, potencial farmacológico e implicações para conservação124

Introdução	126
Contextualização	128
Objetivos e metas	130

Fundamentação teórica	131
Principais contribuições científicas e/ou tecnológicas da proposta	137
Metodologia	137
Resultados esperados	151
Cronograma	152
Orçamentos Capital e Bolsa FAPEG	153
Referências Bibliográficas	155

Identificação da Proposta

A Pró-Reitoria de Pós Graduação, Pesquisa, Extensão e Ação Comunitária – PROPPE do Centro Universitário de Anápolis – UniEVANGÉLICA apresenta esta proposta à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG com o intuito de participar da seleção de propostas de apoio financeiro visando consolidar a Pós-graduação *Stricto Sensu* no Centro-Norte Goiano.

Embora se tenha conhecimento, é importante salientar que os Programas de Pós-graduação em nível *Stricto Sensu* têm propiciado o desenvolvimento das potencialidades institucionais e regionais, reduzindo as assimetrias regionais, fortalecendo e consolidando linhas de pesquisa e ampliando o vínculo entre pesquisadores nacionais e internacionais por meio de redes, sejam elas desenvolvidas através da transferência de tecnologia, geração de novos produtos e/ou conhecimentos relevantes à sociedade os quais causam um considerável impacto social, bem como a publicação científica em periódicos qualificados ou mesmo a participação em eventos científicos nacionais e internacionais onde as parcerias se consolidam.

Os projetos aqui apresentados são parte da proposta institucional descrita acima e intitulada como **“Inovação, Desenvolvimento e Sustentabilidade: Estreitamento entre Universidade e Setor Produtivo no Estado de Goiás”** e estarão contemplando um dos objetivos desta proposta **“Promover e ampliar a ciência, a tecnologia e a inovação no Centro Norte Goiano, através da formação de recursos humanos qualificados e desenvolvimento de novos produtos e processos voltados à saúde da população e meio ambiente”**.

Características da Instituição Proponente

O Centro Universitário de Anápolis - UniEVANGÉLICA é uma instituição privada sem fins econômicos credenciada no ano de 2004 por meio da Portaria Ministerial nº. 628, publicada no D.O.U. nº. 52, de 16 de março de 2004. Sendo uma das mantidas da Associação Educativa Evangélica (AEE) que há setenta anos foi instituída com o objetivo de criar e manter escolas rurais e urbanas, em todos os níveis educacionais, em cidades no interior do Estado de Goiás. A Associação Educativa Evangélica (AEE) tem como missão promover, com excelência, o conhecimento por meio do ensino nos diferentes níveis da pesquisa e da extensão, buscando a formação de cidadãos comprometidos com o desenvolvimento sustentável. A AEE é uma instituição de princípios cristãos, fundada em 31 de março 1947, pelo Reverendo Arthur Wesley Archibald.

A pesquisa em nível de graduação foi institucionalizada no ano de 2001 com o Programa de Iniciação Científica apoiado inicialmente pela Fundação Nacional de Ensino Superior Particular – FUNADESP, participando dos editais do CNPQ à partir do ano de 2009. Atualmente, o maior percentual de cursos de graduação e pós-graduação da UniEVANGÉLICA concentram-se na cidade de Anápolis, município localizado a 53 quilômetros da capital do Estado de Goiás, Goiânia, com um Índice de Desenvolvimento Humano de 0,735 (BRASIL, 2013), considerado alto pela Organização das Nações Unidas.

Entende-se que o número de Programas de Pós Graduação *Stricto-Sensu* seja insuficiente para atingir as metas de desenvolvimento do Brasil. De modo que, visando a melhoria da qualidade de vida da população e a redução das elevadas taxas de importação de doutores e mestres de centros educacionais mais avançados em nosso país, **a implantação de polos de excelência em pesquisa na região Centro Norte irá gerar benefícios sociais tangíveis e ainda auxiliar na ampliação da oferta de programas de pós-graduação Stricto Sensu por instituições públicas e privadas, promovendo o desenvolvimento sustentável do Estado de Goiás.**

Além disso, o grande número de instituições e profissionais formados anualmente na região, a localização estratégica da cidade de Anápolis, o custo de vida acessível comparado às capitais Goiânia e Brasília, a tradição em educação superior e uma infraestrutura

apropriada e robusta, tornam-se forte atrativo para diferentes investimentos no Estado de Goiás e nos estados vizinhos que são atendidos pelo nosso Estado.

Atualmente, a UniEVANGÉLICA conta com três Programas de Pós Graduação Stricto Sensu sendo um em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente (Mestrado e Doutorado), Odontologia (Mestrado) e Ciências Farmacêuticas (Mestrado Profissional) e uma proposta em avaliação na CAPES/MEC em Movimento Humano e Reabilitação (Mestrado e Doutorado).

Diante disso, e buscando o equilíbrio da massa crítica produtora de conhecimento nas diferentes regiões do País A UniEVANGÉLICA apresenta esta proposta de fomento à pesquisa gerando o desenvolvimento sustentável de nosso Estado. Esta proposta envolve quatro projetos de pesquisa que contemplam a área proposta pela chamada da FAPEG **“Inovação, Desenvolvimento e Sustentabilidade: Extreitamento entre Universidade e Setor Produtivo no Estado de Góias”**. Os projetos de pesquisa aqui apresentados, serão desenvolvidos no Centro de Excelência em Pesquisa e Inovação – CEPInova do Centro Universitário de Anápolis - UniEVANGÉLICA, que oferece ao projeto a infraestrutura necessária. A seguir estaremos descrevendo os referidos projetos.

**SÍNTESE ORÇAMENTÁRIA DO PROJETO INOVAÇÃO,
DESENVOLVIMENTO E SUSTENTABILIDADE: ESTREITAMENTO ENTRE
UNIVERSIDADE E SETOR PRODUTIVO NO ESTADO DE GOIÁS.**

Recursos da FAPEG

RUBRICA	2019 R\$	2020 R\$	2021 R\$	2022 R\$
BOLSAS	4.000,00	258.350,00	276.000,00	222.800,00
CAPITAL	296.000,00	566.547,00	248.892,00	302.168,65
REPASSE ANUAL	300.000,00	824.897,00	524.892,00	524.968,65
VALOR TOTAL				2.174.757,65

DETALHAMENTO POR PROJETO

FAPEG

UNIDADES	CAPITAL R\$	BOLSA R\$	TOTAL R\$
Projeto 1 – Estimulação Transcraniana	193.270,00	90.200,00	283.470,00
Projeto 2 – Ciências Farmacêuticas	726.167,15	184.950,00	911.117,15
Projeto 3 – Fotovoltáica	157.484,50	388.800,00	546.284,50
Projeto 4 – LapeBIO	336.686,00	97.200,00	433.886,00
TOTAL	1.413.607,65	761.150	2.174.757,65
%TOTAL	65	35	100

DETALHAMENTO POR PROJETO COM ORÇAMENTO DE ITENS

PROJETO 1 - LABORATÓRIO DE ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA

CAPITAL - FAPEG

Item	Descrição	Quantidade	Valor
01	DC-Stimulador, NeuroConn	01	R\$36.270,00
02	Eletroencefalograma antNEURO eego Sport 32 TM canais	01	R\$112.000,00
03	Cabo de transmissão t'EEG	01	R\$45.000,00
		SubTotal (2020)	R\$193.270,00
		Total (04 anos)	R\$193.270,00

BOLSA - FAPEG

Item	Descrição	Quantidade	Valor
01	Bolsa Pós Doutorado (10 meses)	01	R\$41.000,00
		SubTotal (2020)	R\$41.000,00
02	Bolsa Pós Doutorado (12 meses)	01	R\$49.200,00
03		SubTotal (2021)	R\$49.200,00
		Total (04 anos)	R\$90.200,00

**PROJETO 2 - LABORATÓRIO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAPITAL - FAPEG**

Itens	Quantidade	Valor (R\$)
1 pHmetro	2	3.306,00
2 Espectrofotômetro Uv Visível	1	2.395,00
3 Estufa de esterilização e secagem	2	8.600,00
4 Capela exaustão de gases	1	4.617,00
5 Destiladores de água	1	2.075,00
6 Dessecador a vácuo	2	2.088,00
7 Bomba de vácuo	2	4.872,00
8 Centrífuga de bancada refrigerada	1	46.230,00
9 Caixa de cirurgia completa c/32 itens	2	5.000,00
10 Computadores Samsung	2	6.000,00
11 Leitor de Elisa EPOCH2NS	1	60.000,00
12 Pipeta multicanal	2	4.000,00
13 Banho de órgão (amplificador de 4 canais para banho, sistema de aquisição de dados dataq, transdutores de força 20 gramas 0,003g resolução = 4 peças	1	36.800,00
14 Incubadora Shaker Refri 220V - NT 735	1	13.929,00
15 Pipetas	3	1.200,00
16 Placa de 96 poços	20	160,00
17 Cilindro de gás carbogênico 10 litros	1	200,00
18 Plestímetro	1	9.750,00
19 Placa quente	1	5.590,00
20 Tail-flick	1	8.500,00
21 Banho Maria	1	2.740,00
22 Balança analítica	1	5.300,00
23 Agitador magnético com aquecimento	1	1.695,00
24 Agitador de tubo Vortex	1	1.190,00
25 Mini mesa oscilante	1	6.800,00
26 Osmose reversa	1	3.634,00
27 Vidraria		18.839,00
28 Fluxo laminar	1	23.000,00
29 Lavador de pipetas	1	1.638,00
30 Estojo esterilizador de pipeta 60x250 mm	1	1.762,00
31 Container MVE XC 20 litros Signature para Nitrogênio - ABS 20	1	3.490,00
32 Analisador de qualidade do ar	1	600,00
	Sub-total (2019)	296.000,00
33 HPLC	1	149.249,00
34 PCR Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	1	110.751,00
35 Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier	1	56.000,00
	Sub-total (2020)	316.000,00

UniEVANGÉLICA Sub-total (2020) **316.000,00**
CENTRO UNIVERSITÁRIO
Associação Educativa Evangélica



36	Microscopio Optico Binocular compolarizador e objetivas planas acromáticas acoplado com câmara digital	1	11.500,00
37	Balança Digital de alta precisão	1	7.300,00
38	Câmara climática de controle de temperatura e umidade	1	17.300,00
39	Refrigerador eletrolux	1	1.140,00
	Sub-total (2021)		37.240,00
40	Labirinto em cruz elevado	1	5.000,00
41	Campo aberto	1	3.500,00
42	Rota rod	1	3.000,00
43	Recipiente de natação forçada	1	2.000,00
44	Câmara de condicionamento operante	1	45.000,00
45	Sotwares e sensores de monitoramento por preferência de lugar	1	7.500,00
46	Instrumento estereostático	1	3.000,00
47	Computadores Samsung i9	2	7.927,15
	Sub-total (2022)		76.927,15
	Total (04 anos)		726.167,15

BOLSA - FAPEG

Item	Descrição	Quantidade	Valor
01	Bolsa Mestrado (10 meses)	03	R\$40.500,00
02	Bolsa Mestrado (11 meses)	01	R\$14.850,00
	SubTotal (2020)		R\$55.350,00
03	Bolsa Mestrado (12 meses)	04	R\$64.800,00
	SubTotal (2021)		R\$64.800,00
04	Bolsa Mestrado (12 meses)	04	R\$64.800,00
	SubTotal (2022)		R\$64.800,00
	Total (04 anos)		R\$184.950,00

PROJETO 3 - LABORATÓRIO FOTOVOLTAICO

CAPITAL - FAPEG

Item	Descrição	Quantidade	Valor
01	<i>Kits de 7,2kWp (incl. Cabos e quadros)</i>	1	27.964,00
		Sub-total (2020)	27.964,00
02	<i>Kits de 7,2kWp (incl. Cabos e quadros)</i>	1	27.964,00
		Sub-total (2021)	27.964,00
03	Estação meteorológica portátil para análise climatológica	2	25.000,00
04	Notebook AVELL A65-9MUV RTX - i91Tb	2	29.385,50
05	Software Arc Gis Georeferencimaneto	1	9.607,50
06	<i>Kits de 7,2kWp (incl. Cabos e quadros)</i>	1	27.964,00
07	Biodigestor residencial	4	9.600,00
		Sub-total (2022)	101.556,50
Total (04 anos)			157.484,50

BOLSA - FAPEG

Item	Descrição	Quantidade	Valor
01	Bolsa Doutorado (2 meses)	01	R\$4.000,00
		SubTotal (2019)	R\$4.000,00
02	Bolsa Mestrado (12 meses)	02	R\$32.400,00
03	Bolsa Doutorado (12 meses)	02	R\$48.000,00
04	Bolsa Pós-Doutorado (12meses)	01	R\$49.200,00
		SubTotal (2020)	R\$129.600,00
05	Bolsa Mestrado (12 meses)	02	R\$32.400,00
06	Bolsa Doutorado (12 meses)	02	R\$48.000,00
07	Bolsa Pós-Doutorado (12meses)	01	R\$49.200,00
		SubTotal (2021)	R\$129.600,00



ASSOCIAÇÃO EDUCATIVA EVANGÉLICA

UniEVANGÉLICA

08	Bolsa Mestrado (12 meses)	02	R\$32.400,00
09	Bolsa Doutorado (11 meses)	02	R\$44.000,00
10	Bolsa Pós-Doutorado (12meses)	01	R\$49.200,00
		SubTotal (2022)	R\$127.600,00
		Total anos)	(4 R\$ 388.800,00

UniEVANGÉLICA
CENTRO UNIVERSITÁRIO
Associação Educativa Evangélica

Avenida Universitária, km. 3,5. Cidade Universitária – Anápolis-GO – CEP 75083-515 – Fone: (62) 3310-6600 – FAX (62) 3318-6388
“...grandes coisas fez o Senhor por nós; por isso estamos alegres.” (Sl 126:3)

PROJETO 4 - LapeBIO

CAPITAL - FAPEG

Item	Descrição	Quantidade	Valor
01	Rotaevaporador rotatório (Modelo RV 3 V Ika)	1	21.383,00
02	Bomba à vácuo N810.3 FT.18	1	7.930,00
		SubTotal (2020)	R\$29.313,00
03	Cromatógrafo gasoso, p/ espectrometria de massas (GC Agilent mod. 5977B (MS) acoplado a GC modelo 8860.	1	183.688,00
		SubTotal (2021)	183.688,00
04	Microtomo criostato YD 1900 ANC	1	83.727,00
05	Incubadora de bancada com agitação orbital - Marca Tecnal, Mod. TE-420	1	11.756,00
06	Bomba de vácuo	1	2.436,00
07	Freezer -80 graus Celsius	1	25.766,00
		SubTotal (2022)	123.685,00
		Total (04 anos)	336.686,00 R\$336.686,00

BOLSA - FAPEG

Item	Descrição	Quantidade	Valor
01	Bolsa Mestrado (12 meses)	02	R\$32.400,00
		SubTotal (2020)	R\$32.400,00
02	Bolsa Mestrado (12 meses)	02	R\$32.400,00
03	Bolsa Mestrado (12 meses)	02	R\$32.400,00
		SubTotal (2021)	R\$32.400,00
		SubTotal (2022)	R\$32.400,00
		Total (04 anos)	R\$97.200,00

Projeto 1

ANÁLISE DA ATIVIDADE CEREBRAL E DO MOVIMENTO DE MEMBROS SUPERIORES EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN SUBMETIDOS À ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA ASSOCIADA À REALIDADE VIRTUAL.

Profa. Dra. Claudia Santos Oliveira
PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Anápolis – GO, 2019

PROJETO 1

Análise da atividade cerebral e do movimento de membros superiores em indivíduos com síndrome de Down submetidos à estimulação transcraniana por corrente contínua associada à realidade virtual.

RESUMO

Objetivo: Realizar uma análise comparativa da atividade cerebral, atividade muscular e análise cinemática durante uma tarefa motora de alcance manual com realidade virtual por meio de um jogo *touch screen* que proporciona uma tarefa cognitiva de memória associada a estimulação transcraniana por corrente contínua em indivíduos com Síndrome de Down (SD). Este estudo tem como propósito analisar se a estimulação pode otimizar os efeitos da tarefa motora manual nas habilidades psicomotoras, musculares e no processo cognitivo. Materiais e método: A amostra populacional será definida após a realização de um estudo piloto com a mesma metodologia do estudo proposto. Serão envolvidos indivíduos com SD avaliadas pela Escala Wechsler Abreviada de Inteligência para padronizar a inclusão da amostra com idade cognitiva de 7 a 12 anos. Os sujeitos serão alocados randomicamente em dois grupos (Grupo 1: tDCS anódica no córtex em região F3 a uma tarefa motora manual com realidade virtual motivacional. Grupo 2: tDCS anódica sham no córtex em região F3 associada a uma tarefa motora manual realidade virtual. As avaliações serão em três momentos distintos (antes, imediatamente após uma sessão, após 10 sessões e um mês após o treinamento propostos) e serão constituídas pela análise dos sinais eletroencefalográfico com e sem utilização da interface de sinal tEEG, simultaneamente à uma análise da eletromiografia em bíceps e tríceps braquial e uma análise tridimensional do movimento de alcance manual. Os treinos serão realizados em um total de 10 sessões, com 3 sessões de treino por semanas (20 minutos), com uma intensidade de 1 mA. Os resultados serão analisados estatisticamente assumindo um nível de significância de $p \leq 0,05$.

Palavras chave: Síndrome de Down, Atividade Cerebral, Realidade virtual, Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua.

Introdução

O referido projeto, de caráter inovador, surgiu de discussões anteriores, durante o desenvolvimento de um projeto de doutorado orientado pela pesquisadora responsável e co-orientado pelo professor e pesquisador Felipe Fregni, do Laboratório de Neuromodulação do *Spaulding Rehabilitation da Harvard Medical School, Harvard University, Boston (MA), USA*, intitulado “Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua associada ao treino de marcha e de mobilidade sobre a funcionalidade de crianças com paralisia cerebral: ensaio clínico controlado aleatorizado, duplo cego”.

A literatura mostra que no processo de reabilitação, as técnicas de neuromodulação têm como objetivo promover um aumento da eficácia sináptica local, alterando o padrão de plasticidade mal adaptativa que surge após uma lesão cortical. Um grande benefício da utilização da técnica de tDCS é a possibilidade do uso associado com terapias físicas. Além disso, a maioria dos estudos envolvendo o uso da tDCS no córtex motor primário de indivíduos com sequelas de acidente vascular encefálico demonstraram melhora na função de membros superiores (movimentação ativa de punho e dedos e movimento de pinça), na velocidade do movimento, na movimentação ativa de tornozelo e na função motora. No entanto, não encontramos estudos que analisaram os efeitos da estimulação transcraniana em crianças com Síndrome de Down, da mesma forma que ainda não temos estudos publicados que utilizem como método de avaliação o registro de atividade cerebral e alteração desta por meio do registro eletroencefalógrafo.

Deste modo, no sentido de inserir elementos sobre o tema na literatura, o estudo tem como certificar os efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua (tDCS) associado a um treino neuromotor em membro superior com realidade virtual sobre a controle motor em crianças com Síndrome de Down (SD).

Com o objetivo em explorar as variáveis do efeito desta técnica na população desenvolvemos um estudo para analisar Atividade cerebral, atividade muscular e cinemática dos membros superiores de crianças com SD submetidas à estimulação transcraniana por corrente contínua associada à realidade virtual. Para este projeto contamos com a colaboração de pesquisadores internacionais tais como professoras Manuela Galli e Veronica Cimolin, do Laboratório *di Analisi della Postura e del Movimento “Luigi Divieti” do Istituto Politecnico di Milano – Milão – Itália*, e Prof. Dr. Bernard Arthur Conway, do *Department of Biomedical Engineering, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland*.

Este projeto será desenvolvido no Laboratório de Análise do Movimento, sediado no CEPInova do Centro Universitário de Anápolis- UniEVANGÉLICA. Este laboratório, considerado de excelência internacional, possui um sistema completo de análise de movimento, o SMART-D® - BTS Engineering, composto por um computador/estação de trabalho SMART-D INTEGRATED WORKSTATION®11 com 32 canais analógicos, duas plataformas de força Kistler Plataforma model 9286BA e um eletromiógrafo FREEEMG® – BTS Engineering com oito canais contendo amplificador de sinais bioelétricos, transmissão de dados sem fio (sistema wireless) e eletrodos bipolares com um ganho total de 2000 e frequência de 20-450 Hz. Este eletromiógrafo pode ser sincronizado com eletroencefalograma (EEG) eego™mylab, que está sendo solicitado neste projeto juntamente com aparelho de tDCS (DC-Stimulator euroConn, Germany) e um cabo de transmissão tEEG.

1. Contextualização

A Síndrome de Dow é uma condição de origem genética caracterizada por uma anormalidade cromossômica que leva seu portador a apresentar características específicas.

Esta síndrome é reconhecida como a principal causa de deficiência mental, sendo considerada uma das mais frequentes anomalias numéricas dos cromossomos autossômicos^{1,2}. Dados epidemiológicos demonstram uma incidência de 1:600 nascidos vivos no Brasil, com sua etiologia caracterizada como uma alteração na divisão cromossômica usual que resulta na triplicação, ao invés da duplicação do material genético referente ao cromossomo 21.

Diversos autores subdividem a etiopatologia em três tipos: trissomia simples, que se trata da não separação do cromossomo 21, com a criança recebendo um cromossomo extra e assim causando a SD; trissomia por translocação, quando um cromossomo de outro par se une ao cromossomo 21 e acontece a quebra na região central; e o mosaicismo, que apresenta como característica a presença de células normais com células trissômicas¹⁻⁴. Nesta população, podemos observar uma variabilidade de déficits no processo de aprendizagem e no desenvolvimento, impactando diretamente no controle motor seletivo, comprometendo as aquisições motoras e a independência funcional do seu portador⁴⁻⁶.

A literatura descreve diversas alterações morfofuncionais que comprometem o sistema motor, como a hipotonia muscular (99%); mãos largas, dedos curtos (70%); hiperextensão articular (80%); e frouxidão ligamentar correlacionada a instabilidades articulares. Classicamente, tal alteração dos músculos esqueléticos nesta população está relacionada ao retardo no desenvolvimento motor e às diástases dos músculos, dificultando assim os movimentos precisos. Mesmo que estas alterações não estejam totalmente esclarecidas na literatura, sabe-se que em estágios iniciais do desenvolvimento infantil as crianças com este diagnóstico desenvolvem um comprometimento estrutural e funcional do encéfalo, com déficits nas substâncias cinzenta e branca, redução da mielinização e alterações pré-sinápticas e sinápticas⁶.

1.1 Desenvolvimento motor

O desenvolvimento motor apresenta algumas mudanças nas ações e padrões dos movimentos que ocorrem no decorrer da vida, podendo estar relacionado com a idade de cada indivíduo⁷. Ferreira et al., (2009), em um estudo do desenvolvimento típico, sugere que essas mudanças podem depender da interação entre os processos perceptuais e motores durante a produção, correção e compreensão do movimento. Desta forma, qualquer alteração neurológica pode levar a um déficit nessa interação e alterar as habilidades funcionais⁸.

Segundo Mancini et al., (2003), a funcionalidade e o desempenho funcional em crianças com SD é diminuída quando comparadas a funcionalidade de crianças que não possuem este diagnóstico, sendo assim observado que a hipotonia está presente em 99% dos casos, contribuindo para que o desenvolvimento inicial seja precário em razão de uma carência dos impulsos descendentes que comandam um conjunto de neurônios motores na medula espinhal⁹.

1.2 Desenvolvimento cognitivo

O sistema nervoso (SN) da criança com SD apresenta anormalidades estruturais e funcionais. Lúria e Tskvetkova (1964), em estudo mais antigo, concluíram que existe uma lesão difusa, que vem acompanhada de um funcionamento elétrico peculiar no desenvolvimento cognitivo da SD, rebaixando as habilidades de análise e síntese e impactando no comprometimento da fala. Estes mesmos autores ressaltam que as dificuldades em selecionar e direcionar um estímulo pode estar associada a uma fadiga das conexões¹⁰. As anomalias resultam em disfunções neurológicas e variam quanto à manifestação e intensidade.

Todos os neurônios formados são afetados na maneira como se organizam em diversas áreas do sistema nervoso e não só há alterações na estrutura formada pelas redes neuronais, mas também nos processos funcionais da comunicação de um com o outro¹⁰.

Segundo Flórez e Troncoso (1997), a influência que essas alterações podem exercer sobre o desenvolvimento inicial nos circuitos cerebrais afetam a instalação e as consolidações das conexões de redes nervosas necessárias para estabelecer os mecanismos da atenção, memória, capacidade de correlação e análise do pensamento abstrato, além de ser analisado que o cérebro, em seu conjunto, tem um volume menor que o das pessoas que não possuem este diagnóstico^{11,12}.

Quanto à anatomopatologia, a criança com SD nasce frequentemente hipoplásica nos lóbulos frontais e occipitais e com redução no lóbulo temporal em até 50% dos casos (podendo ser unilateral ou bilateral). Em alguns casos observa-se no cérebro uma diminuição do corpo caloso, da comissura anterior e do hipocampo^{11,12}.

Na SD existe uma limitação na transmissão e na comunicação em muitos dos sistemas neuronais e são conhecidas cada vez mais as deficiências das ramificações dendríticas, da precoce redução dos neurônios responsáveis pela conduta associativa e pela comunicação nas áreas cerebrais umas com as outras^{13,14}.

Em relação à atenção, diversas referências constataam que a criança com SD pode ter dificuldades na fixação do olhar devido à lentidão da resposta, necessitando do meio para desenvolver tal capacidade^{13,14}. Quanto à dificuldade de percepção e distinção auditiva, a criança com SD pode não escutar e não atender auditivamente, preferindo uma ação manipulativa segundo seus interesses. Sua atenção auditiva parece melhor nas primeiras fases da vida^{11,12}.

Os problemas de memória auditiva seqüencial de algum modo bloqueiam e dificultam a manutenção da atenção durante o tempo necessário, o que demonstra sua dificuldade para manter uma informação seqüencial. O próprio cansaço orgânico e os problemas de comunicação sináptica cerebral impedem a chegada da informação, interpretado como falta ou perda de atenção¹²⁻¹⁶.

Buckley e Bird (1994)¹⁷ falam das dificuldades relevantes no desenvolvimento cognitivo e linguístico. O atraso no desenvolvimento da linguagem, as dificuldades em reconhecer regras gramaticais e sintáticas da língua e também dificuldades na produção da fala com um desemparelhamento entre a velocidade com que se compreende e o ato de se falar são exemplos dessas dificuldades no desenvolvimento cognitivo e linguístico. Tais dificuldades de linguagem podem comprometer outras habilidades cognitivas. Grela (2003) pesquisa aspectos específicos da linguagem, procurando saber se pessoas com SD podem adquirir estruturas argumentativas¹⁶.

Os estudos demonstram que as estruturas argumentativas adquiridas e usadas por adultos com SD correspondem a pessoas de menor idade. Confirmando as pesquisas anteriores, Cusin et al. (2005) destacam que as características peculiares da SD conjuntamente com traços pessoais e desempenhos individuais implicam numa variedade de desempenhos linguísticos¹⁷. As autoras dizem que no que tange a esta variabilidade, ocorre o atraso do desenvolvimento das funções comunicativas para todas as crianças, comprometendo o desenvolvimento linguístico e ficando claro uma discrepância entre a capacidade receptiva e expressiva¹⁸⁻²¹. Para Flórez e Troncoso (1997), a memória, a longo prazo, de forma não declarativa, na qual se aprendem técnicas e adquirem-se habilidades, não requer a ação do hipocampo, que também apresenta limitações¹³.

Algumas pesquisas demonstram evidências sobre características do desempenho motor e cognitivo de indivíduos com SD^{21,22-25}. No que se refere ao desenvolvimento de habilidades motoras, os estudos demonstram o atraso nas aquisições de marcos motores básicos, indicando que estes emergem em tempo diferenciado ao de indivíduos com desenvolvimento típico^{10,21-22}. O desempenho cognitivo com o atraso ou retardo mental é uma manifestação de um sintoma desta condição genética²¹⁻²³.

As limitações motoras e cognitivas não estão bem descritas na literatura, contudo se observa uma predominância dos déficits motores no período referente à primeira infância e uma predominância dos déficits cognitivos na idade escolar¹⁰. Entretanto, a magnitude das diferenças do desempenho motor e cognitivo desta população, comparadas com uma população que apresenta um desenvolvimento típico, pode não permanecer constante ao longo do desenvolvimento, caracterizando-se, então, como uma hipótese a ser investigada²³.

As alterações apresentadas pelos portadores de SD podem se manifestar funcionalmente, interferindo na capacidade de desempenhar de forma independente as diversas atividades e tarefas rotineiras. Embora a literatura disponibilize evidências sobre as limitações consequentes desta condição genética em termos das funções de órgão e sistemas que compõem a estrutura do organismo, informações sobre o impacto destas limitações internas no desempenho de atividades diárias deste grupo são menos frequentes^{24,25}.

A escassez de evidências sobre o desempenho funcional deste grupo clínico limita os profissionais que lidam com estas crianças a predizer desfechos e expectativas possíveis de serem alcançadas.

1.3. Estimulação cerebral não invasiva

Quando se fala em técnicas de estimulação cerebral não invasiva destaca-se na literatura científica a abordagem da reabilitação física, principalmente em razão dos promissores resultados sobre o aprendizado motor. Trata-se, portanto, de uma ferramenta utilizada na reabilitação neurológica capaz de modular a excitabilidade do sistema nervoso central (SNC) e do neurônio²⁵⁻²⁶. Dois tipos principais de estimulação cerebral não invasiva são atualmente utilizados em seres humanos para clínica e aplicações de pesquisa: estimulação magnética transcraniana (TMS) e estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC)²⁷.

A ETCC, uma técnica com custo relativamente baixo, de fácil aplicação e com um mínimo de efeitos adversos, tem sido conhecida por induzir alterações duradouras da excitabilidade cortical motora²⁸. Esta técnica envolve a administração de uma corrente elétrica monofásica de baixa intensidade sobre o couro cabeludo e utiliza eletrodos de superfície do tipo silicone-esponja umedecidos em soro fisiológico. Os efeitos desta estimulação são obtidos pela movimentação dos elétrons devido às cargas elétricas existentes entre eles. Os polos dos eletrodos desta corrente são o ânodo e o cátodo, sendo o ânodo de polo positivo e o cátodo, polo negativo. O sentido da corrente elétrica, ou seja, o sentido dos elétrons flui do polo negativo para o polo positivo. Este fluxo gera diferentes efeitos em tecidos biológicos e durante a aplicação da ETCC a corrente elétrica flui dos eletrodos, penetra no crânio e atinge assim o córtex.

A modulação cortical é dependente da polaridade da corrente aplicada sendo que esta estimulação permite dois tipos de estimulação: a corrente anódica que aumenta a excitabilidade cortical, favorecendo a despolarização da membrana neuronal, ou a corrente catódica, através da qual o estímulo surte efeito inibitório por hiperpolarização da membrana neuronal²⁸⁻³⁰.

São muitos os efeitos neurofisiológicos da ETCC descritos atualmente. Os principais efeitos do mecanismo de ação estão baseados na inibição ou ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) de voltagem dependente^{31,32}.

Alterações podem assemelhar-se à potenciação de longa duração (LTP), carretando tanto um aumento da eficácia sináptica como uma depressão de longa duração (LTD)³²⁻³⁴. Outros mecanismos aceitos abrangem a regulação de uma variedade de neurotransmissores como a dopamina, acetilcolina e serotonina, além de diversos canais da membrana neuronal tais como os de sódio e de cálcio. Estes efeitos sugerem que exista uma alteração plástica após a utilização da estimulação³²⁻³⁶.

Considerando os efeitos específicos, a estimulação anódica aumenta a taxa de disparos, impulsionando a despolarização da membrana pós-sináptica e levando a um aumento dos níveis intracelulares de cálcio. Para a estimulação catódica, os efeitos podem basear-se em uma hiperpolarização do potencial de membrana, o que leva à depressão da força sináptica³⁶. Tal técnica apresenta algumas vantagens sobre outras de estimulação transcraniana, pois fornece efeito modulatório da função cortical com maior duração, sendo de fácil aplicação e com menor custo. Os resultados de pesquisas clínicas demonstram seu grande potencial no tratamento de acometimentos neurológicos e na investigação de processos de modulação da excitabilidade cortical. Além disso, este tipo de intervenção promove uma condição melhor de estimulação no placebo, dando especificidade maior aos resultados de uma pesquisa³⁴.

No processo de reabilitação, as técnicas de neuromodulação tem como objetivo promover um aumento da eficácia sináptica local, alterando o padrão de plasticidade mal adaptativa que surge após uma lesão cortical³¹⁻³⁶.

A ETCC promove uma alteração de excitabilidade de maneira sutil, considerada mais fisiológica, pois altera o potencial de membrana da célula, facilitando ou dificultando a despolarização, sem de fato gerá-la³⁷⁻³⁹. Por isso, um grande benefício da utilização da técnica é a possibilidade do uso associado com terapias físicas.

Essa estimulação aparece como uma forma de modular a atividade cortical, abrindo uma passagem para o aumento e o prolongamento do ganho motores. Ela é utilizada com a finalidade de otimizar o resultado funcional devido a potencialização das mudanças neuroplásticas³⁸⁻⁴⁰. A estimulação promove alteração de um padrão de excitabilidade disfuncional para que a terapia física modele com a ativação de redes neurais específicas à tarefa, o padrão funcional de atividade cortical³⁸.

1.3.1 Estimulação cerebral não invasiva em pediatria

Quando se fala em estimulação cerebral não invasiva em pediatria, os achados encontrados na literatura sobre o uso desta técnica referem num primeiro momento ao uso da TMS como método para analisar o potencial evocado⁴¹⁻⁴² e como recurso para redução da espasticidade de crianças com PC. Estudo recente utilizou a TMS para investigar os mapas corticais motores de crianças com hemiparesia ou diparesia decorrentes da PC. Os autores relatam alterações significativas nos mapas motores corticais das crianças estudadas (lateralização do membro superior e representação motora do membro inferior), demonstrando que ocorre uma reorganização após acometimentos em um ou ambos os hemisférios cerebrais⁴³⁻⁴⁴.

Pesquisas atuais⁴⁵⁻⁵⁰ que analisam os efeitos da ETCC em crianças com PC (pois não encontramos achados na literatura que utilize essa técnica na população de SD) têm se mostrado promissoras quanto ao potencial de reabilitação, principalmente quando esta é utilizada combinada à terapêutica motora.

Observa-se um consenso nestes estudos quanto ao uso da ETCC com estimulação anódica, com tempo de intervenção de 20 minutos de estimulação e uma amperagem de 1mA.

A ETCC, segundo Chandramouli *et al.* (2015), é uma modalidade segura para crianças e adolescentes com diferentes doenças neurológicas, especialmente quando as diretrizes de segurança são seguidas⁵¹. Minhas *et al* (2012) relatam, em seu estudo de modelagem, que existem diferenças em vários parâmetros-chave (como espessura do crânio e volume de líquido cefalorraquidiano) entre crianças e adultos e que estas diferenças afetam o fluxo de corrente através do cérebro. Os resultados deste estudo sugerem precaução na aplicação de intensidades de estimulação acima 1,5mA em populações pediátricas⁵².

Embora a SD seja uma das doenças mais prevalentes na população pediátrica, não foram encontrados estudos sobre os efeitos do ETCC em crianças com essa síndrome. Assim, a falta de investigações sobre ETCC anodal sobre o córtex motor primário durante o treinamento motor para crianças com SD constitui uma lacuna na literatura científica.

Considerando a alta prevalência de SD, as limitações motoras decorrentes desta doença, exercendo desta forma um impacto negativo na funcionalidade e independência e no fato da ETCC não estar contraindicado na maioria dos casos, é relevante a investigação dos efeitos desta técnica de estimulação cerebral não invasiva em crianças com SD.

Deste modo, no sentido de inserir na literatura novos elementos sobre o tema com a população de SD, este estudo tem como objetivo realizar uma análise e comparar o efeito de ETCC anódica múltipla monopolar ativa e *sham* sobre o córtex motor primário durante o treinamento motor de membros superiores.

Este treinamento motor envolverá realidade virtual (RV) no controle motor quanto as variáveis espaciotemporais e cinemática de uma tarefa de alcance, atividade de flexores e extensores do cotovelo, atividade cerebral e independência funcional em crianças com SD. O estudo proposto será utilizado como base para o desenvolvimento de novos projetos ampliando o conhecimento sobre esta técnica, possibilitando uma nova opção de intervenção para a otimização do treinamento motor em indivíduos com SD.

1.3.2 Realidade virtual

A era digital vem conquistando um importante papel do setor de entretenimento digital, sendo um dos principais segmentos que alavancam e financiam novas tecnologias na computação⁵². Os jogos digitais são considerados, atualmente como um tipo de mídia, permitindo a interatividade e imersão do usuário de forma mais significativa que as mídias tradicionais. Além disso, os jogos são capazes de criar realidades alternativas, estimulando a prática de atividades físicas que, fora do contexto, podem ser consideradas entediantes e cansativas⁵²⁻⁵⁶.

Existem atualmente diferentes métodos com a finalidade de promover repetição do movimento por meio de treinos funcionais e motores, sendo os resultados mais promissores encontrados por meio de realidade virtual. Durante o treinamento motor dos membros superiores, suas abordagens são eficazes e proporcionam uma melhora das informações sensório-motora e adaptativas e auxiliando funcionalmente nas maiores dificuldades diárias⁵²⁻⁵³.

Acredita-se que as otimizações dos resultados obtidos pelo uso da RV estão relacionadas a um treinamento realizado em ambiente interativo, proporcionando uma gama muito ampla de atividades e cenários, com múltiplos canais sensoriais e a criação de exercícios nas quais a intensidade desta prática seja promissora nas necessidades da referida população⁵³⁻⁵⁴.

O treino de RV pode ser feito como instrumento auxiliar, adicionando um objeto motivacional e lúdico e facilitando o desenvolvimento das habilidades perceptuais e motoras, favorecendo assim a participação ativa do indivíduo, o treinamento de habilidades de planejamento e controle motor e o desenvolvimento de estratégias para vencer seus desafios motores através do estímulo da plasticidade do SNC. A utilização da terapêutica com RV no tratamento das disfunções de movimento em indivíduos com SD vem sendo estudada pela comunidade acadêmica, no entanto, ainda se nota uma escassez de material científico acerca da temática⁵⁵⁻⁵⁶.

1.4 Eletroencefalograma

O uso do eletroencefalograma (EEG) propicia uma avaliação completa da adaptação motora por meio do estudo simultâneo das evidências biomecânicas e eletroencefalográficas, sendo capaz de esclarecer como a atividade motora e cerebral de indivíduos com algum diagnóstico neurológico se difere dos padrões normais de movimento durante a fase de preparação, execução e pós-execução de uma determinada tarefa⁵⁷.

Observa-se na literatura, entretanto, um número restrito de trabalhos correlacionando a cinemática com a ativação cerebral. A maioria dos estudos envolvendo eletroencefalografia estão associados ao diagnóstico de casos envolvendo epilepsia e convulsões⁵⁷⁻⁶¹. Dentre os poucos estudos que correlacionam esta possibilidade de avaliação destaca-se o desenvolvido por Mima et. al. (2001), que analisou o sinal EEG e EMG de pacientes que sofreram AVE, de forma simultânea, durante a execução de uma atividade motora específica. Na população pediátrica, ainda não encontramos estudos clínicos que tenham utilizado esta nova proposta de avaliação⁶². Desde 1929, o sinal eletroencefalográfico tem sido usado para estudar os estados funcionais do cérebro. A atividade neural do cérebro humano inicia-se entre a décima sétima e a vigésima terceira semana de desenvolvimento do feto.

Clinicamente o sinal EEG é utilizado para o estudo dos processos eletroquímicos e eletro físicos e através dos quais obter informações quando a organização funcional do encefalo⁶⁶. Entretanto, o sinal eletroencefalográfico consiste em possíveis flutuações espontâneas que podem aparecer como forma de resposta a um estímulo.

Este sinal assemelha-se a um sinal estocástico constituído por ritmos quase sinusoidais. A sincronia dos ritmos cerebrais pode ocorrer a partir de centros de “marcapasso” em mais profundas camadas corticais, como o tálamo ou em regiões subcorticais, agindo através de ligações sinápticas difusas, circuitos formados por caminhos axonais com ramificações extensas, ou acoplamento de elementos neuronais⁶³⁻⁶⁵.

Portanto, o registro da atividade eletroencefalográfica se caracteriza pela variação propagada de potenciais pós-sinápticos, principalmente das células piramidais, em uma determinada região do córtex, somados espacialmente e temporalmente, e capturados numa área definida do couro cabeludo por meio de um eletroencefalograma⁶⁶.

Os sinais do EEG apresentam potenciais elétricos com amplitudes menores que 300 μ V e o espectro do sinal tradicionalmente inclui bandas de frequência de 0,5 a 100Hz⁶⁷. Esses sinais podem ser classificados em ondas de acordo com determinada faixa de frequência.

As principais ondas são: Alfa, Beta, Teta e Delta. As ondas alfa apresentam frequências entre 8 e 13 Hz. Acredita-se que essas ondas são manifestações da metade posterior do córtex e normalmente encontradas em regiões occipitais e parietais. As ondas Alfa são melhor observadas em condições de vigília e durante o relaxamento físico e mental. As ondas Beta apresentam frequências entre 14 e 22 Hz e estão presentes em quase todos os adultos saudáveis, principalmente sobre as regiões frontal e central do córtex. Essas ondas apresentam menores amplitudes. Esse tipo de onda é muito comum durante uma intensa atividade mental ou situações de estresse.

As ondas Teta apresentam frequências entre 4 e 7,5 Hz. Acredita-se que essas ondas têm sua origem no tálamo e que desempenham papéis importantes na infância. O EEG normal de um adulto ao acordar contém apenas uma pequena quantidade de 21 ondas com essas frequências, a maior parte delas é observada no estado de sonolência e vigília. E as ondas Delta apresentam frequências entre 0,1 e 3,5 Hz e são comuns em sinais EEG de neonatais, de crianças e durante os estágios de sono em adultos. Quando uma atividade lenta, como a da banda delta, aparece em indivíduos adultos acordados, pode ser um indicio de lesão encefálica. A prevalência de uma determinada onda sobre a outra depende da região do escalpo em que está sendo analisada, bem como o comportamento do indivíduo, como atenção, sono ou vigília⁶⁶.

Dessa forma, o EEG é capaz de detectar estímulos induzidos em um indivíduo por fatores internos ou externos como planejamento motor e memória, sendo assim aumentando a compreensão acerca do funcionamento das áreas cerebrais frente a tarefas distintas, sejam elas cognitivas ou motoras. Possibilitando assim uma observação mais objetiva de processos corticais, auxiliando o seu entendimento isolado e suas relações mútua⁶⁸.

No entanto, observa-se na literatura um número restrito de trabalhos correlacionando ativação cerebral avaliada após uma intervenção sensorial⁶⁹⁻⁷². Dentre os poucos estudos que correlacionam esta possibilidade de avaliação, destacam-se o estudo desenvolvido por Moraes et al. 2012 que avaliou o EEG sugeriu que exercício promove alterações na atividade cerebral e nesse estudo os dados foram expressos pelos padrões EEG observados no presente estudo sendo mudanças eletrofisiológicas representadas o rearranjo de diferentes sistemas como consequência do exercício e os mecanismos cognitivos e emocionais podem contribuir para a expressão da atividade eletrocortical específica frequentemente observada após o exercício.

Estes resultados corroboram a hipótese de que o exercício causa alterações específicas na atividade cortical do cérebro, resultando em aumento da ativação⁷³. No entanto, quanto se trata em avaliar uma população com déficit comportamento e durante uma atividade motora simultaneamente o EEG convencional dos eletrodos de disco não possui alta resolução espacial, principalmente devido ao desfoque da condução de volume da cabeça. A literatura mostra que os eletrodos de EEG precisariam ter 10 a 20 mm de distância para capturar toda a informação do cérebro⁷⁴⁻⁷⁵.

Sendo assim, em um estudo que foram colocados eletrodos de disco convencionais e eletrodos de anel concêntrico tripolar (TCREs), ambos com 10 mm de diâmetro, lado a lado durante experimentos potenciais relacionados ao movimento e descobriram que havia muita informação mútua no eletrodo de disco convencional. Alta informação mútua significa que os sinais são altamente duplicativos.

Por outro lado, houve muito menor informação mútua quando os TCREs foram utilizados, apenas cerca de 8% da informação mútua encontrada no eletrodo de disco convencional EEG. Este experimento demonstrou que simplesmente aumentar a densidade dos eletrodos de disco convencionais não se traduz em melhor resolução espacial. Os TCREs podem ser espaçados a menos de 10 mm, graças ao seu conteúdo de informações mútuas extremamente baixas. O espaçamento mínimo para os eletrodos de disco convencionais é muito maior do que 10 mm devido à sua alta informação mútua. Para o tEEG, a densidade de corrente dos sinais, não é tão distorcido pela condução de volume e possui maior resolução espacial⁷⁶. Desta forma, acreditamos que propor um protocolo de avaliação da atividade cortical por meio do sistema tEEG do eletroencefalograma durante uma tarefa somatossensorial com crianças com SD comparadas com crianças de desenvolvimento típico apresente grandes vantagens na aquisição de dados da atividade cerebral em crianças com SD⁷⁷.

1.5 Eletromiografia

Uma das possíveis alterações na SD deve-se ao menor volume total do cerebelo (hipoplasia), responsável pela hipotonia muscular e a associação deteriorada entre músculos sinérgicos. Assim, essas alterações motoras e perceptivas afetam o controle postural.

Os déficits de controle postural podem ser explicados por alterações biomecânicas, como diferença na densidade óssea, hipoplasia da cartilagem e alterações nas propriedades dos ligamentos⁷⁸. Essas alterações podem influenciar a capacidade de gerar torque articular e força em contrações isocinéticas. O déficit de força muscular também pode influenciar a habilidade de realizar tarefas diárias, como a manutenção do equilíbrio, marcha e postura⁷⁹.

As alterações posturais na SD também ocorrem pela dificuldade de percepção das respostas posturais, o que prejudica a sensação do movimento de maneira correta. Sendo assim, a estimulação por meio de atividades em crianças com SD, com técnicas fisioterápicas, contribui para melhorar o quadro motor, a qualidade de vida e facilitar a realização de atividades de contexto social e afetivo⁷⁸⁻⁸⁰.

Portanto, uma análise eletromiográfica sendo utilizada na avaliação desta população proporciona uma avaliação objetiva e precisa, determinando as características elétricas de um músculo ou de um grupo muscular. Atualmente, a análise por meio de EMG pode ser usada tanto em aplicações clínicas quanto em pesquisas na realização de avaliação neuromuscular não invasiva⁷⁹⁻⁸⁰.

Os indivíduos com SD geram movimentos lentos e desarmônicos e alguns estudos apresentam uma estratégia com geração e modulação da atividade EMG e de torque muscular, nas quais tais deficiências podem ser mostradas e corrigidas por meio de treinos funcionais e motores⁸⁰.

Desta forma, quando analisado o acoplamento realizado em indivíduos com SD, podemos constatar grandes dificuldades em coordenar variáveis durante movimentos do braço com retorno, ficando demonstrado que os torques musculares (do ombro e do cotovelo) são revertidos em suas direções de forma menos sincronizada quando comparados com indivíduos de DT⁸⁰.

Diante desse contexto, esse projeto tem como objetivo realizar uma análise comparativa dos efeitos de um treino manual com RV por meio de um jogo em monitor *touch* motivacional que estimula o poder cognitivo de memória, processamento de informação e agilidade na execução motora, com e sem a associação da estimulação transcraniana por corrente contínua de crianças com SD sobre a atividade cerebral, com propósito de analisar se a estimulação pode otimizar os efeitos do treino de realidade virtual nas habilidades psicomotoras e musculares, processo intelectual.

2. Justificativa

A SD resulta em alterações neurológicas importantes que comprometem o sistema de aprendizado cognitivo e motor seletivo, prejudicando as aquisições de planejamento, estratégias e execução de movimento. A literatura descreve diversas alterações encefálicas em indivíduos com SD.

Embora essas alterações não estejam totalmente esclarecidas na literatura, sabe-se que em estágios iniciais do desenvolvimento infantil as crianças com este diagnóstico desenvolvem um comprometimento estrutural e funcional do encéfalo, com déficits nas substâncias cinzenta e branca, redução da mielinização e alterações pré-sinápticas e sinápticas.

Consequentemente, ocorre uma diminuição da atividade cerebral, acarretando em diversas alterações intelectuais e motoras^{81,82}.

O presente projeto visa associar o treino motor por meio do uso de realidade virtual que proporciona uma tarefa cognitiva de memória, processamento de informação e agilidade de execução motora e a ETCC anódica e córtex motor, com intuito de otimizar as habilidades psicomotoras, o processo intelectual durante uma tarefa manual.

A integridade do controle motor dos membros superiores permite que o indivíduo desempenhe suas atividades diárias, funcionais e escolares de forma independente. O uso de realidade virtual como recurso terapêutico mostra-se promissor, com resultados satisfatórios divulgados na literatura científica, incluindo populações de indivíduos com SD.

Da mesma forma, as técnicas de estimulação cerebral não invasiva, especificamente a ETCC anódica, apresenta-se atualmente como um método eficaz para facilitar a excitabilidade cortical motora de áreas subjacentes à estimulação, proporcionando melhora das habilidades psicomotoras e musculares, do processo intelectual e da aprendizagem. Embora ainda não exista na literatura nada sobre os efeitos da estimulação transcraniana em indivíduos com SD, os estudos envolvendo pacientes pediátricos demonstraram que a técnica é segura, com mínimos ou ausentes efeitos adversos⁸¹.

A estimulação anódica facilita a excitabilidade cortical por meio da redução do limiar de disparo do potencial de ação. Se este efeito for atingido durante o treino com realidade virtual, que oferece um ambiente interativo e facilitador para o treino de atividades voluntárias motoras, a estimulação transcraniana poderá modular a atividade cortical motora e abrir passagem para o aumento e prolongamento do ganho funcional promovido pela terapia física, através de melhora no controle *top-down* cerebral⁸¹⁻⁸².

Acreditamos que ao aplicar a ETCC anódica sobre no córtex F3, especificamente nas áreas responsáveis pela memória, aprendizado motor e planejamento de movimento, durante o treino manual com propriedades cognitivas com uso de realidade virtual, será possível facilitar a excitabilidade cortical e, assim, modificar a atividade cerebral e correlacionar à atividade muscular e cinemática em 3D do movimento de alcance.

Sendo assim, com objetivo de explorar as variáveis do efeito desta técnica na população faz-se necessário um estudo para analisar atividade cerebral, atividade muscular e cinemática dos membros superiores de crianças com Síndrome de Down submetidas à estimulação transcraniana por corrente contínua associada à realidade virtual.

3. Hipóteses

Hipótese nula: Dez sessões de estimulação transcraniana por corrente contínua anódica ativa sobre córtex na região de F3 associada ao treino de Realidade virtual resultará nos mesmos efeitos sobre atividade cerebral que o treino de Realidade virtual associada a estimulação transcraniana placebo em indivíduos com Síndrome de Down.

Hipótese alternativa: Dez sessões de estimulação transcraniana por corrente contínua anódica ativa sobre no córtex na região de F3 associada ao treino Realidade virtual resultará em efeitos superiores sobre atividade cerebral aos obtidos com treino de Realidade virtual associada a estimulação transcraniana placebo em indivíduos com Síndrome de Down.

4. Objetivos

4.1

Objetivo geral



Este projeto de **caráter inovador** tem como objetivo realizar uma análise comparativa dos efeitos de uma tarefa motora de alcance manual com Realidade virtual por meio de um jogo motivacional em monitor *touch screen* que proporciona uma tarefa cognitiva de memória, processamento de informação e agilidade na execução motora, com e sem a associação da estimulação transcraniana por corrente contínua de indivíduos com SD sobre a atividade cerebral, atividade muscular e análise cinemática espaço temporal com variáveis durante a tarefa motora de alcance manual.

4.2. Objetivos secundários

4.2.1 Analisar o comportamento do sinal EEG sobre o córtex após o uso da t'DCS.

4.2.2 Verificar efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua anódica, aplicada durante 20 minutos de treino com intensidade de 1mA, em indivíduos com SD.

4.2.4 Verificar uma possível correlação entre as respostas da tarefa motora, atividade muscular e a atividade cerebral (áreas motoras e cognitivas), por meio da correlação dos sinais EEG, EMG e dados cinemáticos.

4.2.5 Verificar os efeitos dos diferentes tipos de montagens e treinos utilizando a t'DCS ativa durante a tarefa motora e cognitiva proposta, em indivíduos SD.

4.2.6 Avaliar a atividade cerebral de indivíduos com SD comparada a indivíduos com desenvolvimento típico por meio de EEG convencional.

4.2.7 Avaliar a atividade cerebral de indivíduos com SD comparada a indivíduos com desenvolvimento típico por meio de interface e sinal EEG.

5. Plano de trabalho e cronograma de sua execução

Ano 01 – 2020	Jan	Fe	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Revisão literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Treinamento da tDCS	X	X	X	X	X							
Treinamento do EEG				X	X	X	X					
Elaboração do protocolo		X	X	X	X							
Envio ao CEP	X	X	X									
Registro no Clinicaltrials.org				X	X							
Coletas inicial de dados								X	X	X		
Análise e Discussão parcial									X	X	X	
Elaboração de Publicações										X	X	X
Ano 02 – 2021												
Coleta de dados	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análise e discussão dos dados						X	X	X	X	X	X	X
Ano 03 – 2022												
Análise e discussão dos dados	X	X	X	X								
Elaboração de Publicações			X	X	X	X	X	X	X	X		
Elaboração relatório final										X	X	X

6. Materiais e método

6.1 Aspectos éticos

O presente estudo obedece às Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos formuladas pelo Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, estabelecidas em outubro de 1996 e atualizadas na resolução 466 em 2012, no Brasil. O estudo será desenvolvido no Centro Universitário de Anápolis- UniEvangélica e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da instituição.

O presente protocolo de pesquisa está registrado no *ClinicalTrials.gov*. Todos os responsáveis deverão concordar com a participação da criança, por meio da assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo comitê de ética (Anexo 1), onde irão declarar ter ciência de que o procedimento ao qual vão submeter seus filhos é voluntário, gratuito e experimental. E os participantes reconheceram de forma lúdica a sua participação por meio do termo de assentimento aprovado pelo comitê de ética (Anexo 2).

Ficará esclarecido que o participante terá acesso a todas as informações e poderá desistir da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo ou dano, se assim o desejar. Além disso, será garantido sigilo absoluto a identificação dos indivíduos, baseado nos princípios éticos de confidencialidade e privacidade. Os procedimentos de intervenção placebo serão realizados sempre associados a um tratamento ativo, o que torna o seu uso de menor impacto ao paciente. Além disso, os pacientes serão informados da utilização deste procedimento antes do início da pesquisa.

6.2 Desenho do estudo

Trata-se de um protocolo de estudo que será realizado em três fases. A primeira fase será um estudo transversal para representar o padrão de normalidade dos parâmetros cinemáticos, musculares e cerebrais durante uma tarefa motora de alcance manual com poder cognitiva dos indivíduos saudáveis comparados a indivíduos com SD (figura 1). Esta primeira fase será dividida em dois momentos distintos:

Momento 1: 12 crianças com SD comparadas com 12 crianças indivíduos desenvolvimento típico por meio de análise de cinemática, muscular e atividade cerebral por meio do EEG convencional com a inserção da interface de sinal tEEG.

Momento 2: 12 crianças com SD comparadas com 12 indivíduos desenvolvimento típico por meio de análise de cinemática, muscular e atividade cerebral por meio do EEG convencional.

A fase dois será um estudo piloto com 05 crianças em cada grupo e a fase três será o ensaio clínico randomizado controlado conforme descrição abaixo.

Seleção e caracterização da amostra dos indivíduos saudáveis

Indivíduos com desenvolvimento típico serão recrutados de um banco de dados na universidade de 7 a 12 anos de idade cronológica. Os indivíduos com desenvolvimento típico deste estudo comporão a amostra pouco criteriosa e serão recrutados pelos pesquisadores responsáveis do estudo e alunos do Laboratório de Análise de Movimento do Centro Universitário de Anápolis - UniEvangélica, por meio de eventos, encontros e palestras na instituição que terá como tema o projeto e explicações do termos de participação neste caso os voluntários interessados passaram por avaliações com pesquisadores envolvidos no projeto para a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão foram ausência de diagnóstico de distúrbios neurológicos e compreensão e cooperação adequadas para o desempenho dos procedimentos. Os guardiões legais de ambos os grupos que concordaram com os procedimentos assinaram uma declaração de consentimento informado aprovada pelo CEP. Todos os indivíduos receberam uma explicação detalhada sobre a investigação antes da participação e foram solicitadas a demonstrar seu interesse espontâneo em participar do estudo assinando uma declaração de concordância que fosse fácil de entender.

Seleção e caracterização da amostra com Síndrome de Down

Serão recrutadas a partir de contato feito pelos pesquisadores responsável pelo estudo com médicos pediatras, fisiatras e neuropediatras da cidade de Anápolis- GO e região para divulgação do estudo e este estudo contatara com a participação de uma instituição parceira a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de Anápolis que se disponibilizou a oferecer amostras do grupo experimental indivíduos com SD que serão avaliados em seus critérios de inclusão ou exclusão. Os critérios de inclusão serão crianças que: a) diagnóstico de SD; b) capacidade de entendimento e colaboração para realização dos procedimentos envolvidos no estudo; c) idade cognitiva 7 a 12 anos que será avaliada com duração de 1 hora e de acordo com RESOLUÇÃO Nº 466/12, por uma psicóloga colaboradora, em uma sala reservada e fechada dentro do laboratório de análise de movimento, com privacidade necessária para manter a integridade do voluntário; d) os responsáveis concordem com a sua participação no estudo por meio da assinatura do TCLE.

Após a definição da amostra deste estudo, os responsáveis serão orientados que o projeto de pesquisa e seu responsável garante ao participante e seus familiares o custeamento do transporte e demais despesas que possam surgir em decorrência da sua participação no estudo, mais especificamente o custeamento do seu deslocamento diário ao Laboratório de Análise de Movimento do Centro Universitário de Anápolis de acordo com a Resolução CNS Nº 466/2012 prevê que os estudos envolvendo seres humanos devem garantir a inexistência de ônus econômico-financeiro adicional à família do participante o a ele próprio”.

6.3 Cálculo da amostra

Para o adequado cálculo da amostra será realizado um estudo piloto, com a mesma metodologia do estudo proposto. O estudo piloto vai envolver dez indivíduos. Os dez participantes serão divididos de forma aleatória em dois grupos (experimental e controle), de forma que, cada um dos grupos seja constituído por cinco voluntários. Desta forma, o cálculo amostral será realizado com base nas médias obtidas pelos grupos experimental e controle do estudo piloto, considerando como desfecho primário a atividade cerebral, um alfa unidirecional de 0.05 e um poder de 80%. A amostra obtida no cálculo será ampliada em 20% a fim de evitar efeitos de *dropouts*. (Figura. 1)

Os indivíduos que se enquadrarem nos critérios de elegibilidade, na fase 3 os responsáveis aceitarem a participação no estudo serão alocadas de forma aleatória em um dos dois grupos do estudo, por um método de aleatorização pelo site www.randomizacion.com.

Grupo Experimental: ETCC anódica (um eletrodo ânodos serão posicionados na região referente no córtex em região F3, seguindo o sistema internacional 10-20 de eletroencefalograma e o eletrodo cátodo será posicionado no ventre muscular do musculo deltoide, associada ao treino de Realidade virtual.

Grupo Controle: ETCC placebo (os dois eletrodos ânodos serão posicionados na região referente córtex em região F3, seguindo o sistema internacional 10-20 de eletroencefalograma e o eletrodo cátodo será posicionado em no ventre muscular do musculo deltoide associada ao treino de Realidade virtual.

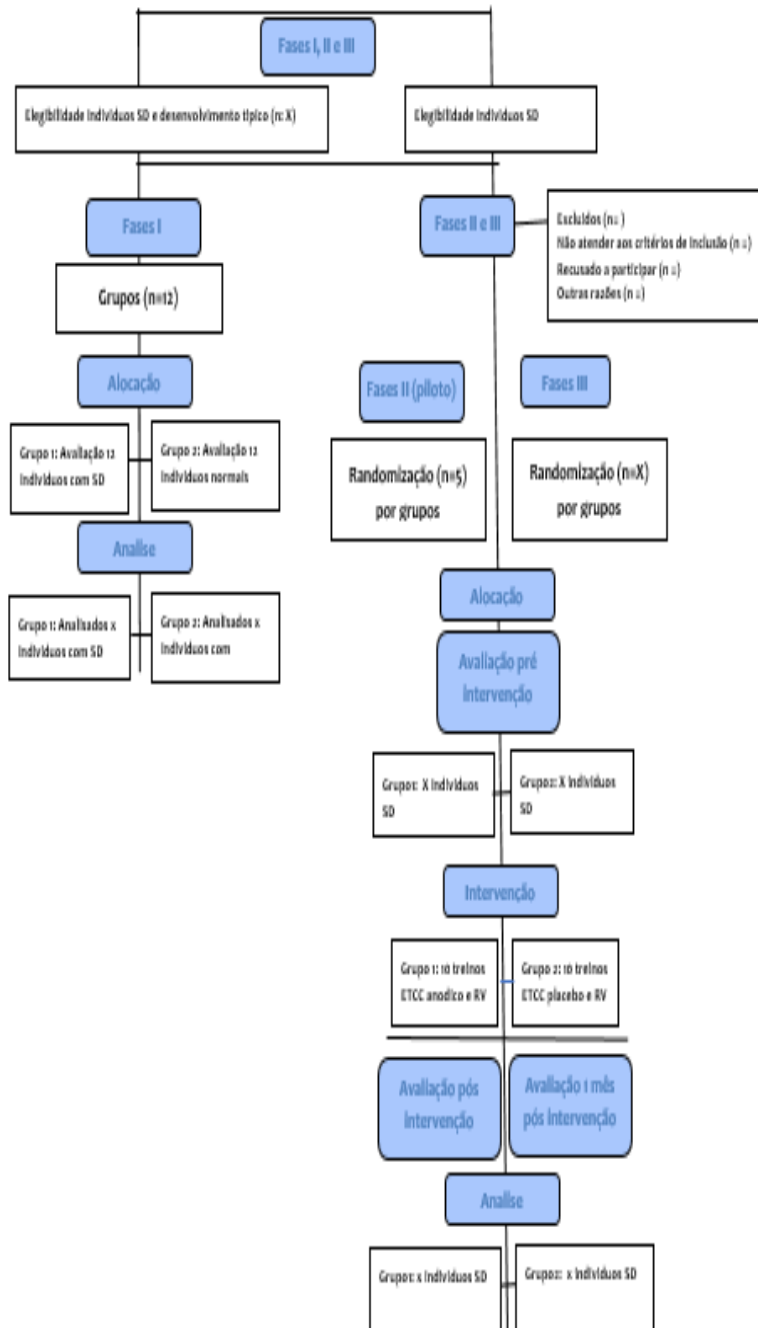


Figura 1. Fluxograma do estudo segundo o CONSORT.

6.4 Avaliação

O processo de avaliação da fase 1 estudo comparativo (momento 1 e 2), 2 estudos piloto e 3 (pré-intervenção, pós-intervenção e um mês após o término dos protocolos de intervenção) será realizada, com período máximo de uma hora e 30 minutos por dia no laboratório para análise de movimento humano no Centro Universitário de Anápolis - UniEVANGÉLICA. O avaliador será cego com relação aos objetivos do estudo, não fazendo parte dos profissionais responsáveis pelos protocolos de intervenção.

Inicialmente a ficha de identificação será preenchida e os dados antropométricos mensurados, o processo de avaliação será realizada de acordo com a RESOLUÇÃO N° 466/12, com período máximo de duração de 1 hora e 30 minutos por dia no laboratório de análise de movimento do Centro Universitário de Anápolis – UniEVANGÉLICA. A ficha de identificação será preenchida com dados pessoais e os dados antropométricos mensurados (massa corporal, estatura e índice de massa corporal) utilizando equipamentos como fita métrica e balança. Esta avaliação será realizada em uma sala reservada e fechada dentro do laboratório de análise de movimento, com privacidade necessária para manter a integridade do voluntário. A seguir a descrição dos procedimentos da avaliação:

Eletrodos de anel concêntrico tripolar (TCREs/ tEEG) primeiro momento da fase

1: A atividade cerebral será investigada por meio do eletroencefalograma um registro da atividade elétrica do cérebro que usa eletrodos colocados no couro cabeludo sendo capaz de medir toda a extensão cortical como ilustração da figura 2. Este sistema pode medir a diferença de potencial entre os eletrodos que são gerados por correntes iônicas que fluem dentro dos neurônios do cérebro. Seu anel TCREs é utilizado para registro deste EEG, no entanto este resultante é conhecido como o tEEG

A filtragem de alta ou baixa passagem pode reduzir os artefatos, mas geralmente também remove uma parte significativa do sinal relevante. Embora as soluções de filtragem de software estejam disponíveis para "limpar" o sinal, todas as soluções de software digital representam dados transformados. Como tal, os dados podem não refletir fielmente a fisiologia subjacente, ou podem inadvertidamente remover ou atenuar o próprio sinal.

A figura abaixo compara o EEG por método de avaliação convencional e o tEEG gravados simultaneamente de um paciente com epilepsia enquanto o paciente estava movimentando a cabeça. O EEG foi severamente contaminado por artefatos musculares e de movimento durante os movimentos do paciente (como visto nos sinais à esquerda), mesmo quando pares bipolares de eletrodos de disco foram usados para reduzir o ruído (por exemplo, o par F4-C4). Em contraste, o sinal referencial do tEEG, gravado a partir de t-Leads próximos aos mesmos locais, era muito limpo (sinais à direita) como verificamos na figura 3.

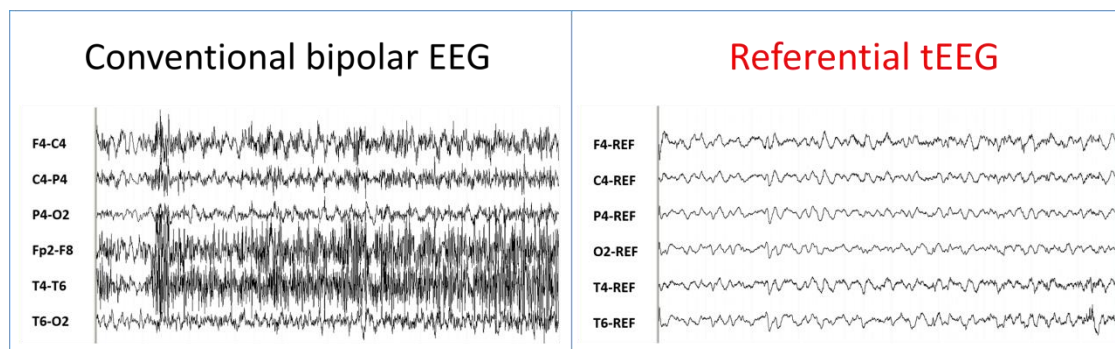


Figura 2: Comparação entre o sistema convencional de processamento de dados do EEG e o sistema de processamento de dados do tEEG.

Análise Eletroencefalográfica (primeiro e segundo momento da fase 1, fase 2 e fase 3):

A atividade cerebral será investigada por meio do eletroencefalograma (EEG), equipamento eego™ sports, com um sistema alimentado por bateria com gravações de 32 canais de EEG e taxa de amostragem de até 16 kHz. EEG é um dos métodos mais antigos para avaliar o relacionamento entre cérebro e comportamento, e fornece uma medida direta em tempo real da atividade neural. De fato, de uma perspectiva histórica, os pesquisadores que apreciam o EEG como um método altamente adequados para identificar os mecanismos neurais críticos para o desempenho motor como exemplo o esportivo segundo Crews e Landers, 1993; Hatfield e outros, 1984; Salazar et al., 1990. O EEG tem sido utilizado para influenciar o comportamento, via treinamento *neurofeedback*, facilitando o reconhecimento e modificação de estados mentais associados com padrões particulares de excitação cortical e resultados comportamentais concomitantes.

Os dados serão coletados em um laboratório cujos ruídos internos e externos serão controlados a fim de evitar interferências nos sinais adquiridos. Além disso, no ambiente deve estar apenas o avaliador e o voluntário. A criança que será posicionada em mesa quadrada de posição ereta em uma cadeira ajustável para os pés ficarem apoiados ao solo e mãos apoiadas na mesa (posição inicial) será projetado em um monitor *touch screen* um jogo desenvolvido exclusivamente para este teste.

O jogo será composto pela exibição de figuras, em ordem aleatória, de forma que a criança será orientada a tocar apenas aquelas indicadas no canto da tela, realizando dessa forma uma tarefa motora de alcance manual associada à uma tarefa cognitiva de memorização e atenção. Após cada toque (tentativa), o indivíduo deverá retornar à posição inicial de apoio, e aguardar que uma nova figura correta seja exibida.

A tarefa será realizada será simultaneamente a avaliação do sinal EEG, sinal EMG e aquisição dos dados cinemáticos dos membros superiores, com objetivo de verificar identificam sinais neurais associados ao movimento ou que empregam neurofeedback para melhorar o desempenho motor e cognitivo. Os dados serão pré-processados pelo Software asa™ um pacote de análise EEG / ERP e MEG altamente flexível com uma variedade de recursos de reconstrução de fontes, análise de sinal e os dados serão expressos quanto suas variáveis de acordo.

Análise da Eletromiografia: A atividade muscular durante a tarefa motora manual será determinada usando Eletromiografia (EMG). A atividade elétrica resultante da ativação dos flexores e extensores do cotovelo será coletada usando um eletromiógrafo de oito canais (FREEEMG, BTS Engineering) com um amplificador de sinal bioelétrico, transmissão de dados sem fio e eletrodos bipolares com um ganho total de 2000 vezes e frequência variando de 20 a 450 Hz. A impedância e a relação do modo de rejeição comum do equipamento são $1015\Omega/0.2\text{ pF}$ e $60/10\text{ Hz } 92\text{ dB}$, respectivamente.

O ponto do motor dos músculos será identificado para a colocação dos eletrodos e a pele será limpa com 70% de álcool para reduzir a bioimpedância, seguindo as recomendações da Electromiografia Superficial para a Avaliação Não-Invasiva de Músculos.

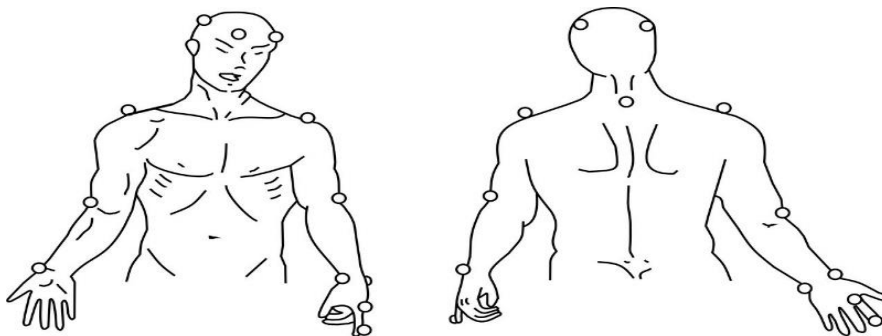
Todos os dados EMG serão digitalizados em 1000 quadros por segundo usando o programa de software BTS MYOLAB. Os dados serão coletados simultaneamente aos dados da eletroencefalografia do equipamento eego™mylab segundo Lopes et al. (2018).

Análise de movimento tridimensional: Análise tridimensional do movimento dos membros superiores: a cinemática do movimento dos membros superiores será avaliada usando o sistema SMART-D 140 (BTS, Milão, Itália), com oito câmeras sensíveis à luz infravermelha, uma frequência de amostragem de 100 Hz e sistema de vídeo sincronizado com o sistema SMART-D (figura 3). Marcadores passivos serão posicionados em pontos de referência anatômica diretamente na pele com fita adesiva específica, seguindo o protocolo do SMARTup: a configuração experimental (figura 4). Um total de 18 marcadores medindo 15 mm de diâmetro será usado para identificar a posição da cabeça, tronco e membros superiores (braço, antebraço e mão).

Figura 3. Ambiente de aquisição dos dados sistema SMART-D



Figura 4. Colocação de marcadores para análise tridimensional usando o SMARTup: a configuração experimental.



7. Procedimentos

7.1 Protocolo de intervenção

A intervenção terapêutica consistirá das fases 2 e 3 será uma combinação de ETCC e Realidade virtual. O protocolo seguirá os procedimentos de segurança descritos na literatura para o uso de ETCC na população pediátrica⁷¹⁻⁷². Três sessões de terapia combinada de 20 min (ETCC concomitantemente ao treinamento de realidade virtual) serão realizadas por um total de dez sessões⁷⁰⁻⁷¹ e será realizada de acordo com a RESOLUÇÃO Nº 466/12 realizada em uma sala reservada e fechada dentro do Laboratório de Análise de Movimento Humano da UniEVANGÉLICA, com privacidade necessária para manter a integridade do voluntário.

7.2 Estimulação de corrente contínua transcraniana

A estimulação será administrada usando um dispositivo ETCC (DC-Stimulator NeuroConn, Alemanha), com três eletrodos de superfície esponjosos (não metálicos) medindo 25 cm² (5 × 5 cm) embebidos em solução salina. Os indivíduos serão alocados aleatoriamente para dois tipos de tratamento: (1) estimulação anodal ativa sobre córtex em região F3 e (2) estimulação transcraniana simulada. Os dois eletrodos anodais serão posicionados córtex em região F3 sistema internacional de eletroencefalograma 10-20⁷⁰ e o cátodo será posicionado musculo deltoide.

Esta montagem permitirá que o indivíduo receba ETCC anodal sobre o córtex em região F3, minimizando assim o efeito da estimulação catódica no cérebro. A corrente de 1 mA (corrente densidade: 0,029 mA / cm²) será administrada ao longo do córtex durante 20 minutos durante o treinamento do membro superior. O estimulador possui um botão que permite ao operador controlar a intensidade da corrente. No início da sessão, a estimulação aumentará gradualmente até atingir 1 mA e diminuirá gradualmente durante os 10s finais da sessão. A estimulação de Sham consistirá na mesma montagem de eletrodo e o estimulador será ligado por 30 s, dando à criança a sensação inicial de estimulação, mas nenhuma corrente será administrada durante o restante da sessão. Isso é considerado um procedimento de controle válido em estudos envolvendo ETCC. 50-70,71

Efeitos adversos: Os potenciais efeitos adversos do ETCC serão avaliados no final de cada sessão usando um questionário administrado à criança. O questionário abordará a percepção dos sintomas que ocorreram durante a sessão, como formigamento, sensação de queimação, dor de cabeça, dor nos locais dos eletrodos, sonolência e humor alterado.

Os indivíduos serão instruídos para responder usando uma escala de três pontos. Os cuidadores e os indivíduos também receberão perguntas abertas no início de cada sessão sobre a ocorrência de dor de cabeça, dor no couro cabeludo, sensações de queimação, vermelhidão da pele, sonolência, dificuldade de concentração e mudanças de humor durante os períodos entre as sessões.

7.3 Protocolo de treinamento de realidade virtual

As sessões de treinamento serão realizadas três vezes por semana em dias não consecutivos. Cada sessão durará 20 minutos e envolverá o uso de um jogo, exibido em um monitor *touch screen*, capaz de promover a execução de uma atividade motora e cognitiva, induzindo a melhora nas habilidades psicomotoras, tempo de execução, coordenação motora, atenção, concentração, raciocínio, memória, persistência. Durante o treinamento o indivíduo será posicionada em mesa quadrada de posição ereta em uma cadeira ajustável para os pés ficarem apoiados ao solo e mãos apoiadas na mesa (posição inicial), será projetado em um monitor touch screen um jogo desenvolvido exclusivamente para este teste.

O jogo será composto pela exibição de figuras, em ordem aleatória, de forma que a criança será orientada a tocar apenas aquelas indicadas no canto da tela, realizando dessa forma uma tarefa motora de alcance manual associada à uma tarefa cognitiva de memorização e atenção. Após cada toque (tentativa), o indivíduo deverá retornar à posição inicial de apoio, e aguardar que uma nova figura correta seja exibida. Duas sessões de treinamento serão realizadas antes do início do protocolo de intervenção. Os registros serão feitos do número de sessões atendidas e da duração de cada sessão, score final de cada sessão de erros e acertos e avanço do nível de dificuldade.⁵⁴⁻⁵⁵

Em observância ao disposto no item III.2 da RESOLUÇÃO Nº 466/12, serão utilizadas estratégias de suporte ao participante, se houver possibilidade de lesão neurológica, muscular e endócrina e/ou evento adverso durante a realização dos testes/exames pertinentes ao protocolo experimental, nesse sentido os profissionais do estudo tem como protocolo o acompanhamento de possíveis alterações, e medida como suspender o protocolo do estudo e os pacientes serão encaminhados a avaliação clínica até sanar as alterações.

8. Riscos e benefícios

Quanto aos seus benefícios todos os indivíduos sendo ele controle ou experimental poderá contar com os resultados das avaliações após o termino do estudo. Este estudo contribuirá para novas técnicas avaliativas para a população de estudo e base a novos estudos a serem desenvolvidos. Esta pesquisa mesmo se tratando de um estudo clinico com intervenção, apresenta um risco mínimo ao voluntario uma vez que todos serão orientados ao procedimento previamente, será realizado um teste para saber como o voluntario respondera ao processo de avaliação. Neste caso por não se tratar de uma intervenção clinica ou invasiva não se espera riscos ou comprometimento físico, apenas o indivíduo pode relatar cansaço e ou desinteresse em realizar a tarefa. Neste caso o mesmo e seu responsável serão orientados que poderá desistir da avaliação a qualquer momento.

9. Análise dos resultados

O teste de Shapiro-Wilk será usado para determinar se os dados aderem à curva gaussiana. As variáveis paramétricas serão expressas como média e desvio padrão. As variáveis não-paramétricas serão expressas como mediana e IQR. Os tamanhos de efeitos serão calculados a partir das diferenças nos meios entre a pré-intervenção e as avaliações pós-intervenção. Os valores do tamanho do efeito serão expressos com as respectivas ICs de 95%.

A análise de variância de duas vias (variáveis paramétricas) ou o teste de Kruskal-Wallis (variáveis não-paramétricas) serão utilizados para a análise dos efeitos da atividade de treinamento do motor com ETCC ativos e placebo. Modelos de regressão logística serão criados para determinar os fatores preditivos da resposta à intervenção. A capacidade de resposta será definida como um aumento clinicamente significativo no desempenho em comparação com a linha de base. As variáveis independentes serão idade (anos), sexo (masculino / feminino), variáveis da atividade cerebral (C3 e C4). As regressões univariadas serão realizadas para cada variável. Com base nas análises iniciais, os preditores associados com o resultado com um valor $p \leq 0,05$ serão incorporados no modelo multivariável. Além disso, os coeficientes de correlação de Pearson serão calculados para determinar correlações entre as variáveis analisadas. Um valor de $p < 0,05$ será considerado indicativo de significância estatística. Os dados serão organizados e tabulados através do SPSS V.19.0.

10. ORÇAMENTO PARA O LABORATÓRIO DE ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA

CAPITAL - FAPEG

Item	Descrição	Quantidade	Valor
01	DC-Stimulador, NeuroConn	01	R\$36.270,00
02	Eletroencefalograma antNEURO eego Sport 32 TM canais	01	R\$112.000,00
03	Cabo de transmissão t'EEG	01	R\$45.000,00
	SubTotal		R\$193.270,00
			(2020)
	Total		R\$193.270,00
			(04 anos)

BOLSA - FAPEG

Item	Descrição	Quantidade	Valor
01	Bolsa Pós Doutorado (10 meses)	01	R\$41.000,00
	SubTotal		R\$41.000,00
			(2020)
02	Bolsa Pós Doutorado (12 meses)	01	R\$49.200,00
03			
	SubTotal		R\$49.200,00
			(2021)
	Total		R\$90.200,00
			(04 anos)

11. Referências

1. FERREIRA, C. A. M.; RAMOS, M. I. B. *Psicomotricidade: educação especial e inclusão social*. Rio de Janeiro: Wak Ed, p. 115-124, 2007.
2. RAMALHO, C. M. J.; PEDREMÔNICO, M. R.; PERISSINOTO, J. Síndrome de Down: avaliação do desempenho motor, coordenação e linguagem (entre dois e cinco anos). *Temas sobre desenvolvimento*, v. 9, n. 52, p. 11-14, 2000.
3. ABBEDUTO, L.; PAVETTO, M.; KESIN, E.; WEISSMAN, M.; KARADOTTIR, S. O'BRIEN, A.; CAWTHON, S. The linguistic and cognitive profile of Down syndrome: Evidence from a comparison with fragile X syndrome. *Down Syndrome Research and Practice*, v. 7, n. 1, p. 9-15, 2001.
4. CARR, J. Patterns of ageing in 30–35-year-olds with Down's syndrome. *Journal of Applied Research in Intellectual Disabilities*, v. 16, n. 1, p. 29-40, 2003.
5. SINAI, A.; BOHNEN, I.; STRYDOM, A. Older adults with intellectual disability. *Current opinion in psychiatry*, v. 25, n. 5, p. 359-364, 2012.
6. BISSOTO, M. L. Desenvolvimento cognitivo e o processo de aprendizagem do portador de síndrome de Down: revendo concepções e perspectivas educacionais. *Ciências & Cognição*, v. 4, 2005.
7. RESTIFFE, A. P. O desenvolvimento motor de recém-nascidos pré-termo e a termo até a aquisição da marcha segundo Alberta Infant motor Scale: um estudo de coorte. Diss. **Universidade de São Paulo**, 2007.
8. FERREIRA, D. M.; SALLES, B. F.; MARQUES, D. V. M.; FURIERI, M.; BONOMO, L. M. M.; SALLES, F. L. P.; & de ANDRADE, M. Funcionalidade de crianças com e sem Síndrome de Down. *Revista Neurociências*, v. 17, n. 3, p. 231-238, 2009.
9. FERREIRA, D. M.; SALLES, B.F.; Miranda D.V.1. Funcionalidade de crianças com e sem Síndrome de Down. *Revista Neurociências*, v. 17, n. 3, p. 231-238, 2009.
10. MANCINI, M. C.; SILVA, P. C.; GONÇALVES, S. C.; & MARTINS, S. D. M. Comparison of functional performance among children with Down syndrome and

- children with age-appropriate development at 2 and 5 years of age. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 61, n. 2B, p. 409-415, 2003.
11. GARCIAS, G. D. L.; ROTH, M. D. G. M.; Mesko, G. E.; Boff, T. A. Aspectos do desenvolvimento neuropsicomotor na síndrome de Down. **Rev. bras. neurol**, p. 245-248, 1995.
 12. SCHWARTZMAN J. S.; Síndrome de Down. 1999. **Editora Mackenzie**, São Paulo.
 13. ABBEDUTO, L.; PAVETTO, M.; KESIN, E.; WEISSMAN, M. D.; KARADOTTIR, S.; O'BRIEN, A.; CATWON, S. The linguistic and cognitive profile of Down syndrome: Evidence from a comparison with fragile X syndrome. **Down Syndrome Research and Practice**, v. 7, n. 1, p. 9-15, 2001.
 14. FLÓRES, B. J.; TROCOSO, V. M.; Síndrome de Down y educación. **Reimp. Barcelona: Masson – Salvat Medicina y Santander**. 1997.
 15. TRONCOSO, V. M.; CERRO, M. M.; Síndrome de Down: lectura y escritura. **Barcelona Masson**. 1999.
 16. FERREIRA, C. A. M.; RAMOS, M. I. B. Psicomotricidade: educação especial e inclusão social. **Rio de Janeiro**. p8. 2008.
 17. LURIA, A. R.; TSVETKOVA, L. S. The programming of constructive activity in local brain injuries. **Neuropsychologia**, v. 2, n. 2, p. 95-107, 1964.
 18. BUCKLEY S.L.; BIRD G. Meeting the education needs of the children with Down syndrome. **Portsmouth: Sarah Duffen Centre University of Portsmouth**.
 19. VASCONCELOS M. M. Retardo mental. 2004. **Jornal de Pediatria**; v. 80, n. 2, p. 71-82, 2004.
 20. VYGOTSKY, L. S. A. Formação social da mente: o desenvolvimento dos processos psicológicos superiores. 6 ed. **São Paulo**. 1998.
 21. GRELA, Bernard G. Do children with Down Syndrome have difficulty with argument structure? **Jounal of Communication Disorders**, v. 36, n. 4, p. 263-279, 2003.

22. LAMÔNICA, D. A.; VITTO, L. D.; GARCIA, F. C.; CAMPOS, L. C. Avaliação do processo receptivo: investigação do desenvolvimento semântico em indivíduos com síndrome de Down. **Revista Brasileira de Educação Especial**, v. 11, n. 01, p. 81-96, 2005.
23. ESCAMILLA, Sylvia García. **El niño con síndrome de Down**. Diana, 1983.
24. FEUERSTEIN, R.; YA'ACOV Rand, Hoffman, M. B.; MILLER, R. Instrumental enrichment: An intervention program for cognitive modifiability. 1980.
25. DE CORIAT, L. F.; THESLENCO, L.; WAKSMAN, J. The effects of psycho-motor stimulation on the IQ of young children with trisomy 21. In: **Proceedings of the 1st Congress of the International Association for the Scientific Study of Mental Deficiency**. Michael Jackson Publishing Co., 1968.
26. FIDLER, Deborah J. The emerging Down Syndrome behavioral phenotype in early childhood: implications for Practice. **Rev. Infants & Young Children**, v. 18, n. 2, p. 86-103, 2005.
27. FREGNI, F.; BOSSIO, P. S.; BRUNONI, A. R. Neuromodulação terapêutica: Princípios e avanços da estimulação cerebral não invasiva em neurologia, reabilitação, psiquiatria e neuropsicologia. **São Paulo: Sarvier**, 2012.
28. FREGNI, F.; GIMENES, R.; VALLE, A. C.; FERREIRA, M. J.; ROCHA, R. R.; Natalle, L.; Bravo, R.; Rigonatti, S.P.; Freedman, S.; Nitsche, M.; Pascual-Leone, A.; Boggio, P. S. A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 54, n. 12, p. 3988-3998, 2006.
29. MENDONÇA, M. E.; FREGNI, F. Neuromodulação com estimulação cerebral não invasiva: aplicação no acidente vascular encefálico, doença de Parkinson e dor crônica. In.: **ASSIS, R.D. Condutas práticas em fisioterapia neurológica**. Manole. São Paulo, p. 307-39, 2012.

30. MIRANDA, P. C.; LOMAREV, M.; Hallett, M. Modeling the current distribution during transcranial direct current stimulation. **Clinical neurophysiology**, v. 117, n. 7, p. 1623-1629, 2006.
31. CREUTZFELDT, O. D.; Fromm, G. H.; Kapp, H. Influence of transcortical dc currents on cortical neuronal activity. **Experimental neurology**, v. 5, n. 6, p. 436-452, 1962.
32. GOLDRING, S.; O'LEARY, J. L. Summation of certain enduring sequelae of cortical activation in the rabbit. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**, v. 3, n. 3, p. 329-340, 1951.
33. NITSCHKE, M. A.; PAULUS, W. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. **Neurology**, v. 57, n. 10, p. 1899-1901, 2001.
34. WAGNER, T.; FREGNI, F.; FECTEAU, S.; GRODZINSKY, A.; ZAHN, M.; Pascual-Leone, A. Transcranial direct current stimulation: a computer-based human model study. **Neuroimage**, v. 35, n. 3, p. 1113-1124, 2007.
35. STAGG, C. J.; BACHTIAR, V.; O'Shea, J.; ALLMAN, C.; BOSNELL, R. A.; KISCHKA, U.; MATTHEWS, P. M.; JOHANSEN-BERG, H. Cortical activation changes underlying stimulation-induced behavioural gains in chronic stroke. **Brain**, v. 135, n. 1, p. 276-284, 2011
36. KUO, M. F.; UNGER, M.; LIEBETANZ, D.; LANG, N.; TERGAU, F.; PAULUS, W.; NITSCHKE, M. A. Limited impact of homeostatic plasticity on motor learning in humans. **Neuropsychologia**, v. 46, n. 8, p. 2122-2128, 2008.
37. MONTE-SILVA, K.; KUO, M. F.; THIRUGNANASAMBANDAM, N.; LIEBETANZ, D.; PAULUS, W.; NITSCHKE, M. A. Dose-dependent inverted U-shaped effect of dopamine (D2-like) receptor activation on focal and nonfocal plasticity in humans. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 19, p. 6124-6131, 2009.
38. LIEBETANZ, D.; NITSCHKE, M. A.; TERGAU, F.; PAULUS, W. Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced

- after-effects of human motor cortex excitability. **Brain**, v. 125, n. 10, p. 2238-2247, 2002.
39. NITSCHKE, M. A.; LIEBETANZ, D.; SCHLITTERLAU, A.; HENSCHKE, U.; FRICHE, K.; Frommann, K.; Tergau, F.. GABAergic modulation of DC stimulation-induced motor cortex excitability shifts in humans. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 2720-2726, 2004.
40. LEFEBVRE, S.; DRICOT, L.; LALOUX, P.; GRADKOWSKI, W.; DESFONTAINES, P.; EVRARD, F. Neural substrates underlying stimulation-enhanced motor skill learning after stroke. **Brain**, v. 138, n. 1, p. 149-163, 2014.
41. CHUNG, M. G.; WARREN, D. L. Noninvasive brain stimulation: the potential for use in the rehabilitation of pediatric acquired brain injury. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 96, n. 4, p. S129-S137, 2015.
42. VRY, J.; LINDER-LUCHT, M.; BERWECK, S.; BONATI, U.; HODAPP, M.; UHI, M.; FAIST, M.; Mall, V. Altered cortical inhibitory function in children with spastic diplegia: a TMS study. **Experimental brain research**, v. 186, n. 4, p. 611-618, 2008.
43. VALLE, A. C.; DIONISIO, K.; PITSKEL, N. B.; PASCUAL-LEONE, A.; ORSATI, F.; FERREIRA, M. J.; BOGGIO, P. S.; LIMA, M. C.; RIGONATTI, S. P.; Fregni, F. Low and high frequency repetitive transcranial magnetic stimulation for the treatment of spasticity. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 49, n. 7, p. 534-538, 2007.
44. NEZU, A.; KIMURA, S.; TAKESHITA, S.; TANAKA, M. Functional recovery in hemiplegic cerebral palsy: ipsilateral electromyographic responses to focal transcranial magnetic stimulation. **Brain and Development**, v. 21, n. 3, p. 162-165, 1999.
45. GRECCO, L. A. C.; DUARTE, N. A. C.; MENDONÇA, M.; ZANON, N.; FREGNI, F.; OLIVEIRA, C. S. Transcranial direct current stimulation combined with treadmill gait training in delayed neuro-psychomotor development. **Journal of physical therapy science**, v. 26, n. 6, p. 945-950, 2014.

46. GRECCO, L. A. C.; DUARTE, N. D. A. C.; MENDONÇA, M. E.; CIMOLIN, V.; GALLI, M.; FREGNI, F.; OLIVEIRA, C. S. Transcranial direct current stimulation during treadmill training in children with cerebral palsy: a randomized controlled double-blind clinical trial. **Research in developmental disabilities**, v. 35, n. 11, p. 2840-2848, 2014.
47. GRECCO, L. A.; DUARTE, N. A.; ZANON, N.; GALLI, M.; FREGNI, F.; OLIVEIRA, C. S. Effect of a single session of transcranial direct-current stimulation on balance and spatiotemporal gait variables in children with cerebral palsy: a randomized sham-controlled study. **Brazilian journal of physical therapy**, v. 18, n. 5, p. 419-427, 2014.
48. DUARTE, N. A.; Grecco, L. A.; GALLI, M.; FREGNI, F.; OLIVEIRA, C. S. Effect of transcranial direct-current stimulation combined with treadmill training on balance and functional performance in children with cerebral palsy: a double-blind randomized controlled trial. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e105777, 2014.
49. LAZZARI, R. D.; POLITTI, F.; SANTOS, C. A.; DUMONT, A. J. L.; REZENDE, F. L.; GRECCO, L. A. C.; Oliveira, C. S. Effect of a single session of transcranial direct-current stimulation combined with virtual reality training on the balance of children with cerebral palsy: a randomized, controlled, double-blind trial. **Journal of physical therapy science**, v. 27, n. 3, p. 763-768, 2015.
50. GILLICK, T.; FEYMA, T.; MENK, J.; USSET, M.; VAITH, A.; WOOD, J.; WORTHING, R.; KRACH, E. Safety and feasibility of transcranial direct current stimulation in pediatric hemiparesis: randomized controlled preliminary study. **Physical therapy**, v. 95, n. 3, p. 337-349, 2015.
51. KRISHNAN, C.; SANTOS, L.; PETERSON, M. D.; EHINGER, M. Safety of noninvasive brain stimulation in children and adolescents. **Brain stimulation**, v. 8, n. 1, p. 76-87, 2015.
52. MINHAS, P.; BIKSON, M.; WOODS, A. J.; ROSEN, A. R.; KESSLER, S. K. Transcranial direct current stimulation in pediatric brain: a computational modeling

- study. In: **2012 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society**. IEEE, 2012. p. 859-862.
53. PAVÃO, S. L.; ARNONI, J. L. B.; OLIVEIRA, A. K. C. Impacto de intervenção baseada em realidade virtual sobre o desempenho motor e equilíbrio de uma criança com paralisia cerebral: estudo de caso. **Revista paulista de pediatria**, v. 32, n. 4, p. 389-394, 2014.
54. SVEISTRUP, H. Motor rehabilitation using virtual reality. **Journal of neuroengineering and rehabilitation**, v. 1, n. 1, p. 10, 2004.
55. CONNOLLY, B. H.; MICHAEL, B. T. Performance of retarded children, with and without Down syndrome, on the Bruininks Oseretsky Test of Motor Proficiency. **Physical Therapy**, v. 66, n. 3, p. 344-348, 1986.
56. MELLO, B.; RAMALHO, T. Use of virtual reality in the physical therapeutic treatment of individuals with down syndrome. **Revista Neurociências**, v. 23, p. 143-9, 2015.
57. MCCARTHY, M. L.; SILBERSTEIN, C. E.; ATKINS, E. A.; HARRYMAN, S. E.; SPONSELLER, P. D.; HADLEY-MILLER, N. A. Comparing reliability and validity of pediatric instruments for measuring health and well-being of children with spastic cerebral palsy. **Developmental medicine and child neurology**, v. 44, n. 7, p. 468-476, 2002.
58. LEBIEDOWSKA, M. K.; GAEBLER-SPIRA, D.; BURNS, R. S.; FISK, J. R. Biomechanic characteristics of patients with spastic and dystonic hypertonia in cerebral palsy. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 85, n. 6, p. 875-880, 2004.
59. KUŁAK, W.; SOBANIEC, W.; KUZIA, J. Ś.; BOĆKOWSKI, L. Neurophysiologic and neuroimaging studies of brain plasticity in children with spastic cerebral palsy. **Experimental neurology**, v. 198, n. 1, p. 4-11, 2006.
60. NELSON, K. B.; LYNCH, J. K. Stroke in newborn infants. **The Lancet Neurology**, v. 3, n. 3, p. 150-158, 2004.

61. SREENAN, C.; BHARGAVA, R.; ROBERTSON, C. M. T. Cerebral infarction in the term newborn: clinical presentation and long-term outcome. **The Journal of pediatrics**, v. 137, n. 3, p. 351-355, 2000.
62. LEE, J. J.; LEE, D. R.; KYUM SHIN, Y.; LEE, N. G.; HAN, B. S.; YOU, S. J. H. Comparative neuroimaging in children with cerebral palsy using fMRI and a novel EEG-based brain mapping during a motor task—a preliminary investigation. **NeuroRehabilitation**, v. 32, n. 2, p. 279-285, 2013.
63. MIMA, T.; TOMA, K.; KOSHY, B.; HALLETT, M. Coherence between cortical and muscular activities after subcortical stroke. **Stroke**, v. 32, n. 11, p. 2597-2601, 2001.
64. KOOI, K. A.; TUCHER, R. P.; MARSHALL, R. E. **Fundamentals of electroencephalography**. [s.l: s.n.].
65. SANEI, S.; CHAMBERS, J. EEG signal processing. **John Wiley & Sons**, 2007.
66. GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; GUYTON, A. C. Tratado de fisiologia médica. **Elsevier**, 2006.
67. WEBSTER, J. G. Encyclopedia of medical devices and instrumentation. **John Wiley & Sons, Inc.**, 1990.
68. BRONZINO, J. D. Principles of electroencephalography. **The biomedical engineering handbook**, v. 1, 1995.
69. ANDRADE, A.; LUFT, C. D. B.; ROLIM, M. K. S. B. O desenvolvimento motor, a maturação das áreas corticais e a atenção na aprendizagem motora. **Revista Digital**, v. 10, n. 78, p. 1-1, 2004.
70. ANGUERA, J. A.; BOCCANFUSO, J.; RINTOUL, J. L.; AL-HASHIMI, O.; FARAJI, F.; JANOWICH, J.; GAZZALEY, A. Video game training enhances cognitive control in older adults. **Nature**, v. 501, n. 7465, p. 97, 2013.
71. ASPINALL, P.; MAVROS, P.; COYNE, R.; ROE, J. The urban brain: analysing outdoor physical activity with mobile EEG. **Br J Sports Med**, v. 49, n. 4, p. 272-276, 2015.

72. BONINI-ROCHA, A. C.; TIMM, M. I.; CHIARAMONTE, M.; ZARO, M.; RASIAFILHO, A. A.; WOLFF, D.; AYRES, E. P.; PETERSEN, R. Metodologia para observação e quantificação de sinais de EEG relativos a evidências cognitivas de aprendizagem motora. **Ciências & Cognição**, v. 13, n. 2, p. 27-50, 2008.
73. CAMEIRÃO, M. S.; BADIA, S. B.; OLLER, E. D.; VERSCHURE, P. F. Neurorehabilitation using the virtual reality based Rehabilitation Gaming System: methodology, design, psychometrics, usability and validation. **Journal of neuroengineering and rehabilitation**, v. 7, n. 1, p. 48, 2010.
74. MORAES, H.; FERREIRA, C.; DESLANDES, A.; CAGY, A. Beta and Alpha electroencephalographic activity changes after acute exercise. **Arq. Neuropsiquiatr**, 2007.
75. MALMIVUO, J.; PLONSEY, R. Bioelectromagnetism: principles and applications of bioelectric and biomagnetic fields. **Oxford University Press, USA**, 1995.
76. KANTHAIHAH, K.; WALTER, G. B. Improvement of spatial selectivity and decrease of mutual information of tri-polar concentric ring electrodes. **Journal of neuroscience methods**, v. 165, n. 2, p. 216-222, 2007.
77. PFURTSCHELLER, G. Event-related synchronization (ERS): an electrophysiological correlate of cortical areas at rest. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**, v. 83, n. 1, p. 62-69, 1992.
78. De ALMEIDA, M. D.; Dos SANTOS, M. M. C.; TEMPSKI, P. Z. A intervenção fisioterapêutica no ambulatório de cuidado a pessoa com síndrome de Down no Instituto de Medicina Física e Reabilitação HC FMUSP. **CEP**, v. 5033, p. 002, 2013.
79. CARVALHO, R. L.; ALMEIDA, G. L. Controle postural em indivíduos portadores da síndrome de Down: revisão de literatura. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 15, n. 3, p. 304-308, 2008.
80. PRYCE, M. The voice of people with Down syndrome: An EMG biofeedback study. **Down Syndrome Research and Practice**, v. 2, n. 3, p. 106-111, 1994.

81. OPITZ, J. M.; GILBERT-BARNES, E. F. Reflections on the pathogenesis of Down syndrome. **Am J Med Genet**, 1990.
82. MOURA, R. F. C.; GRECCO, L. A. C.; SANTOS, C.; LAZZARI, R. D.; DUARTE, N. C.; LOPES, J. B. P. Transcranial direct current stimulation combined with upper limb functional training in children with spastic, hemiparetic cerebral palsy: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 17, n. 1, p. 405, 2016.

Projeto 2

Planejamento e desenvolvimentos de novos fármacos de origem natural e sintética.

Profa. Dr. José Luis Rodrigues Martins
PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Anápolis – GO, 2019

PROJETO 2

Planejamento e desenvolvimentos de novos fármacos de origem natural e sintética

RESUMO

Objetivo: O presente estudo visa à construção de um laboratório que tenha expertise em realizar o planejamento, identificação e síntese de novos fármacos, bem como avaliação da atividade farmacológica *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Esta proposta busca desenvolver estudos promissores que serão de grande interesse à indústria farmacêutica no município de Anápolis (GO), assim como em toda região do Centro-Oeste. Materiais e método: A metodologia escolhida para o trabalho consiste no desenvolvimento de modelos computacionais baseados em estratégias *in silico* para o planejamento de novos fármacos, dosagem molecular e aprendizado profundo para triagem virtual. Em seguida os novos protótipos de fármacos serão submetidos a avaliação farmacológica utilizando diferentes modelos farmacológicos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Os dados serão expressos como médias \pm erro padrão das médias em valores absolutos ou percentuais. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais serão detectadas pela Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey como pós-teste, quando analisado mais de dois grupos, ou teste de “t” de Student não pareado, quando analisados amostras independentes. As diferenças serão consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Palavras chave: Inovação Farmacêutica, Avaliação farmacológica, Dosagem molecular.

Introdução

O projeto aqui apresentado é parte de proposta Institucional descrita acima e intitulada como “Inovação, Desenvolvimento e Sustentabilidade: Estreitamento entre Universidade e Setor Produtivo no Estado de Goiás” e estará contemplando um dos objetivos desta proposta “Promover e ampliar a ciência, a tecnologia e a inovação no Centro Norte Goiano, através da formação de recursos Humanos qualificados e desenvolvimento de novos produtos e processos voltados à saúde da população e meio ambiente.

O referido projeto, de caráter inovador, surgiu de amplas discussões entre os pesquisadores da UniEVANGÉLICA e de outras instituições de ensino e pesquisa e também de profissionais da área de inovação tecnológica do setor fármaco químico.

A literatura mostra que o planejamento e descoberta de novos fármacos constituem um processo complexo, competitivo e que depende da integração de várias áreas estratégicas, como inovação, tecnologia, conhecimento, gerenciamento e investimento. O marco do desenvolvimento da atual geração de fármacos é decorrente dos avanços da biologia molecular, das ciências genômicas e da engenharia genética. As plantas e os extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância na área farmacêutica, haja vista a quantidade de substâncias ativas isoladas como protótipos para a obtenção de fármacos, para a obtenção de adjuvantes, ou ainda de medicamentos fitoterápicos.

Em todo mundo, houve um significativo aumento na demanda de produtos naturais nos últimos anos, entretanto o uso de medicamentos à base de plantas, atualmente, parece estar associado ao desenvolvimento de sérios efeitos colaterais. Independentemente da origem que leva a uma molécula candidata a fármaco, a estratégia utilizada para a sua descoberta e desenvolvimento, envolvem uma sequência de experimentos e caracterização, denominada triagem de protótipos. Deste modo, **este estudo visa o planejamento, identificação e síntese de novos protótipos de fármacos, bem como avaliação das atividades farmacológicas.**

Para o desenvolvimento deste projeto contamos com a colaboração de pesquisadores do Laboratório de Ciências farmacêuticas do CEPiNOVA da UniEVANGÉLICA e internacionais como o Prof James Fajemiroye da University of Mississippi (OL), Estados Unidos da América.

1. Contextualização

1.1 Uso de plantas medicinais com propriedades farmacológicas

As plantas medicinais fazem parte da prática da medicina popular, sendo uma das formas mais antigas utilizadas pelo homem para prevenção e cura de doenças. São saberes internalizados por diversos usuários e transmitidos de geração a geração (BRAGANÇA, 1996; RATES, 2001; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

As plantas e os extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância na área farmacêutica, haja vista a quantidade de substâncias ativas isoladas como protótipos para a obtenção de fármacos, para a obtenção de adjuvantes, ou ainda de medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL et al., 2001).

O emprego de plantas medicinais é difundido a milhares de anos, sejam para uso em rituais mágicos/religiosos ou como fonte para drogas, fármacos ou medicamentos (LI et al., 2004). Vários métodos são utilizados para a descoberta de novos medicamentos, tais como: o isolamento de substâncias ativas a partir de plantas e outras fontes naturais, a química sintética e a modelagem molecular (GURIB-FAKIM, 2009).

O uso de plantas é uma opção de tratamento para uma parte da população, não apenas pelo seu poder curativo, como também por serem economicamente mais viáveis. Nesse sentido, o Brasil é privilegiado por ser detentor de um vasto território que abrange diversidades biológicas com inúmeras espécies vegetais com amplo potencial medicinal (DUTRA, 2009).

Em todo mundo, houve um significativo aumento na demanda de produtos naturais nos últimos anos, sendo que somente os fitoterápicos movimentaram no ano de 2008 cerca de 21,7 bilhões de dólares e no Brasil neste mesmo ano o valor estimado foi de aproximadamente 160 milhões de dólares. Estes valores têm sido constantemente aumentados, visto que as vendas de fitoterápicos crescem anualmente em torno de 15%, enquanto os sintéticos apenas 4% (CARVALHO et al., 2008).

De acordo com Freitas et al. (2012), também tem ocorrido no Brasil um crescente interesse pelo conhecimento, utilização e comercialização das plantas medicinais. O alto custo dos medicamentos alopáticos, associado ao difícil acesso de grande parte da população mundial à assistência médica e a tendência de vários consumidores de utilizarem preferencialmente produtos naturais são fatores que contribuem para o aumento da importância das plantas medicinais na medicina moderna (PARENTE; ROSA, 2001; AGRA; DANTAS, 2007).

Entretanto, o uso de plantas medicinais, quando feito com critério, só tem a contribuir para a saúde de quem o pratica. Nesse contexto, a Etnofarmacologia e a Farmacognosia se colocam como importantes ferramentas científicas, as quais buscam desmistificar o conhecimento popular, sem, no entanto, tirar-lhe a importância (ELIZABESKY, 2003). O uso de medicamentos à base de plantas, atualmente, parece estar associado ao desenvolvimento de sérios efeitos colaterais e ao alto custo dos tratamentos com os medicamentos sintéticos (RATES, 2001). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, órgão do Ministério da Saúde, é quem regulamenta o uso das plantas medicinais no Brasil. É ela quem estabelece quais plantas podem ser usadas como opção terapêutica, além de estabelecer quando e como devem ser usadas no Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2006). O Primeiro Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2018) apresenta várias “drogas vegetais” que podem ser utilizadas pelos usuários, assim como o modo de preparo, advertências, indicações e modo de usar. Nas últimas décadas, houve uma revolução no processo de descoberta de fármacos.

Sabe-se que as novas tecnologias e conhecimentos adicionados ao arsenal de métodos e técnicas resultaram no desenvolvimento de fármacos (SILVA, 2013). A quantidade de medicamentos de origem natural vem reduzindo continuamente, ao passo que aqueles de origem sintética estão aumentando. A síntese química está contribuindo para o desenvolvimento de novos fármacos, exigindo assim conhecimento sobre as reações químicas, a interação com catalisadores e métodos especializados de purificação e identificação dos fármacos (CERA, PANCOTI, 2012).

1.2 Uso de fármacos sintéticos com propriedades farmacológicas

O planejamento e descoberta de novos fármacos constituem um processo complexo, competitivo e que depende da integração de várias áreas estratégicas, como inovação, tecnologia, conhecimento, gerenciamento e investimento (LOMBARDINO; LOWE, 2004). O marco do desenvolvimento da atual geração de fármacos é decorrente dos avanços da biologia molecular, das ciências genômicas e da engenharia genética (PALMEIRA FILHO & PAN, 2003).

As moléculas candidatas a fármacos são descobertas, em sua maioria, por meio de identificação e elucidação de um alvo para o composto, bem como planejamento racional do fármaco, com base no conhecimento dos mecanismos biológicos, estrutura dos receptores e estrutura própria (BERKOWITZ, 2006). A síntese e modificação química de compostos continuam sendo a melhor estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos. As modificações estruturais de moléculas conhecidas é um método valioso usado pela indústria farmacêutica na pesquisa de novos fármacos e na identificação de novos protótipos que são mais ativos e apresentam baixa toxicidade. Estima-se que sejam necessários desde a concepção do projeto até a introdução de um único fármaco no mercado aproximadamente 10 anos e um investimento financeiro que pode chegar a US\$ 2,6 bilhões (MULLARD, 2014).

A competitividade e o potencial de crescimento da indústria farmacêutica estão diretamente relacionados com a descoberta de *blockbusters* (i.e. termo em inglês utilizado para designar fármacos inovadores com vendas anuais superiores a US\$ 1 bilhão por ano) (DEBNATH; AL-MAWSAWI; NEAMATI, 2010). Nota-se que os medicamentos líderes de vendas são representados pelas classes farmacológicas dos hipoglicemiantes, anti-neoplásicos e moduladores do sistema nervoso central, cujo maior mercado é constituído por países desenvolvidos. Somente no ano de 2014, dos 100 novos candidatos a protótipos de fármacos de uma única classe farmacológica (anti-inflamatórios) encontram-se nas diversas fases de estudo clínicos (PHARMA, 2019). Independentemente da origem que leva a uma molécula candidata a fármaco, a estratégia utilizada para a sua descoberta e desenvolvimento, envolvem uma sequência de experimentos e caracterização, denominada triagem de protótipos (BARREIRO, 2002).

2 Justificativa

De acordo com as linhas temáticas das diretrizes do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), esta proposta justifica-se pois contribuirá para a geração dos seguintes produtos:

1. Desenvolvimento de ensaios pré-clínicos, incluindo métodos alternativos à experimentação animal;
2. Geração de insumos para a saúde (fármacos, biofármacos, imunobiológicos, kits diagnósticos, biomateriais, equipamentos e dispositivos) e domínio tecnológico para sua produção, atuando junto ao pólo farmacoquímico de Anápolis;
3. Geração de patentes de novos fármacos, processos e registro de softwares;
4. Desenvolvimento de novos processos químicos e biológicos capazes de auxiliar na indústria farmacêutica.

Objetivos

3.1 Objetivo geral

O presente estudo visa aparelhar um laboratório que tenha expertise em realizar o planejamento, identificação e síntese de novos candidatos a protótipos de fármacos, bem como avaliação da atividade farmacológica *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Esta proposta busca desenvolver estudos promissores que serão de grande interesse à indústria farmacêutica no município de Anápolis (GO), assim como em toda região do Centro-oeste.



3.2. Objetivos secundários

- Planejar e identificar novos candidatos a protótipos de fármacos com diferentes atividades farmacológicas utilizando ferramentas de quimioinformática.
- Selecionar os compostos de origem natural e sintética e avaliar atividade farmacológica, utilizando diferentes modelos experimentais.
- Síntese de compostos com atividade farmacológica em diversos sistemas.

4. Plano de trabalho e cronograma de execução

Ano 01 – 2020	Jan	Fe	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Revisão literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Treinamento das metodologias	X	X	X	X	X							
Elaboração do protocolo		X	X	X	X							
Envio ao CEUA	X	X	X									
Realização dos diferentes modelos farmacológicos				X	X	X	X	X	X	X		
Coletas iniciais de dados								X	X	X		
Análise e Discussão parcial dos dados									X	X	X	
Elaboração de Publicações parciais										X	X	X
Ano 02 – 2021												
Coleta de dados	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análise e discussão dos dados						X	X	X	X	X	X	X
Ano 03 – 2022												
Análise e discussão dos dados	X	X	X	X								
Elaboração de Publicações			X	X	X	X	X	X	X	X		
Elaboração relatório final										X	X	X

5. Material e métodos

5.1. Obtenção das substâncias teste

As substâncias teste serão cedidas pelo Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal da Faculdade de Farmácia – UFG, sob supervisão do Prof. Dr. Ricardo Menegatti e pela professora Lucimar Pinheiro, pesquisadora do Laboratório de Biodiversidade do CEPInova do Centro Universitário de Anápolis – UniEVANGÉLICA.

5.2 Animais

Camundongos adultos machos albinos *Swiss* pesando entre 25-35 gramas serão utilizados em todas as avaliações. Os animais serão fornecidos pelo Biotério Central do Centro Universitário de Anápolis – Unievangélica e serão mantidos, sob condições controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h, com as luzes ligadas às 7:00) com livre acesso à água e ração (*ad libitum*). Todos os protocolos experimentais serão desenvolvidos seguindo normas da SBCAL e após aprovação pela CEUA da UniEVANGÉLICA.

5.3 Avaliação de atividade farmacológica

5.3.1 Teste de Atividades Farmacológicas Gerais

Os animais serão tratados pelas vias: oral, intraperitoneal ou subcutânea; com doses crescentes da substância teste, o grupo controle receberá veículo em volume proporcional. Após os tratamentos, os animais serão observados em deambulação livre sobre superfície plana. Os efeitos observados nos animais que receberão o composto e que se diferenciarem dos animais controles serão anotados em ficha padrão de triagem farmacológica adaptada daquela descrita por Malone (1977). Esta metodologia nos fornecerá as doses adequadas a serem utilizados em posteriores testes de atividades biológicas “*in vivo*”.

5.3.2 Edema em orelhas de camundongos induzido pelo óleo de Croton.

Serão usados camundongos albinos *Swiss* machos tratados por via sistêmica com nimesulida (em dose pré-selecionada), veículo (10mL/Kg) ou substância teste (em doses pré-selecionadas). 60 minutos após os tratamentos, cada 1 de solução recém-preparada de óleo de cróton (2,5%) em animal receberá 20 acetona, na superfície da orelha direita. A orelha esquerda receberá volume idêntico de acetona sendo considerada como controle. Após 4 horas os animais serão sacrificados e segmentos idênticos serão tomados de ambas as orelhas e a formação e intensidade do edema será avaliadas através da diferença de peso de tais segmentos (ZANINI et al., 1992).

5.3.3 Edema de pata induzido por carragenina

Este método será realizado segundo a metodologia descrita por Passos et al., (2007). Uma hora após o tratamento dos grupos de animais ($n = 8$) com veículo (10 mL/kg) ou substância teste (em doses pré-selecionadas) ou indometacina (10 mg/kg), os animais receberão uma injeção intraplantar de carragenina (300 $\mu\text{g/pata}$) na pata posterior direita. A pata posterior esquerda receberá uma injeção contendo o mesmo volume de solução salina (NaCl 0,9 %). Após a injeção de carragenina o edema será avaliado com o uso do aparelho Pletismômetro em intervalos de tempo diferentes. A formação do edema será avaliada pela diferença de volume das patas.

5.3.4 Pleurisia induzida por carragenina

Segundo metodologia modificada da descrita por Saleh et al. (1999) os animais receberão pelo plexo orbital, 200 μL de uma solução de azul de Evans a 2,5%. Duas horas após este procedimento os grupos de camundongos serão tratados (v.o.) com veículo 10 mL/Kg, ou substância teste (em doses pré-selecionadas) 20 ou nimesulida (em dose pré-selecionada). Uma hora após os tratamentos, os animais receberão uma injeção de carragenina 1% na cavidade pleural (100 $\mu\text{L/cavidade}$) pelo espaço intercostal das costelas inferiores da caixa torácica. Quatro horas após a aplicação do agente flogístico os animais serão submetidos à eutanásia, a cavidade torácica foi aberta e um pequeno corte foi feito no diafragma, logo abaixo do apêndice xifóide. Em seguida, a cavidade pleural será lavada com 1 mL de solução de PBS (pH 7,6) heparinizado. O líquido recolhido será depositado em tubos Eppendorf® imersos em gelo. Uma alíquota será usada para fazer a contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer e para confecção de esfregaços em lâminas de vidro. Estes esfregaços serão corados pelo método May-Grünwald-Giemsa, posteriormente, analisados em microscópio óptico. Serão contadas 100 células por lâmina, diferenciando em células mononucleares (MONs) de polimorfonucleares (PMNs). Outra alíquota será utilizada para a determinação da concentração do azul de Evans extravasada, em espectrofotômetro (600 nm.).

5.3.4 Atividade da cicloxigenase (Cox) e 5-Lipoxigenase (5-LOX)

Para verificar o efeito do composto testado sobre a atividade da Cox ou 5- LOX, serão utilizados kits enzimáticos (Colometric Inhibitor Screening Assay Kit, Cayman Chemical®). As soluções de substância teste em diferentes concentrações serão incubadas diretamente com as enzimas, a fim de verificar seu efeito direto sobre a atividade de cicloxigenases e lipoxigenase. Desta forma, será avaliado o percentual de inibição das enzimas frente a substância teste.

5.3.5 Atividade da fosfolipase A₂

A atividade da fosfolipase A₂ será avaliada segundo o método modificado do descrito por Shiomi et al., 1998. Inicialmente 1,4 mL de solução de gema de ovo a 2 mg/mL em tampão Tris HCl 0,1 M (pH 8,0), juntamente com 50 µL de salina ou 50 µL de solução de substância teste (em doses pré-selecionadas), em diferentes concentrações, serão incubadas com 50 µL de PLA₂. As leituras das absorbâncias serão realizadas em 900 nm, inicialmente e após 5 minutos da adição de PLA₂. A diferença entre a absorbância inicial e final representará a atividade enzimática, os resultados serão expressos como % de atividade enzimática.

5.3.6 Teste das contorções abdominais

Neste teste empregamos a metodologia descrita por Hendershot & Forsarth (1959) e Koster et al. (1959). Os grupos experimentais de camundongos (n = 6) serão tratados por via oral com veículo ou substância teste (em doses pré-selecionadas) ou indometacina (10 mg/kg) como controle positivo. Após 30 minutos dos tratamentos, será injetado ácido acético 0,6% v/v (10 mL/kg, i.p.). As contorções abdominais seguidas de torções do tronco e extensão dos membros posteriores provocadas pela irritação causada pelo ácido acético na cavidade peritoneal serão contadas durante o período de 30 minutos (VACHER et al., 1964).

Os resultados serão expressos como médias + erro padrão das médias em porcentagem relativa ao número de contorções observadas no grupo controle durante 30 minutos. Importante lembrar que este teste servirá como uma triagem das duas moléculas, ou seja, se alguma das moléculas não apresentar inibição dos números de contorções abdominais os testes posteriores (flexão de cauda e edema de orelha) não serão realizados.

5.3.7 Dor Induzida pela Formalina.

Para este teste, serão utilizados camundongos machos adultos (25 – 30g) que receberão por via oral os tratamentos com veículo ou substância teste (em doses pré-selecionadas) ou fármacos padrões nimesulida (em dose pré-selecionada) v.o ou morfina (5mg/kg) s.c.). Após uma hora, a formalina (20 µL a 2,5% em PBS) será injetada intra muscular na pata direita dos animais e o tempo de lambidas (*licking*) ou mordidas na pata injetada será quantificado, em segundos, por um período de 30 minutos após a injeção. A primeira fase aparece nos primeiros 5 minutos após a injeção e evidencia a dor neurogênica; a segunda fase ocorre entre 15 e 30 minutos e representa resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória decorrente da liberação de mediadores químicos (HUNSKAR & HOLE, 1987; MURRAY et al., 1988)

5.3.8 Teste da flexão da cauda

Serão utilizados grupos experimentais de camundongos (n = 8) tratados pela via oral com veículo (10 mL/kg), substância teste (em doses pré-selecionadas), indometacina (10 mg/kg), ou morfina (10 mg/kg, s.c.). 60 minutos após os tratamentos pela via v.o. ou 30 minutos após o tratamento pela via s.c, os animais serão tratados na região intra muscular da pata posterior direita, com 20 µL de formalina 3% v/v (formaldeído 1,2% v/v), este teste permite avaliar dois tipos de dor, a de origem neurogênica (durante os primeiros 5 minutos), que ocorre devido à estimulação direta nas terminações nociceptivas e a de origem inflamatória (no período de 15 a 30 minutos), produzida pela liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR et al., 1987).

5.4. Avaliação de Atividade no Sistema Nervoso Central:

5.4.1. Teste do Campo aberto:

O campo aberto consiste de uma arena circular com o piso da arena dividido em oito áreas iguais dispostas de maneira a formar três círculos concêntricos (Figura 1). Os grupos de animais ($n = 9$) serão tratados pela via oral com veículo 10 mL/kg, substância teste ou com diazepam 5 mg/kg. Após 60 minutos dos tratamentos os animais serão colocados individualmente no centro da arena do campo aberto para serem observados, durante um período de 5 minutos. Os seguintes parâmetros: atividade exploratória dos animais (número total de quadrados invadidos e número de quadrados invadidos nas regiões central e periférica), tempo de permanência no centro e na periferia, o número de bolos fecais, o número de levantadas (*rearing*), o número de comportamentos auto-limpeza (*grooming*) e o tempo total de permanência parado serão observados (ARCHER, 1973; SIEGEL, 1946).

Figura 1 – Campo aberto



Fonte: Foto do arquivo do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais – ICB/UFG.

5.4.2. Teste da Barra Giratória:

O aparato consiste de uma barra plástica rugosa de 3 cm de diâmetro e 6 cm de comprimento girando a 12 r.p.m (Figura 2). Os camundongos utilizados nesta metodologia serão selecionados 24 horas antes do procedimento experimental. A seleção baseia-se na capacidade de permanecer na barra giratória por 2 minutos contínuos.

No dia do teste, o grupo de animais ($n = 9$) serão tratados pela via oral com veículo 10 mL/kg, substância teste ou com diazepam 5 mg/kg. Após 1 hora dos tratamentos, cada animal será individualmente colocado, com as quatro patas, sobre a barra giratória registrando-se o número de quedas em no máximo três tentativas por, no máximo, um minuto (DUNHAM; MIYA, 1957).

Figura 2 – Barra giratória



Fonte: Foto do arquivo do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais – ICB/UFG

5.4.3. Teste do Sono Induzido por pentobarbital sódico:

Um grupo de animais ($n = 9$) será pré-tratado pela via oral com veículo 10 mL/kg), substância teste ou com diazepam 5 mg/kg. Após 60 minutos dos tratamentos os animais irão receber a administração de pentobarbital sódico 50 mg/kg pela via intraperitoneal. O tempo entre esta administração até a perda do reflexo postural (Figura 3) será cronometrado como latência ao sono e o tempo entre a perda e retomada voluntária do reflexo postural também será cronometrado como duração do sono (CARLINI; BURGOS, 1979).

Figura 3 – Sono induzido por pentobarbital sódico



Fonte: Foto do arquivo do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais – ICB/UFG.

5.5. Avaliação da Atividade Tipo Ansiolítica

Para avaliar uma possível atividade ansiolítica serão utilizados os modelos animais da placa perfurada, labirinto em cruz elevado e caixa claro/escuro.

5.5.1 Placa Perfurada

O aparelho consiste em uma caixa quadrada de acrílico com uma placa de 30 x 30 cm dividida em nove quadrados, cada um com um buraco de 2 cm de diâmetro no centro, posicionada a 10 cm do assoalho da caixa (Figura 4). Os animais (n = 9 por grupo) serão tratados por via oral com a solução veículo 10 mL/kg, OEM nas doses de 125, 250 ou 500 mg/kg ou com diazepam 1 mg/kg. Após 60 min. dos tratamentos os animais serão colocados individualmente no centro da placa perfurada e durante 5 min. o número de quadrados invadidos com as quatro patas e o número de vezes que espreitam os orifícios (mergulhos de cabeça) serão registrados, usando-se como condição mínima de espreitamento a colocação da cabeça nos orifícios até o nível das orelhas dos animais (CLARK et al., 1971).

Figura 4 – Placa perfurada.



Fonte: Foto do arquivo do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais – ICB/UFG.

5.5.2 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado consiste em uma plataforma com dois braços abertos (30 cm de comprimento, 5 cm de largura, com uma proteção lateral de 0,5 cm) perpendiculares a dois braços fechados (30 cm de comprimento, 5 cm de largura, 25 cm de altura) formando uma cruz grega com uma plataforma central (5 x 5 cm) conectando-os. O labirinto é elevado 45 cm do nível do chão (Figura 5). Os animais (n = 9 por grupo) serão tratados pela via oral com a solução veículo 10 mL/kg, substância teste ou com diazepam 1 mg/kg. Após 60 min. dos tratamentos os animais serão colocados individualmente na plataforma central e durante 5 min., sob luz vermelha, sendo registrados o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados (LISTER, 1987). Posteriormente o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos serão convertidos em percentual em relação ao total obtido:

$$\text{Percentual do parâmetro no braço aberto} = \frac{\text{Parâmetro no braço aberto} \times 100}{\text{Soma do parâmetro nos braços aberto e fechado}}$$

Figura 5 – Labirinto em cruz elevado



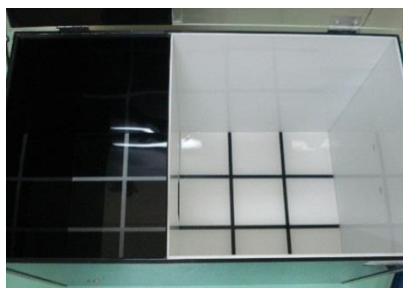
Fonte: Foto do arquivo do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais – ICB/UFG.

5.5.2 Caixa Claro/Escuro

A caixa claro/escuro é composta por uma arena em acrílico dividida em dois compartimentos: um claro e um escuro, separados por uma placa com uma abertura localizada ao nível do chão no centro da divisão (Figura 6).

Os animais ($n = 9$ por grupo) serão tratados pela via oral com a solução veículo 10 mL/kg, substância teste ou com diazepam 1 mg/kg. Após 60 minutos dos tratamentos, os animais serão colocados individualmente no centro do compartimento claro com o focinho voltado para a abertura que dá acesso ao compartimento escuro, e durante 5 min. serão registrados o número de transições, com as quatro patas, entre os dois compartimentos e o tempo total de permanência no compartimento claro (CRAWLEY & GOODWIN, 1980).

Figura 6 – Caixa claro/escuro



Fonte: Foto do arquivo do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais – ICB/UFG.

5.6. Avaliação da atividade gastroprotetora no modelo de lesões gástricas induzidas:

5.6.1. Lesões gástricas induzidas por indometacina:

Será administrado por via oral (vo), em diferentes grupos de camundongos ($n=8$) em jejum de sólidos por 16 horas com acesso livre a água contendo 5% de glicose, o veículo 10 mL/kg, substância teste ou ranitidina 50 mg/kg. Após uma hora será administrado via subcutânea (sc) a indometacina 30 mg/kg. Após três horas da administração do agente lesivo, serão repetidos todos os tratamentos. Seis horas após a administração da indometacina, os animais serão submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. O abdômen será aberto, o estômago localizado, removido, lavado externamente e aberto ao longo da pequena curvatura. O conteúdo gástrico será desprezado e a mucosa lavada delicadamente com salina. Os estômagos serão mantidos em béquer com salina gelada até a inspeção em estereoscópico. O índice de lesões será determinado segundo protocolo pré-estabelecido (Quadro 1) adaptado da tabela proposta por Macaúbas et al. 1988.

Quadro 1: Ficha de avaliação e pontuação das lesões gástricas adaptado da proposta descrita por Macaúbas et al.(1988).

AVALIAÇÃO DE LESÕES GÁSTRICAS AGUDAS																				
Animal:.....Sexo:.....Idade:.....Data:...../...../.....																				
Responsável:..... Agente indutor:.....																				
Droga de teste:.....																				
ÍNDICE DE LESÃO																				
Tratamento	Nº	Cor		Pregas	Petéquias			Edemas			Hemorragias			Mucos			Úlceras		Nº úlceras	Índice
		H/D	N/P		L	M	IS	L	M	I	L	M	I	L	M	I	<1mm	>1mm		
		1	0/1		1	2		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	1.5		
N = normal D = descorado L = leve M = moderado I = intenso H = hiperêmica P = perda de pregas																				
Observações:.....																				
.....																				

5.6.2 Lesões gástricas induzidas por etanol 75%:

Será administrado por via oral em diferentes grupos de camundongos (n= 6 e 8) em jejum de 16 horas com acesso livre a água contendo 5% de glicose, veículo 10mL/kg, substância teste ou ranitidina 50 mg/kg. Após uma hora dos tratamentos, será administrado o agente lesivo (etanol 75%, 10 mL/kg, v.o.). Trinta minutos após a administração do etanol os animais serão eutanasiados em câmara de CO₂. O abdômen aberto, o estômago será localizado, removido, lavado externamente e aberto ao longo da pequena curvatura. O conteúdo gástrico será desprezado e lavado delicadamente a mucosa com salina. Os estômagos serão mantidos em béquer com salina gelada até a inspeção em estereoscópio.

Neste procedimento, os estômagos serão fotografados e a avaliação das lesões feita através de um software, com a medição da área total dos estômagos e da área ulcerada. A área ulcerada será expressa em percentagem.

5.6.3 Quantificação do muco gástrico:

Após a avaliação das lesões induzidas por etanol 75%, o fundo e o antro do estômago serão retirados e a parte glandular dividida em duas. Uma parte da mucosa gástrica (com peso exato determinado) será incubada em 10 mL de solução de Alcian Blue 0,1%, onde permanecerá corando por 2 horas. O excesso de Alcian Blue será removido com sacarose 0,25 mol/L (serão realizadas duas lavagens sucessivas, a primeira por 15 minutos e a segunda durante 45 minutos). O corante complexado com o muco da parede glandular será extraído com 5 mL de cloreto de magnésio (0,5 mol/L), agitando-se intermitentemente cada segmento por 1 minuto a cada 30 minutos durante 2 horas. Deverá ser misturado 4mL da solução sobrenadante azul obtida com 4 mL de éter etílico e agitado vigorosamente até a formar uma emulsão. A seguir, será centrifugado a 3600 rpm por 10 minutos para separar a fase aquosa, descartando o resíduo. A concentração de Alcian Blue nas amostras será determinada por leitura espectrofotométrica a 598 nm. A concentração de Alcian Blue ligado ao muco será determinada por interpolação na curva padrão do corante e expressa em µg de Alcian Blue/mL/g de tecido.

5.6.4 Determinação do papel dos receptores adrenérgicos alfa 2 (α_2) na gastroproteção:

Um grupo de animais (n= 6 e 8) será colocado em jejum por 16 horas, sendo em seguida divididos em 3 grupos, onde um grupo receberá injeção subcutânea de ioimbina, antagonista do receptor adrenérgico α_2 , enquanto os outros dois grupos receberão salina pela mesma via. Após 30 minutos, os grupos receberão por via oral os respectivos tratamentos com veículo 10 mL/kg, substância teste ou clonidina 0,2 mg/kg pela via intraperitoneal. Após 60 minutos, os animais serão tratados por via oral com etanol 75% 10 mL/kg. Os animais serão submetidos à eutanásia após 30 minutos, sendo o conteúdo gástrico desprezado, a mucosa lavada delicadamente com salina. Os estômagos serão mantidos em béquer com salina gelada até a inspeção em estereoscópio. Neste procedimento, os estômagos serão fotografados e a avaliação das lesões feita através de um software, com a medição da área total dos estômagos e da área ulcerada. A área ulcerada será expressa em percentagem.

6. Procedimentos

Determinação da atividade antioxidante:

Este método baseia-se na redução do radical livre estável 2.2-difenil-1-picrilidazila (DPPH). Serão preparadas soluções nas concentrações finais de 1, 3, 10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ de cada uma das amostras de EHEG em EtOH. Em 1,4 mL das amostras será adicionado 0,4 mL de solução DPPH 0,3 mM em EtOH. Após 30 minutos serão feitas as leituras das absorvâncias a 510 nm, onde o radical 2.2-difenil-1-picrilidazila (DPPH) apresenta máximo de absorção e mudanças na sua absorção são proporcionais a atividade antioxidante da amostra. Uma solução de DPPH (0,4 mL; 0,3mM) em EtOH (1 mL) será usada como controle. A quercetina será utilizada como controle positivo do teste. Serão calculadas a média dos percentuais da atividade antioxidante das amostras em cada uma das concentrações testadas.

6.1 Lesões gástricas induzidas por ligadura do piloro:

Um grupo de camundongos ($n= 8$) será mantido em jejum de 16 horas com acesso livre a água contendo 5% glicose e em seguida serão anestesiados com éter etílico e colocados em decúbito dorsal em uma placa de cortiça. Através de uma incisão de cerca de 2 cm no abdômen, o estômago será localizado e feita a ligadura do piloro com fio de algodão. Por via intraduodenal (i.d.), os animais receberão veículo 10mL/kg, substância teste ou ranitidina 50 mg/kg. A seguir, será suturada a parede abdominal e quatro horas após a cirurgia, os animais serão submetidos à eutanásia em câmara de CO_2 e seus estômagos removidos, lavados e secos em gase e mantido em béquer com salina gelada. Depois de abertos ao longo da curvatura menor, os conteúdos gástricos serão desprezados e as mucosas lavadas delicadamente com salina. Os estômagos serão mantidos em béquer com salina gelada até a inspeção em estereoscópio. O índice de lesões será determinado como no item 4.8.1.

6.2 Lesões gástricas induzidas por ácido acético:

Diferentes grupos de camundongos (n= 9 e 7) serão submetidos a uma dieta alimentar (fornecimento de ração: 9:00h - 10:00h e 15:00h - 16:00h) e água *ad libitum* durante três dias antes da cirurgia.

Os animais serão anestesiados com éter etílico e será realizada a laparotomia. Após exposição do estômago, serão injetados 50 µL de ácido acético 20% ou 50 µL de salina 0,9% na subserosa da parede gástrica anterior. O estômago será lavado externamente com salina 0,9% e suturada a parede abdominal. Após a recuperação da anestesia, os animais serão retornados ao biotério e continuarão sob regime de restrição alimentar com consumo livre de água. Os tratamentos com veículo 10 mL/kg, substância teste ou ranitidina 50 mg/kg serão iniciados no dia após a cirurgia e será realizado durante os 7 dias seguintes, 30 minutos após o fim do consumo de ração. Ao final dos tratamentos, os animais serão submetidos à eutanásia em câmara de CO₂, os estômagos serão removidos e retirados para análise macroscópica das lesões (mm²).

6.3 Avaliação dos parâmetros da Secreção Gástrica Ácida:

Um grupos de camundongos (n=8) será submetido ao mesmo procedimento para ligadura do piloro (idem 4.12.). Após a eutanasia em câmara de CO₂, os estômagos serão removidos após pinçamento do esôfago para evitar perda do material secretado, o órgão será lavado com água, secado com gaze e mantido em béquer sobre placa de gelo, depois aberto ao longo da curvatura menor. A mucosa será lavada individualmente com 2 mL de água destilada, recolhendo-se o suco gástrico e o lavado em tubos de ensaios para centrifugação (1500 r.p.m. durante 30 minutos).

6.4 Volume de Secreção Gástrica:

O sobrenadante do suco gástrico será transferido para uma proveta e medido o volume (mL).

6.5 Determinação da acidez livre (pH) da Secreção Gástrica:

Os volumes obtidos de cada estômago serão completados para 10 mL com água destilada e foram determinadas a acidez livre (pH) em pHmetro.

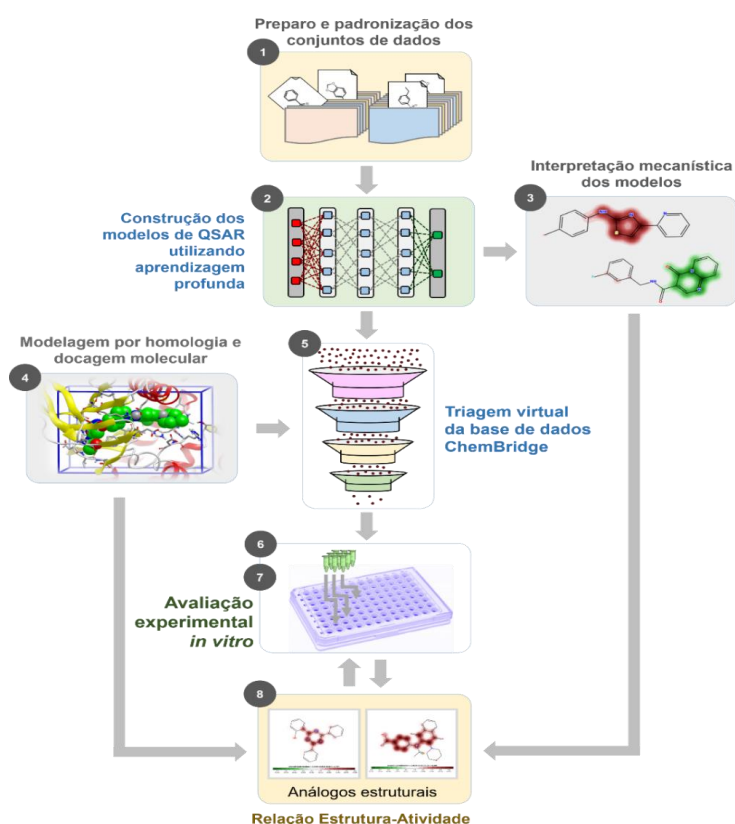
6.6 Determinação da acidez total da Secreção Gástrica:

A acidez total ($\text{mEq}\{\text{H}^+\}/\text{L}/4\text{h}$) de cada conteúdo estomacal será determinada através de titulação com NaOH 0,01N, utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base.

6.7 Estratégias *in silico* para o planejamento de novos fármaco

Os estudos propostos se baseiam em vários aspectos importantes do processo de P&D de novos fármacos na indústria e academia, que serão contemplados através de colaborações estabelecidas com diversos grupos de pesquisa, o que permitirá a identificação de novos protótipos eficazes contra atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. O fluxograma geral da metodologia a ser executada nesta proposta está representado na Figura 7.

Figura 7. Fluxograma geral da metodologia a ser utilizada. Os círculos enumerados contemplam os objetivos específicos (metas) desta proposta.



7. Métodos Computacionais

Duas abordagens integradas de CADD serão utilizadas para a execução desta proposta, planejamento baseado na estrutura de ligantes conhecidos (LBDD, do inglês *Ligand-Based Drug Design*) e planejamento baseado na estrutura 3D de alvos macromoleculares (SBDD, do inglês *Structure-Based Drug Design*).

7.1 Abordagem LBDD

Nesta etapa, modelos de QSAR (atividade biológica em COX E LOX), QSPR (propriedades farmacocinéticas) ou QSTR (propriedades toxicológicas) categóricos e contínuos serão construídos obedecendo as melhores práticas para a modelagem preditiva e as recomendações da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico ou Económico (OCDE).

7.2 Conjuntos de dados

Inicialmente, todos os compostos com propriedades biológicas anti-inflamatória e antinociceptiva experimentais serão extraídos das bases de dados ChEMBL GAULTON et al., 2011) e PubChem (WANG et al., 2011).

7.3 Preparo e padronização dos conjuntos de dados

Todas as estruturas químicas serão cuidadosamente padronizadas de acordo com o protocolo estabelecido por Fourches e colaboradores (ALVES et al., 2015; FOURCHES; MURATOV; TROPSHA, 2015). Brevemente, hidrogênios explícitos serão adicionados enquanto polímeros, sais, metais, compostos organometálicos e misturas serão removidos. Em paralelo, quimiotipos específicos como anéis aromáticos e grupos nitro serão normalizados. Todas estas etapas serão realizadas utilizando o programa Standardizer v.16.9.5.0 (<http://www.chemaxon.com>). Em seguida, todos os conjuntos de dados serão preparados seguindo os seguintes critérios:

- *Modelos categóricos:* (i) um limiar de atividade/toxicidade será estabelecido para classificar os compostos como ativos e inativos ou tóxicos e não tóxicos; (ii) duplicatas com propriedades biológicas discordantes serão excluídas; (iii) duplicatas com propriedades biológicas concordantes terão uma de suas entradas mantida no conjunto de dados e as demais excluídas; e (iv) conjuntos de dados com classes de tamanhos diferentes serão balanceados utilizando uma estratégia de sub-amostragem desenvolvida pelo nosso grupo (NEVES et al., 2016).
- *Modelos contínuos:* (i) todos os valores de propriedade biológica serão convertidos para a unidade logarítmica negativa ($-\log$); (ii) se as duplicatas apresentarem potências com diferença maior que 0,3 unidades logarítmicas, todas as entradas serão excluídas; e (iii) se a diferença das potências reportadas for inferior a 0,3 unidades logarítmicas, uma média dos valores será calculada entre as duplicatas e uma entrada será mantida no conjunto de dados.

7.4 Descritores moleculares

Impressões digitais moleculares (descritores) circulares do tipo Morgan (ECFP) e FeatMorgan (FCFP) serão calculadas no programa de código aberto RDKit (<http://www.rdkit.org>) e executado em Python v.3.6 (<https://www.python.org>). Ambas as impressões digitais serão geradas com raio variando entre 2–6 e com comprimento de até 2.048 *bits*.

7.5 Aprendizagem profunda

Modelos de QSAR, QSPR e QSTR categóricos e contínuos serão desenvolvidos utilizando os pacotes Keras v.2.2.2 (<https://keras.io>) e Tensorflow v.1.0 (www.tensorflow.org). As redes neurais do tipo *multilayer perceptron* serão construídas utilizando 5 camadas ocultas, função de ativação (ReLU), e os otimizadores Adam (para modelos categóricos) e SGD (modelos contínuos).

As funções de perda “categorical_crossentropy” e “mse” serão utilizadas para calcular a qualidade das previsões obtidas a partir dos modelos categóricos e contínuos, respectivamente, ao passo que as métricas “precisão” e “erro absoluto médio” serão utilizadas como parâmetros de avaliação do desempenho de.

Ao final do processo de construção das redes, um *grid* construído utilizando o pacote scikit-learn v.0.19.2 (<http://scikit-learn.org/>) será utilizado para otimizar os seguintes parâmetros: número de épocas (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100) e tamanho de lote (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100). Todos os cálculos computacionais serão conduzidos utilizando GPUs Titan Xp doadas pelo programa de desenvolvedores da NVIDIA.

7.6 Validação cruzada externa de 10-folds

Os conjuntos de dados preparados serão divididos aleatoriamente em dez subconjuntos de igual tamanho. Então um desses subconjuntos (10% de todos os compostos) será considerado como conjunto teste e as demais partes juntas formarão o conjunto treinamento (90% do conjunto completo). Este procedimento será repetido dez vezes, permitindo que cada um dos dez subconjuntos seja usado como conjunto teste. Os modelos serão construídos utilizando apenas os conjuntos de treinamentos. É importante ressaltar que os compostos no conjunto teste momentâneo não serão utilizados para construir os modelos de QSAR (ALVES et al., 2015).

7.7 Avaliação de preditividade dos modelos

O desempenho preditivo dos modelos categóricos será avaliado utilizando a sensibilidade (SE, Equação 1), especificidade (SP, Equação 2), taxa de classificação correta (CCR, Equação 3), valor preditivo positivo (PPV, Equação 4) e valor preditivo negativo (NPV, Equação 5). Nas equações abaixo, VP e VN representam o número de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, respectivamente, enquanto FP e FN representam o número de falsos positivos e falsos negativos, respectivamente.

$$SE = \frac{VP}{VP + FN} \quad (1)$$

$$SP = \frac{VN}{VN + FP} \quad (2)$$

$$CCR = \frac{SE + SP}{2} \quad (3)$$

$$PPV = \frac{VP}{VP + FP} \quad (4)$$

$$NPV = \frac{VN}{VN + FN} \quad (5)$$

O desempenho preditivo dos modelos contínuos será avaliado utilizando o coeficiente de correlação (R^2 , Equação 6), erro quadrático médio de validação cruzada externa (RMSECV, Equação 7), erro absoluto médio (MAE, Equação 8) e coeficiente de correlação preditivo para o conjunto de teste (Q_{ext}^2 , Equação 9), nas quais Y_{obs} representa o valor experimental, Y_{pred} representa o valor predito, n_{treino} e n_{teste} são o número de compostos nos conjuntos treinamento e no teste, respectivamente, e \bar{Y}_{train} é a média dos valores experimentais do conjunto treinamento.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n_{teste}} (Y_{obs} - Y_{pred})^2}{\sum_{i=1}^{n_{teste}} (Y_{obs} - \bar{Y}_{treino})^2} \quad (6)$$

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{teste}} (Y_{obs} - Y_{pred})^2}{n_{teste}}} \quad (7)$$

$$MAE = \frac{\sum_{i=1}^{n_{teste}} |Y_{obs} - Y_{pred}|}{n_{teste}} \quad (8)$$

$$Q_{ext}^2 = 1 - \frac{[\sum_{i=1}^{n_{teste}} (Y_{obs} - Y_{pred})^2] / n_{teste}}{[\sum_{i=1}^{n_{teste}} (Y_{obs} - \bar{Y}_{train})^2] / n_{treino}} \quad (9)$$

i. Domínio de aplicabilidade (DA)

O DA será estimado com base na distância Euclidiana entre os compostos do conjunto treinamento momentâneo (definidos pela 5FECV) e de cada composto do conjunto teste momentâneo.

Na presente proposta, o DA será definido como um limiar de distância L_D (Equação 10) entre um composto submetido a uma predição e seu vizinho mais próximo no conjunto treinamento. Na equação abaixo, \bar{y} é a distância Euclidiana média de k vizinhos mais próximos dentro do conjunto treinamento, σ é o desvio padrão dessas distâncias Euclidianas e Z um parâmetro arbitrário para controlar o nível de significância. Se a distância de um composto exceder o limiar estabelecido, a predição será considerada como menos confiável (TROPSHA, 2010).

$$L_D = \bar{y} + Z\sigma \quad (10)$$

7.8 Abordagem SBDD

Estudos de dosagem molecular (*i.e.*, avaliação computacional do processo de complementaridade ligante e macromolécula) serão conduzidos para uma coleção de enzimas.

8. Estudos de dosagem molecular

Os estudos de dosagem molecular com as enzimas COX e LOX serão desenvolvidos utilizando os pacotes de programas OpenEye (<https://www.eyesopen.com>). Inicialmente, as estruturas químicas dos compostos serão padronizadas utilizando o programa utilizando o programa Standardizer. Em seguida, cerca de 1000 conformações serão geradas para cada composto usando o programa OMEGA v.2.5.1 (OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM).

Ao termino deste processo, cargas atômicas AM1-BCC serão calculadas para cada estrutura utilizando o programa QUACPAC versão 1.6.3 (OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM).

Em paralelo, caixas 3D serão construídas ao redor dos sítios ativos de cada um dos alvos selecionados utilizando o programa MakeReceptor v.3.2.0.2. No final, os estudos de docagem molecular serão conduzidos utilizando o programa FRED e função de pontuação ChemGauss4, ambos disponíveis no pacote OEDocking v.3.2.0 (OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM).

8.2 Triagem virtual

A descoberta e otimização de novos protótipos de fármacos anti-inflamatórios e antinociceptivos constitui um processo complexo que envolve o equilíbrio dinâmico entre potência, e propriedades farmacocinéticas e toxicológicas adequadas.

Portanto, todos os modelos computacionais propostos nas seções anteriores serão utilizados como filtros em triagens virtuais multiparamétricas de 1,1 milhão de compostos virtuais (Figura 4) disponibilizados comercialmente pela ChemBridge (<http://www.chembridge.com>).

Inicialmente, todos os compostos com potencial para agregação coloidal[24] e que possam modular de forma inespecífica a atividade enzimática (PAINS, do inglês *Pan-Assay Interference Compounds*) (BAELL; HOLLOWAY, 2010; IRWIN et al., 2015) serão removidos.

Além disso, filtros computacionais baseados propriedades físico-químicas serão utilizados para priorizar compostos com propriedades *lead-like* (OPREA et al., 2001). Em seguida, estudos de docagem molecular serão utilizados para selecionar os compostos com potencial atividade inibitória para as proteases e compreender o processo de complementaridade molecular dentro dos sítios ativos das enzimas.

As moléculas remanescentes serão então submetidas a uma filtragem multiparamétrica baseada nos modelos de QSAR, QSPR e QSTR categóricos e contínuos desenvolvidos, visando identificar *hits* farmacológicos com perfis farmacocinético e toxicológico aceitáveis. Ao final desta triagem, cerca de 100 *hits* virtuais serão adquiridos e submetidos a avaliação biológica experimental.

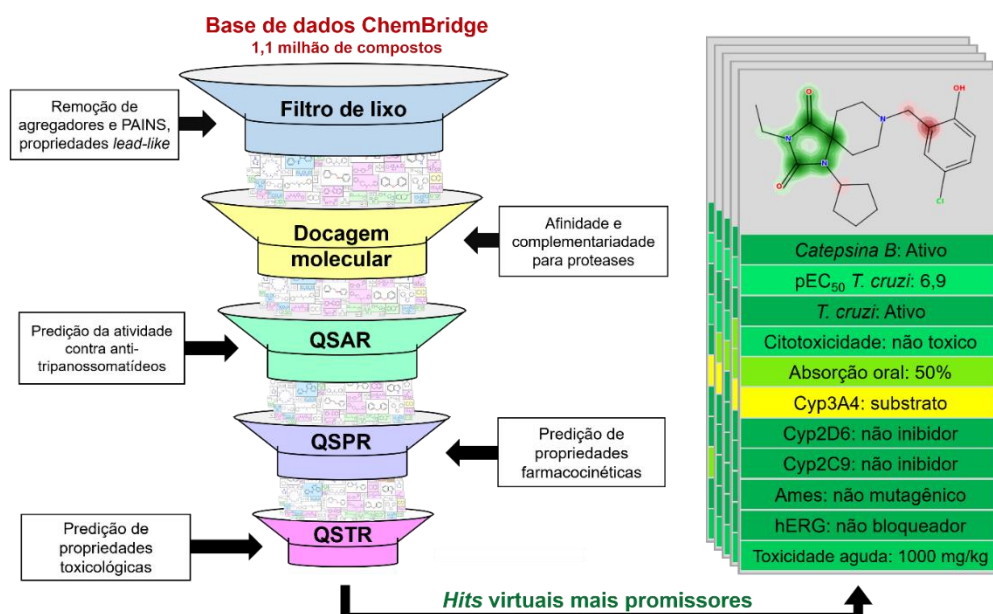


Figura 8. Fluxograma da triagem virtual multiparamétrica desta proposta.

9 Análise estatística

Os dados serão expressos como médias \pm erro padrão das médias em valores absolutos ou percentuais. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais serão detectadas pela Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey como pós-teste, quando analisado mais de dois grupos, ou teste de “t” de Student não pareado, quando analisados amostras independentes. As diferenças serão consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

**10. ORÇAMENTO PARA O LABORATÓRIO DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

CAPITAL - FAPEG

Itens	Quantidade	Valor (R\$)
1 pHmetro	2	3.306,00
2 Espectrofotômetro Uv Visível	1	2.395,00
3 Estufa de esterilização e secagem	2	8.600,00
4 Capela exaustão de gases	1	4.617,00
5 Destiladores de água	1	2.075,00
6 Dessecador a vácuo	2	2.088,00
7 Bomba de vácuo	2	4.872,00
8 Centrífuga de bancada refrigerada	1	46.230,00
9 Caixa de cirurgia completa c/32 itens	2	5.000,00
10 Computadores Samsung	2	6.000,00
11 Leitor de Elisa EPOCH2NS	1	60.000,00
12 Pipeta multicanal	2	4.000,00
13 Banho de órgão (amplificador de 4 canais para banho, sistema de aquisição de dados dataq, transdutores de força 20 gramas 0,003g resolução = 4 peças	1	36.800,00
14 Incubadora Shaker Refri 220V - NT 735	1	13.929,00
15 Pipetas	3	1.200,00
16 Placa de 96 poços	20	160,00
17 Cilindro de gás carbogênico 10 litros	1	200,00
18 Plestimômetro	1	9.750,00
19 Placa quente	1	5.590,00
20 Tail-flick	1	8.500,00
21 Banho Maria	1	2.740,00
22 Balança analítica	1	5.300,00

23	Agitador magnético com aquecimento	1	1.695,00
24	Agitador de tubo Vortex	1	1.190,00
25	Mini mesa oscilante	1	6.800,00
26	Osmose reversa	1	3.634,00
27	Vidraria		18.839,00
28	Fluxo laminar	1	23.000,00
29	Lavador de pipetas	1	1.638,00
30	Estojo esterilizador de pipeta 60x250 mm	1	1.762,00
31	Container MVE XC 20 litros Signature para Nitrogênio - ABS 20	1	3.490,00
32	Analizador de qualidade do ar	1	600,00
	Sub-total (2019)		296.000,00
33	HPLC	1	149.249,00
34	PCR Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	1	110.751,00
35	Espectrofotometro infravermelho com transformada de Fourier	1	56.000,00
	Sub-total (2020)		316.000,00
36	Microscopio Optico Binocular compolarizador e objetivas planas acromáticas acoplado com câmara digital	1	11.500,00
37	Balança Digital de alta precisão	1	7.300,00
38	Câmara climática de controle de temperatura e umidade	1	17.300,00
39	Refrigerador eletrolux	1	1.140,00
	Sub-total (2021)		37.240,00
40	Labirinto em cruz elevado	1	5.000,00
41	Campo aberto	1	3.500,00
42	Rota rod	1	3.000,00
43	Recipiente de natação forçada	1	2.000,00

44	Câmara de condicionamento operante	1	45.000,00
45	Sotwares e sensores de monitoramento por preferência de lugar	1	7.500,00
46	Instrumento estereostático	1	3.000,00
47	Computadores Samsung i9	2	7.927,15
		Sub-total (2022)	76.927,15
		Total (04 anos)	726.167,15

BOLSA - FAPEG

Item	Descrição	Quantidade	Valor
01	Bolsa Mestrado (10 meses)	03	R\$40.500,00
	Bolsa Mestrado (11 meses)	01	R\$14.850,00
		SubTotal	R\$55.350,00
		(2020)	
02	Bolsa Mestrado (12 meses)	04	R\$64.800,00
03		SubTotal	R\$64.800,00
		(2021)	
	Bolsa Mestrado (12 meses)	04	R\$64.800,00
		SubTotal	R\$64.800,00
		(2022)	
		Total	R\$184.950,00
		(04 anos)	

11. Referências:

AGRA, C.A.; DANTAS, I.C. Identificação das plantas medicinais indicadas pelos raizeiros e utilizadas pelas mulheres no combate a enfermidades do aparelho geniturinário na cidade de Campina Grande, PB. *Biofar: Revista de Biologia e Farmácia*, João Pessoa, v. 1, p. 1-13, 2007.

ALVES, V.M.; MURATOV, E.; FOURCHES, D.; STRICKLAND, J.; KLEINSTREUER, N.; ANDRADE, C.H.; TROPSHA, A. Predicting chemically-induced skin reactions. Part I: QSAR models of skin sensitization and their application to identify potentially hazardous compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, p. 262-272, 2015.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.*, v.21, n.2, p.205-35, 1973.

BAELL, J.B.; HOLLOWAY, G.A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem.*, 2010.

BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. *Revista Química Nova*. Rio de Janeiro, v.25, n. 6B, p.1172-1188, 2002.

BERKOWITZ, B.A. Avaliação Básica e Clínica de Novas Drogas. In: KATZUNG, B.G. *Farmacologia Básica & Clínica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap.5, p.53-61.

BRAGANÇA, A.L.R. Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar. Niterói: EDUFF, 1996.

BRASIL, Presidência da República. Decreto 5813 de 22 de junho de 2006 – Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasil, 2006.

CARLINI, E. A, BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: Metodologia laboratorial e comparação entre diazepam e clorobenzepam. *Rev. Assoc. Bras. Psiquiatr.*, v.1, n.1, p.25-31, 1979.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.J.P.S.P. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, p. 314-319, 2008.

CERA, T.P.; PANCOTE, C.G.; TOLEDO, L.G. Planejamento de fármacos. *Revista Cient. Unilago*, p. 137-148, 2012.

CLARK, G., KOESTER, A. G., PEARSON, D. W. Exploratory behavior in chronic disulfoton poisoning in mice. *Psychopharmacologia* v.20, n.2, p.169-71, 1971.

CRAWLEY, J. N. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* v.15, n.5, p.695-9, 1981.

DEBNATH, B.; AL-MAWSAWI, L.Q.; NEAMATI, N. Are we living in the end of the blockbuster drug era? *Drug News & Perspectives*, v. 23, n. 10, p. 670–684, 2010.

DUNHAM, N. W., MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological déficit in rats and mice. *J. Amer. Pharm. Assoc.*, v.46, n.3, p.208-10, 1957.

DUTRA, M.G. Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás. 2009. 112 f. Dissertação (Mestrado Multidisciplinar em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente) – Centro Universitário de Anápolis – UniEVANGÉLICA, Anápolis. 2009.

FOURCHES, D.; MURATOV, E.; TROPSHA, A. Curation of chemogenomics data. *Nat. Chem. Biol.*, p. 535-535, 2015.

FREITAS, A.V.L.; COELHO, M.F.B.; AZEVEDO, R.A.B.; MAIA, S.S.S. Os raizeiros e a comercialização de plantas medicinais em São Miguel, Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 147-156, 2012.

GURIB-FAKIM A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 2009.

HENDERSHOT L.C. and FORSARTH J. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and nonanalgesics. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 125: 237-240, 1959.

HUNSKAAR S. and HOLE K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30:103-114, 1987.

IRWIN, J.J.; DUAN, D.; TOROSYAN, H.; DOAK, A.K.; ZIEBART, K.T.; STERLING, T.; TUMANIAN, G.; SHOICHET, B.K. An Aggregation Advisor for Ligand Discovery. *J Med Chem*, 2015.

LI, Y.; OHIZUMI, Y. Search for constituents with neurotrophic factor-potentiating activity from the medicinal plants of Paraguay and Thailand. *Yakugaku Zasshi*, p. 417-424, 2004.

LISTER, R. G. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, v.92, n.2, p.180-5, 1987.

LOMBARDINO, J.G.; LOWE, J.A. The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now. *Nature Reviews. Drug Discovery*, p. 853–862, 2004.

MACAÚBAS, C. I. P.; OLIVEIRA, M. G. M.; FORMIGONI, M. L. O. S.; SILVEIRA-FILHO, N.G.; CARLINI, E.A. Estudo da eventual ação anti-úlceras gástrica do bálsamo (*Sedum* sp.); folha-da-fortuna (*Bryophyllum calycinum*), couve (*Brassica oleraceae*) e da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) em ratos. In: Estudo de ação anti-úlceras gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “Espinheira-santa” e outras), Central de Medicamentos CEME, Ministério da Saúde, p. 5 - 20, 1988.

MALONE, M. H. Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. In: Wagner H, Wolf P, editors. *New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*. Berlin: Springer – Verlag; 1977. p. 24-53.

MULLARD, A. New drugs cost US\$2.6 billion to develop. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 13, n. 12, p. 877–877, 2014.

MURRAY C.W., PORRECA F., COWAN A. Methodological refinements of the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. *J Pharmacol Meth*, v.20, p. 175-86, 1988.

OPREA, T.I.; DAVIS, A.M.; TEAGUE, S.J.; LEESON, P.D. Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective. *J. Chem. Inf. Comput. Sci*, 2001.

PALMEIRA FILHO, P. L.; PAN, S. S. K. Cadeia farmacêutica no Brasil: avaliação preliminar e perspectivas. *BNDES Setorial*. Rio de Janeiro, v.1, n.18, p.3-22, 2003.

PARENTE, C.E.T.; ROSA, M.M.T. Plantas comercializadas como medicinais no município de Barra do Pirai, RJ. *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v. 52, n. 80, p. 47-59, 2001.

PASSOS, G.F. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *Journal of Ethnopharmacology* 110: 323–333, 2007.

PHARMA. Medicines in Development Arthritis – A Report on Arthritis and Related Musculoskeletal Diseases. 2014.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, Glasgow, v. 39, p. 603-613, 2001.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, Glasgow, v. 39, p. 603-613, 2001.

SALEH, T. S. F, CALIXTO, J. B, MEDEIROS, Y. S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*; 20(8):949-56,1999.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G. Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, p. 301-332, 2001.

SHIOMI, K.; KAZAMA, A.; SHIMAKURA, K. e NAGASHIMA, Y. Purification and properties of phospholipases A2 from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*). *Venom toxicon*, v. 36, n. 4, pp. 589-599, 1998.

SIEGEL, P. S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. *J. Psychol.*, v.21, p.227-36, 1946.

SILVA, T.F. Abordagens da Química Medicinal para o Planejamento de Protótipos de Fármacos. *Rev. Virtual Quim*, p. 921-933, 2013.

TROPSHA, A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Mol. Inform*, 2010.

VACHER, P.J.; DUCHÉNE-MARULLAZ, P.; BARBOT, P. A propos de quelques produits usuels - comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. *Med. Exp.*, v. 11, p. 51-58, 1964.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WANG, Y.; XIAO, J.; SUZEK, T.O.; ZHANG, J.; WANG, J.; ZHOU, Z.; HAN, L.; KARAPETYAN, K.; DRACHEVA, S.; SHOEMAKER, B.A.; BOLTON, E.; GINDULYTE, A.; BRYANT, S.H. PubChem's BioAssay Database. Nucleic Acids Res, 2012.

ZANINI J.C.Jr., MEDEIROS Y.S., CRUZ A.B., YUNES R.R. A. and CALIXTO J.B. – Action of compounds from *Mandevilla velutina* on croton oil-Induced ear oedema in Mice. A comparative study with steroidal and nonsteroidal antiinflammatory Drugs. *Phytotherapy Research*, 6(1): 01-05, 1992.

Projeto 3

Estudo da viabilidade econômico ambiental da implantação de micro usinas fotovoltaicas no nordeste goiano - FOTOVOLT.

Prof. Lúcio Carlos Carvalho Bogian
PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Anápolis – GO, 2019

PROJETO 3

Estudo da viabilidade econômico ambiental da implantação de micro usinas fotovoltaicas no nordeste goiano – FOTOVOLT

1. OBJETIVO GERAL:

O objetivo deste projeto é dentre 14 municípios selecionados no nordeste goiano, por se encontrarem entre o mais baixo índice de desenvolvimento, determinar em ordem de impacto os que possuem maior potencial de melhoria desses indicadores com a implantação de micro usinas fotovoltaicas, considerando os aspectos ambientais, sociais e econômicos e ainda identificar e levantar indicadores relevantes para esse tipo de estudo, tanto nessa região quanto em outras regiões do Estado de Goiás.

De forma mais específica, a proposta busca ainda levantar quais critérios ambientais são relevantes na implantação da tecnologia fotovoltaica nas regiões propostas, elaborar um *Life Cycle Assessment* (LCA) da planta e compará-las com os índices socioeconômicos determinando assim os que se beneficiarão mais com a implantação desse recurso. Outro ponto importante que este estudo busca responder é qual o modelo de negócio ideal, no caso de parcerias para com o intuito de geração de renda no formato acima.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este projeto visa estimar os benefícios ambientais, sociais e econômicos através da implantação da micro usinas de geração de energia fotovoltaica e dessa forma substanciar possíveis investimentos no Centro Oeste. Inicialmente em 4 municípios do estado de Goiás (Rubiataba, Ceres, Jaraguá e Goianésia) onde a UniEVANGÉLICA tem Campi da mesma Mantenedora e oferecem cursos de Engenharia na região, para se estabelecer os indicadores relevantes para esse tipo de estudo e realizar o LCA, paralelamente se procederá no levantamento sócio econômico em 14 cidades do nordeste goiano, com dados secundários, para a seleção do município com maior potencial de impacto de implantação do projeto. Posteriormente, propõe-se a implantação de um projeto piloto com a instalação de micro usinas nos municípios selecionados.

No LCA objetiva-se ainda estabelecer qual o custo realizado com manutenções das plantas fotovoltaicas, não foi encontrado registro de estudos similares no Brasil Central, e estima-se que o impacto desses fatores de manutenção são relevantes para as políticas de investimento na área energética.

A literatura nessa área geralmente trata desses assuntos de forma separada, ou seja, alguns estudos são feitos sob o aspecto dos impactos ambientais e outros apenas dos aspectos econômicos. Por exemplo, Wolfram Lange desenvolveu um método para mapeamento de potencial de geração de energia dos telhados residenciais, no entanto os aspectos ambientais locais não foram incluídos (Lange, 2012). Em outra vertente, os estudos de LCA geralmente tratam dos tipos específicos de tecnologia fotovoltaica e apenas seus aspectos ambientais quanto à sua produção e descarte, em relação ao uso da matéria prima e sua transformação (Menoufi, Chemisana & Roseli, 2013; Hsu et al., 2012; Vishakh et al., 2014).

A hipótese levantada nesse projeto é de se encontrar formas alternativas de renda e de conservação ambiental, através da geração de energia renovável e economia circular. Acredita-se que municípios com alto potencial de geração fotovoltaica e baixos índices socioeconômicos seriam os mais impactados com essas alternativas, gerando maior efeito positivo nos aspectos sociais, econômicos e ambientais.

Para as famílias espera-se, entre outros, estimar os seguintes benefícios:

- Obtenção de uma alternativa de renda extra, sustentável por meio do recebimento de recursos decorrente da energia elétrica gerada em sua propriedade;
- Surgimento de senso responsabilidade nas famílias beneficiadas pelo projeto, pois serão capacitados para serem os encarregados de:
 - limpeza básica e manutenção da micro usina;
 - utilização do biodigestor e seus subprodutos;
 - pagamento por sua conta de internet;



- participação ativa no consórcio.
- Mudança de cultura e hábitos, incorporando ações fundamentadas na economia circular;
- Melhor gestão da renda familiar, absorvendo princípios por meio da capacitação;
- Redução de desperdício e geração de recursos adicionais por meio do gerenciamento do esgoto e descarte orgânico, gerando água reciclada, fertilizante e biogás;
- Inclusão digital;
- Utilização de novas tecnologias por meio do acesso a cursos e conhecimento – internet;

Para o município espera-se, entre outros, estimar os seguintes benefícios:

- Aumento do PIB;
- Melhoria na capacitação dos moradores do município;
- Possibilidade de iniciativas de economia circular, encabeçadas pelas famílias participantes do projeto;
- Redução no impacto ambiental, promovendo como consequência a conservação do Cerrado;
- Redução na emissão de CO₂;
- Melhoria nos indicadores sócio econômicos e ambientais.

Em outra vertente, identificou-se a necessidade de estudos na área de efeitos da implantação de geração de energia fotovoltaica para a fundamentação de investimentos no setor além da otimização de sua aplicação. Para a avaliação desse tipo de estudo identifica-se uma carência de indicadores relevantes e sistematizados. Propõe-se nesse estudo estabelecer uma matriz de indicadores que possa ser utilizada em análises similares.



A ideia de geração de renda com a exploração do potencial fotovoltaico é bastante disseminada, contudo com pouco ou nenhum acesso a pequenos produtores. A possibilidade de geração em consórcio se apresenta como uma alternativa viável. Contudo, torna-se necessário avaliar qual o modelo ideal até mesmo do ponto de vista jurídico para o sucesso de iniciativas com essa abordagem. Um roteiro estruturado de modelo de negócio é um dos produtos que esse estudo visa apresentar.

3. JUSTIFICATIVA

A importância da obtenção da energia em valor acessível para o desenvolvimento de um país e para o bem estar dos indivíduos é indiscutível. Assegurar o acesso universal à energia de forma confiável, sustentável, moderna e a preço razoável é o objetivo No. 7 dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (0135) definido pela ONU e que devem ser implementados por todos os países durante os próximos 15 anos, até 2030 (Brasil, 2015). De acordo com o World Energy Outlook 2015 (OEA, 2015), o nível e o padrão de atividade econômica e as mudanças demográficas serão determinantes sobre as novas tendências energéticas. O Produto Interno Bruto (PIB) mundial tende a subir 3.5% ao ano de 2013 a 2040 e a população mundial crescer de 7.1 bilhões em 2013 para 9 bilhões em 2040. Esse relatório prevê o aumento na utilização de tecnologias eficientes, renováveis e outros tipos de energia com baixa emissão de carbono. Aponta-se ainda para um aumento na demanda por energia na Ásia, América Latina, Oriente Médio, África e Índia.

Além da maior utilização da eficiência energética e da geração renovável como eólica e solar nesses continentes. Estima-se que até 2030, devido a políticas de apoio contínuo, a geração de energia por fontes renováveis responderá por metade da energia gerada, tomando-se a maior fonte energética do mundo.

O Acordo de Paris (ONU, 2015) foi aprovado para reduzir as emissões de gases de efeito estufa (GEE) no contexto do desenvolvimento sustentável. O compromisso ocorre no sentido de se envidar esforços para limitar o aumento da temperatura a 1,5°C acima dos níveis pré-industriais. O Brasil tem se movimentado no sentido de buscar parcerias para tecnologias de geração de energia renovável além da hidroelétrica.

Como exemplo disso Brasil e China assinaram uma declaração de ação conjunta sobre Mudança do Clima em maio de 2015, afirmando cooperação em pesquisa e desenvolvimento na área de geração de energia eólica e solar (Brasil, 2015). Nesse contexto, a INDC (*Intended Nationally Determined Contribution*) do Brasil, como resposta ao Acordo de Paris, prevê, entre outras ações para o horizonte de 2020, a redução no desflorestamento do cerrado e o uso de fontes alternativas de energia (Brasil, 2015).

Essas ações visam à redução da emissão de CO₂ e por consequência colaborar com a redução do aquecimento global. Conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE), o cerrado possui área de aproximadamente 203 milhões de hectares, constitui o segundo maior bioma da América do Sul e está presente em 21% do território brasileiro. O bioma ocupa todo o Distrito Federal, 97% do estado de Goiás, 91% do Tocantins, 65% do Maranhão, 61% do Mato Grosso do Sul e 51% de Minas Gerais, estando presente em outros seis estados. Reconhecido como a savana mais rica do mundo, o cerrado brasileiro possui enorme diversidade biológica ao contemplar os diversos ecossistemas uma flora com 11.627 espécies de plantas nativas e espécies endêmicas (Mendonça et al., 2008 apud: Matos & Felfili, 2010). A vegetação do cerrado é considerada a última fronteira agrícola do planeta (BORLAUG, 2002).

Segundo estimativas de 2002, 35% das áreas de cerrado já foram convertidas em pastagens cultivadas e em lavouras diversas (COUTINHO, 2002). Contudo, de acordo com dados mais recentes do projeto TerraClass (Brasil, 2015) a devastação atingiu em 2013 o patamar de mais de 40% do Cerrado brasileiro. Em Goiás restam aproximadamente 41% do bioma em estado natural. Conforme resultados do TerraClass, as maiores áreas do Cerrado concentram-se no Nordeste do estado de Goiás.

O Nordeste Goiano é definido pela Secretaria Estadual de Gestão e Planejamento do Governo do Estado de Goiás (SEGPLAN) como uma região de 20 Municípios. Esta região possui a maior concentração remanescente do Cerrado, compartilhando as suas delimitações, primordialmente, com pastagens.

Esse fator representa argumento relevante na escolha dessa região para o estudo proposto, uma vez que além ser uma área expressiva, ainda não sofre significativa ameaça da produção agrícola de grande porte (ex: soja), contudo já concorre com a pecuária.

Outro aspecto considerável baseia-se no fato de que segundo estudos do Sistema Estadual de informação do Governo de Goiás (figura 1), os municípios do nordeste do estado também estão elencados entre os menos desenvolvidos economicamente e socialmente. Acrescido a esses dados, reverbera-se que somadas as áreas de todos os municípios, a amostra possui vasto potencial de desenvolvimento sustentável e socioeconômico.

Na atualidade de acordo com o Instituto Mauro Borges (IMB) da SEGPLAN/GO, os Municípios do primeiro nível são os que possuem capacidade extremamente limitada de oferecer retorno mínimo aos investimentos realizados em áreas estratégicas ou em setores específicos.

Portanto, são municípios dependentes de assistência direta e constante. Além desses dados, faz-se pertinente notar que esta região possui alta incidência de luz solar. A energia solar é uma fonte promissora e o Brasil apresenta um mercado com grande potencial de crescimento, devido às condições climáticas favoráveis do país, com índices de radiação solar variando de 1500 a 2500 kWh/m² (Torres & Senna, 2013).

Na região do nordeste Goiano, as análises apontam para um grande potencial de geração, devido ao alto índice de radiação solar, na média de 5,61 kWh/m²/dia de acordo com a figura 2.

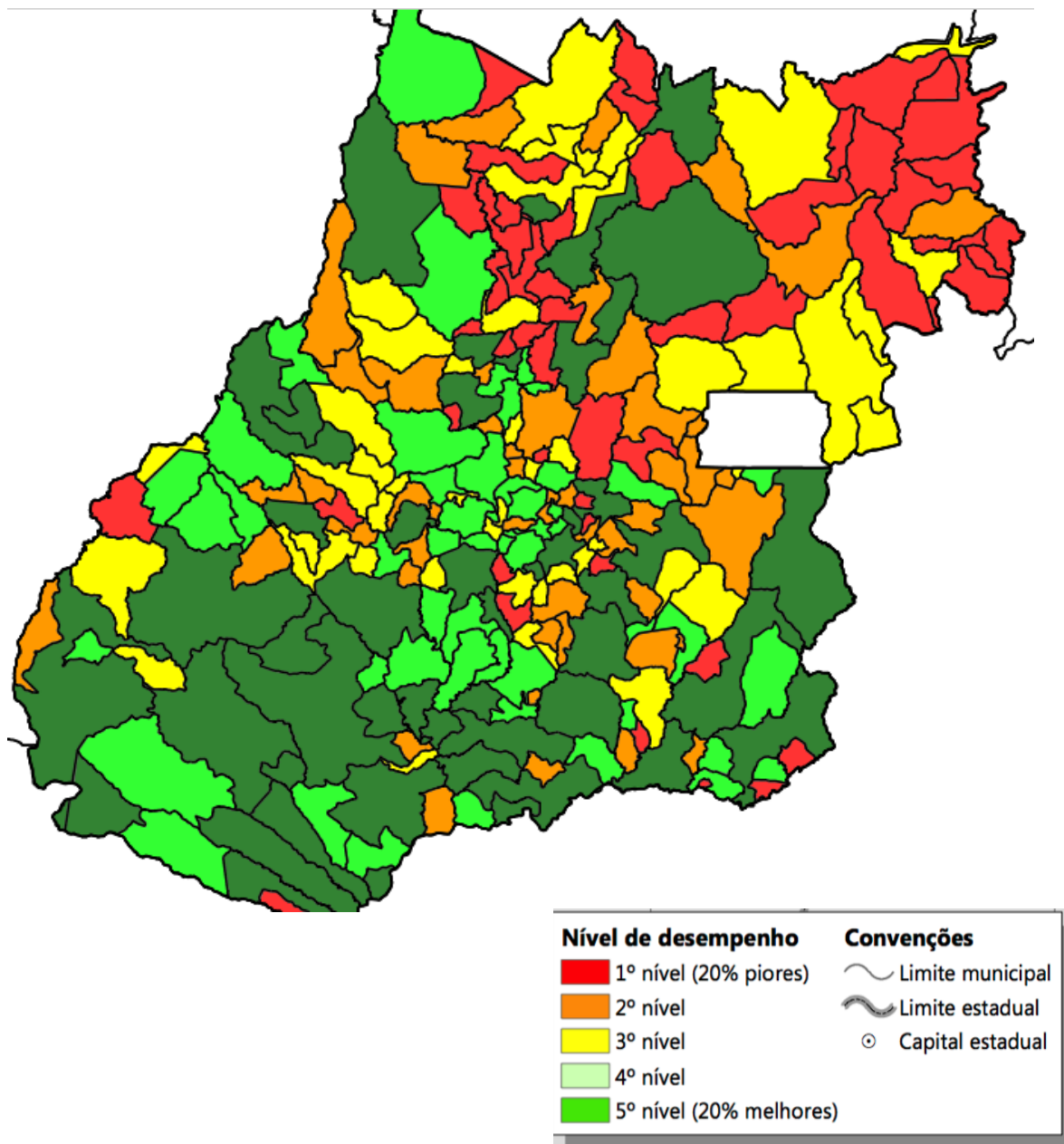
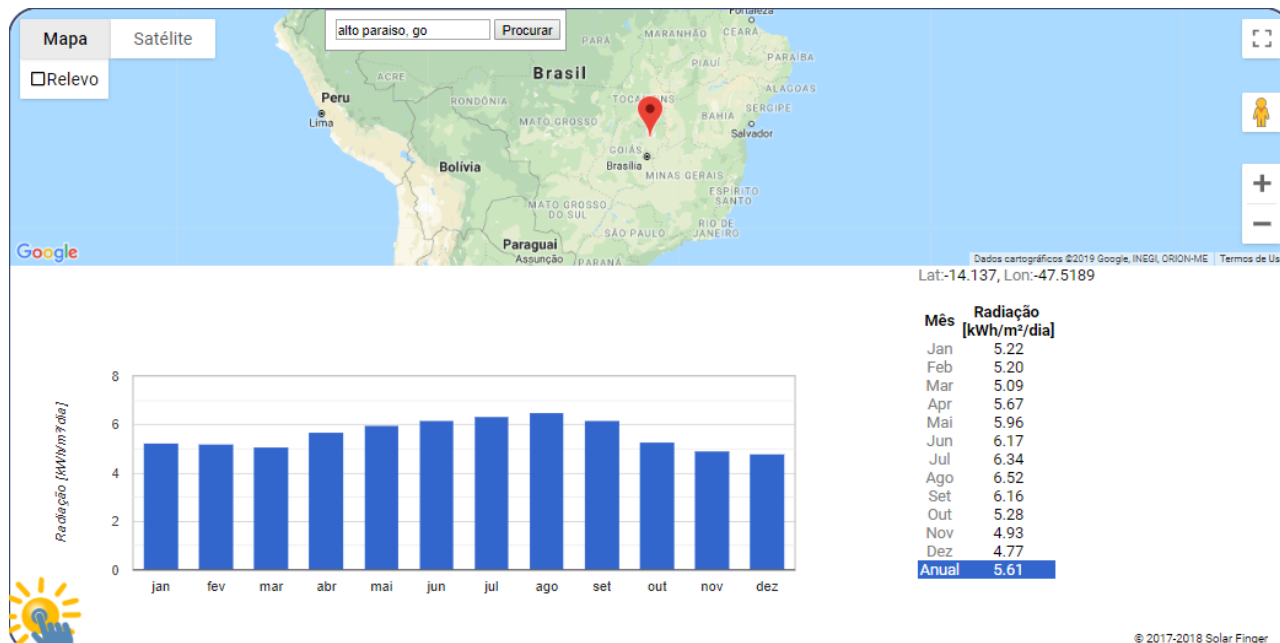


Figura 1. Nível de desempenho dos municípios goianos

Fonte: IMB-SEGPLAN/GO 2013 (adaptado).

Figura 2. Índice de radiação solar em Alto Paraíso - GO



Fonte: <https://solarfinger.com.br/radiacao-solar-no-brasil/>

Considerando esses dados e objetivando melhorias sociais, econômicas e ambientais, propõe-se nessa pesquisa o estudo e a viabilidade da implantação e geração de energia solar em 14 municípios do nordeste goiano. A geração de energia fotovoltaica pode trazer benefícios econômicos, sociais e ambientais para regiões de baixa renda que passam a ter uma commodity de baixo impacto ambiental para comercialização.

A incidência solar é um fator primordial na discussão da viabilidade de projetos de geração de energia solar. Essa região é muito beneficiada nesse aspecto. O nordeste goiano está em uma posição muito favorável em relação à radiação solar com média anual típica de radiação de 2.100 Wh/m², comparável com regiões da África e Austrália e muito superior à média da Alemanha (média de 1.100 Wh/m²), que é o maior produtor de energia por geração solar no mundo. De acordo com a Nota Técnica 19/14 do DEA (EPE, 2014) há vários impactos sociais e econômicos para consumidores e sociedade na implantação da geração fotovoltaica em municípios.

Ressalta-se, contudo, que a Nota Técnica acima não leva em consideração dois outros elementos relevantes: primeiramente, a possibilidade de comercialização do excedente de energia fotovoltaica produzida nas micro usinas, implicando em benefício econômico para os consumidores; em segundo lugar, as vantagens ambientais da implantação nas pequenas propriedades rurais, uma vez que contribui para a preservação do Cerrado.

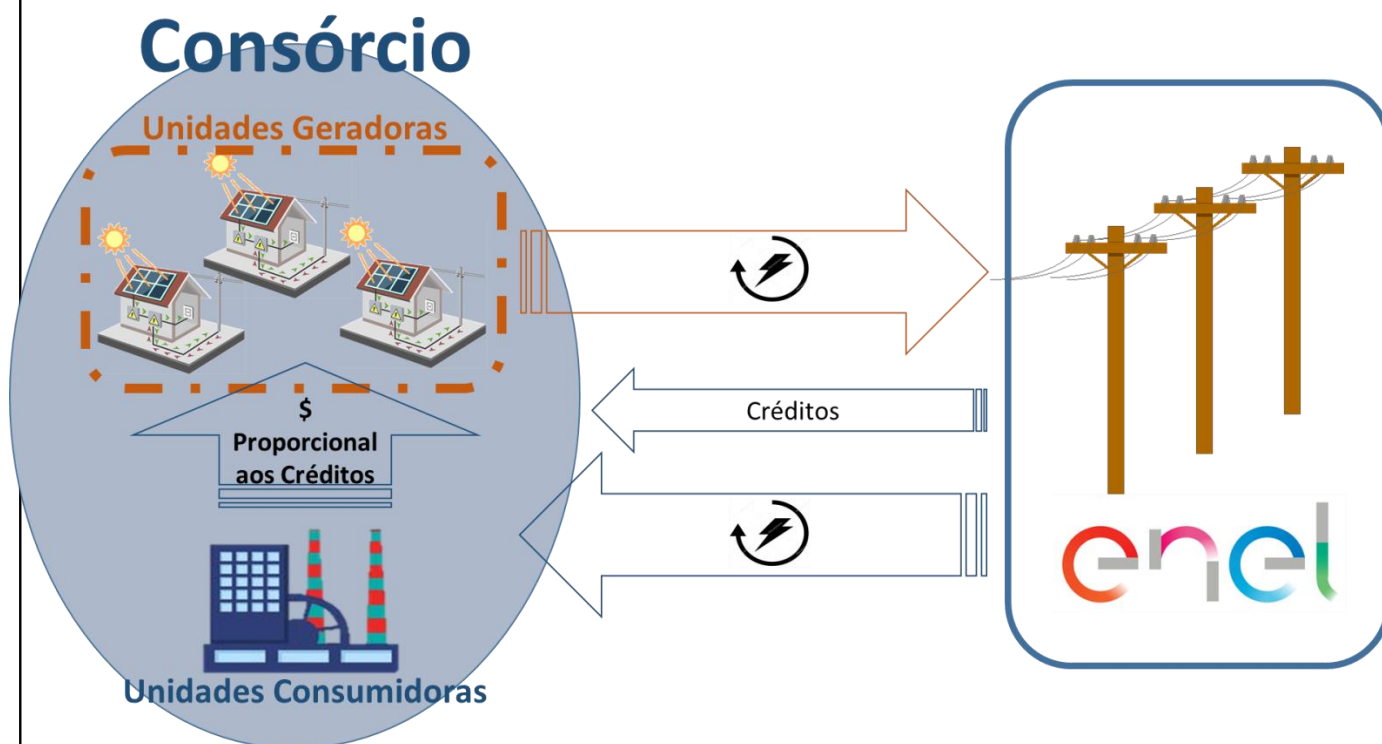
Apesar de ser chamada de energia limpa e estar sendo implantada em vários locais como alternativa a outras formas de geração, a geração fotovoltaica ainda é tratada como um investimento alto e de longo *payback*. Esse paradigma está sendo diminuído com a queda dos custos de produção de painéis fotovoltaicos e a melhoria do rendimento dos próprios painéis (Morgan et al., 2013). De acordo com a resolução 687 da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), a geração compartilhada de energia solar funciona como a transferência dos créditos excedentes entre propriedades em que a conta de luz esteja sobre o mesmo CPF/CNPJ ou CPF's/CNPJ's diferentes, desde que firmado em contrato.

Desta forma, podem-se transferir os créditos de energia para outra propriedade ou fazer isso através de cooperativas e consórcios de pessoas e empresas dentro da mesma área de cobertura da distribuidora de energia. Esse foi o formato idealizado nesse projeto para que se possa gerar renda para as famílias com a geração de energia. De forma simplista o fluxo da geração de renda depende da criação de um consórcio com unidades geradoras (no caso desse projeto, as unidades familiares) e unidades consumidoras (figura 3). As unidades geradoras injetarão energia na rede (*ongrid*) em nome do consórcio.

As unidades consumidoras consomem energia da rede. A operadora insere créditos em nome do consórcio, que serão utilizados pelas unidades consumidoras. As unidades consumidoras em operação interna do consórcio, “pagam” pelos créditos ao consórcio que, por sua vez, remunera as unidades geradoras na proporção da geração. Essa operação exige que o consórcio esteja bem organizado, administrativa e juridicamente e ainda que haja a participação das unidades consumidoras, empresas parceiras que encontrem nesse tipo de negócio um benefício econômico e/ou social. É necessário, no entanto, o estudo do “*roadmap*” indicado para esse tipo de parceria, como estabelecer, seus requisitos, etc.

Ao final do projeto propõe-se ter esse “roadmap” traçado podendo servir como referência para outras iniciativas nessa área ou similares.

Figura 3. Fluxos de geração de renda para as “Unidades Geradoras” do consórcio.



Em outra vertente, os estudos de LCA geralmente tratam dos tipos específicos de tecnologia fotovoltaica e apenas seus aspectos ambientais quanto à sua produção e descarte, em relação ao uso da matéria prima e sua transformação (Menoufi, Chemisana & Roseli, 2013; Hsu et al., 2012 ; Vishakh et al., 2014). Alguns estudos abordam o EPBT (*Energy PayBack Time*), que funciona como uma referência multi regional de retomo sobre o investimento (Peng, 2013), no entanto, para a realidade do Brasil, ficam algumas lacunas do ponto de vista de aplicação, por causa diferenças cambiais e valores de contas de energia.

Os indícios históricos apontam para o fato de que a devastação do cerrado tem sido uma consequência do crescimento econômico nas regiões em que está presente e que a atividade agropecuária é o principal elemento causador desta devastação.

Os benefícios de um projeto de geração fotovoltaica nessa região compreendem, mas não estão limitados a: preservação do bioma cerrado; redução do impacto ambiental pela introdução de uma atividade econômica ambientalmente adequada; compartilhamento com outras atividades produtivas de forma sustentável; requerimento de contrapartida na concessão de subsídios (plantio de árvores equivalente à emissão de CO₂; melhoria no desenvolvimento socioeconômico do município).

Essa argumentação foi manifestada nos estudos feitos durante as duas disciplinas cursadas no Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Recursos Naturais Do Cerrado - RENAC. Tanto nos estudos de Cienciometria quanto de Meta Análise fica evidente que há uma grande preocupação com a devastação do cerrado remanescente no Brasil e que as chamadas formas limpas de geração de energia são uma alternativa interessante na sua conservação de forma sustentável.

Este trabalho também poderá ser utilizado como referência para projetos de levantamento de investimentos na área de eficiência energética e financiamentos governamentais na região visando desenvolvimentos socioambientais. Um exemplo de programa de financiamento governamental é o Programa de Desenvolvimento Energético de Estados e Municípios - PRODEEM, instituído pelo Governo Federal, em dezembro de 1994, no âmbito da Secretaria de Energia do Ministério de Minas e Energia - MME, que já financiou mais de 8.000 projetos de sistemas energéticos (ANEEL, 2016).

A instalação destas unidades de usinas fotovoltaicas, com diferentes dimensionamentos servirá de suporte para o desenvolvimento de inúmeros projetos de pesquisa envolvendo alunos e professores pesquisadores da Instituição e de outras instituições federais (UFG) e estaduais (UEG, EMBRAPA). Atualmente, a IES tem uma extensa rede de colaboração técnico científica com várias instituições de ensino e pesquisa e desenvolvimento do Estado de Goiás. Destaca-se a importante parceria com ANEEL que participa na execução de uma pequena usina fotovoltaica no campus de Anápolis da UniEVANGÉLICA, fruto de um projeto de pesquisa aprovado em primeiro lugar que recebeu este investimento.

Portanto, é nossa intenção manter toda esta a infraestrutura montada aberta a parceiros para o desenvolvimento de novos estudos na área da energia limpa e de baixo custo.

Impactos previstos:

Este projeto também poderá ser utilizado como referência para outras propostas de levantamento de investimentos na área de eficiência energética e financiamentos governamentais na região visando desenvolvimento sócio ambiental. Um exemplo de programa de financiamento governamental é o Programa de Desenvolvimento Energético de Estados e Municípios - PRODEEM, instituído pelo Governo Federal, em dezembro de 1994, no âmbito da Secretaria de Energia do Ministério de Minas e Energia - MME, que já financiou mais de 8.000 projetos de sistemas energéticos (ANEEL, 2016).

A escolha da região reside no fato de que esta apresenta uma vasta extensão de cerrado que ainda não foi devastado, além de possuírem baixo índice de desenvolvimento econômico. E nesse ínterim, objetivando a melhoria socioeconômica da região, possivelmente, a atividade agropecuária representa atividade potencial nessas áreas, o que implicará em significativa redução do bioma Cerrado. Logo, a implantação e a viabilização da geração de energia fotovoltaica configura alternativa expressiva para a conservação e incremento econômico da região.

A análise do impacto econômico será realizada de forma análoga ao apresentado na Nota Técnica DEA 19/14 consistindo de informações sobre o consumo do município por unidade consumidora, viabilidade econômica da distribuidora, estimativa de crescimento de mercado e estimativa de adesão aos sistemas fotovoltaicos (EPE, 2014).

4. METODOLOGIA

A metodologia estabelecida para este projeto consiste da análise de dados de geração fotovoltaica na usina da UniEvangélica em conjunto com a análise de mais um laboratório de geração a ser implantado em Goianésia. Esses dois laboratórios permitirão a análise de dados de geração, manutenção e cruzamento de informações de natureza climática. Em conjunto com a análise de geração teremos as análises, sociais, econômicas e ambientais, além da jurídica relativa à criação do consórcio.



O Estado de Goiás possui 243 municípios (IBGE, 2016). A região nordeste do estado, conforme foi definida pela SEGPLAN/GO possui 20 municípios. Entre eles, 14 estão classificados como de 1º nível em desenvolvimento (o nível mais baixo).

A metodologia escolhida para o trabalho consiste na Avaliação Estratégica Ambiental (*Strategic Environmental Assessment - SEA*) da **implantação de usinas de geração fotovoltaicas nesses municípios**. A SEA é definida por como uma ferramenta de combinação de diferentes tipos de procedimentos analíticos em uma plataforma de avaliação (Finnveden, 2003).

A maioria dos estudos de Análise de Ciclo de Vida (*Life Cycle Assessment - LCA*) de painéis fotovoltaicos apontam um tempo de vida de 20 a 30 anos para os painéis e o Tempo de Retorno de Energia (*Energy PayBack Time - EPBT*) variando de 2 a 8 anos em média (Peng, 2013). Dessa forma, nesse estudo será adotado um horizonte de prospecção de 10 anos, abrangendo o EPBT estimado e dentro do tempo de meia vida dos painéis.

A plataforma de SEA proposta aqui é composta por 4 métodos complementares: (1) Estimativa de potencial de Geração Distribuída (GD) fotovoltaica residencial (Lange, 2012) adaptada neste caso para área residencial e rural; (2) *Life Cycle Analysis* dos modelos de painéis fotovoltaicos disponíveis no Brasil para a escolha da tecnologia mais indicada para a aplicação neste caso; (3) Análise do impacto econômico (custos e benefícios) da inserção da geração fotovoltaica nesses municípios utilizando a metodologia proposta na Nota Técnica DEA 19/14 (EPE, 2014); e (4) Indicadores de sustentabilidade ambiental das soluções aplicadas nos 14 municípios.

O estudo do potencial fotovoltaico desenvolvido por Lange (Lange, 2012) é descrito sucintamente a seguir, com adaptações específicas para este estudo. Os dados básicos são o levantamento da irradiação solar da área com os dados do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), o censo demográfico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e dados da SEGPLAN/GO. A unidade básica de análise é o setor censitário do IBGE, mas no caso desse estudo, incluindo as unidades da zona rural, inclusive área disponível sem prejuízo ambiental.

As etapas do trabalho são: (1) atribuição da camada de irradiação solar a cada unidade censitária utilizando ferramentas de sobreposição de camadas geográficas (ex.: ArcGis); (2) As áreas disponíveis para instalações são calculadas e então estima-se as áreas aproveitáveis (área de telhado na zona urbana / espaços limpos não aproveitados na zona rural) esses valores são então utilizados no cálculo da energia total solar aproveitável; (3) nessa etapa final os valores são agregados por municípios para a obtenção dos valores referentes a essas unidades territoriais.

De acordo com o padrão da *International Organization for Standardization* (ISO) o *Life Cycle Analysis* – é dividido em 4 fases: (1) definição de objetivo e escopo; (2) quantificação e identificação do material; (3) análise da magnitude do impacto ambiental e; (4) interpretação dos resultados (Finnveden, 2003). Os principais índices a serem levantados nessa etapa são: eficiência do módulo, tempo estimado de vida, EPBT, emissão de CO₂, taxa de desempenho e tempo de payback.

A análise do impacto econômico será realizada de forma análoga ao apresentado na Nota Técnica DEA 19/14 consistindo de informações sobre o consumo do município por unidade consumidora, viabilidade econômica da distribuidora, estimativa de crescimento de mercado e estimativa de adesão aos sistemas fotovoltaicos (EPE, 2014). Como resultados espera-se uma estimativa de evolução de mercado de sistemas fotovoltaicos num intervalo de 10 anos.

A determinação dos indicadores de sustentabilidade ambiental pode ser feita usando vários vieses. A sustentabilidade pode ser definida com métodos biológicos, econômicos e sociológicos (Basiago, 1995). Nesse estudo, os três aspectos serão tratados, com a reformulação do fator biológico colocando seu enfoque nos aspectos ambientais. Os indicadores servem também como uma ferramenta para medir e avaliar as consequências das atividades antrópicas no sistema biológico (DANZ et al., 2005 apud: Kemerich, Ritter & Borba, 2014). A utilização dos indicadores culminará com o Índice de Sustentabilidade de cada município, que analisado em uma escala padrão contribuirá no escalonamento do impacto para os municípios (Kemerich, Ritter & Borba, 2014).

5. Metas e resultados esperados

Como resultados espera-se uma estimativa de evolução de mercado de sistemas fotovoltaicos num intervalo de 10 anos. A determinação dos indicadores de sustentabilidade ambiental pode ser feita usando vários vieses. A sustentabilidade pode ser definida com métodos biológicos, económicos e sociológicos (Basiago, 1995). Nesse estudo, os três aspectos serão tratados, com a reformulação do fator biológico colocando seu enfoque nos aspectos ambientais. Os indicadores servem também como uma ferramenta para medir e avaliar as consequências das atividades antrópicas no sistema biológico (DANZ et al., 2005 apud: Kemerich, Ritter & Borba, 2014).

A utilização dos indicadores culminará com o índice de Sustentabilidade de cada município, que analisado em uma escala padrão contribuirá no escalonamento do impacto para os municípios (Kemerich, Ritter & Borba, 2014).

A matriz de indicadores poderá ser utilizada para avaliar o resultado de iniciativas que possam ser implantadas na região e ainda como referência para estudos similares.

Com o objetivo de viabilização financeira de recursos para as famílias da região foi levantada como alternativa a criação do consórcio. O estabelecimento das bases legais de criação deste, sua documentação padrão e critérios torna-se importante não somente para essa iniciativa, mas também de outros projetos seja na área de geração de energia ou similares.

Espera-se ao final deste estudo ter um “roadmap” do modelo de negócio e implantação que possa ser difundido para outras abordagens.

Metas	Tempo de duração	Resultados esperados
Levantamento da incidência solar nas regiões determinadas	06 meses	Valor absoluto de incidência solar
Estimativa de potência GD FV residencial	12 meses	Potencial GD FV residencial gerado
LCA dos modelos de painéis disponíveis	06 meses	Opção por painéis solares
Aquisição e instalação de equipamentos de pesquisa para Usina Fotovoltáica existente	12 meses	Equipamentos adquiridos e instalados
Aquisição e instalação de 60% dos equipamentos nacionais e importados	06 meses	Equipamentos adquiridos e instalados
Aquisição e instalação de 40% dos equipamentos nacionais e mportados	06 meses	Equipamentos adquiridos e instalados
Testes e medições e ajustes necessários	12 meses	Geração de energia fotovoltaica, divulgação e disponibilização para a comunidade dos resultados
Análise do impacto econômico	36 meses	Impacto econômico proporcionado
Análise do modelo jurídico econômico ideal para o consórcio	36 meses	Modelo de negócio estabelecido
Definição de índices de sustentabilidade ambiental	36 meses	Índices de sustentabilidade ambiental
Cálculo dos índices de sustentabilidade	36 meses	Índices de sustentabilidade ambiental
Criação do ranking dos municípios	36 meses	Ranking dos municípios

6 Especificação dos produtos

A infraestrutura pretendida visa o fornecimento de material e mão de obra para a construção de uma micro usina solar fotovoltaica de 28,8kWp (geração pico). A instalação será feita em solo e aérea, ocupando espaço disponível.



Dimensionamento

A quantidade de energia produzível será calculada com base nos dados radiométricos, conforme as fontes ATLAS BRASILEIRO, o Atlas Solarimétrico do Brasil e utilizando os métodos de cálculo descritos nas normas.

Descrição do sistema

O sistema fotovoltaico será composto de geradores fotovoltaicos compostos de módulos fotovoltaicos e inversores. A potência nominal total é será em kWp para uma produção de determinados kWh por ano, distribuídos em quatro áreas distintas. A modalidade de conexão à rede de alimentação baixa tensão em trifásico com tensão fornecimento 220 V. Os valores de tensão variam conforme a temperatura de funcionamento (mínima, máxima e de regime) e estão dentro dos valores aceitáveis de funcionamento do inversor.

Cabeamento elétrico

O cabeamento elétrico será feito por meio de cabos condutores isolados, conforme a descrição abaixo:

- . Seção do condutor de cobre calculado de acordo com a norma IEC / NBR
- . Cabo tipo FG21, se a passagem de cabos for externa ou FG27 se a instalação for subterrânea.
- . Tipo NO7V-k se a instalação for para dutos em edifícios.

Quadro elétrico

. Quadro de campo lado corrente contínua. Será prevista a instalação de um quadro de CC em cada conversor para conexões em paralelo dos módulos, medidores e controle dos dados de entrada e saída em cada gerador fotovoltaico.

. Quadro de paralelo lado corrente alternada. Será prevista a instalação de um quadro de paralelo em alternada localizado depois dos conversores estáticos, para realização da medição e controle dos dados de saída do inversor. Dentro será adicionado o sistema de interface com a rede e o medidor da sociedade distribuidora Companhia Hidroelétrica São Patrício.

Verificações

O gerador atende às seguintes condições: Limites de tensão:

Tensão mínima V_n a $70,00\text{ °C}$ (429,1 V) maior do que V_{mpp} mínimo (360,0V)

Tensão máxima V_n a $-10,00\text{ °C}$ (587,1 V) inferior a V_{mpp} máx. (700,0 V)

Tensão a vazio V_o a $-10,00\text{ °C}$ (706,1 V) inferior a tensão má. do inversor (800,0 V)

Tensão a vazio V_o a $-10,00\text{ °C}$ (706,1 V) inferior a tensão máx. do inversor (1000,0 V)

Limites de corrente:

Corrente máxima de entrada relacionada a I_{sc} (261,5 A) inferior a corrente máxima do inversor (445,0 A)

Limites de potência:

Dimensionamento de potência (99,7%) compreendido entre 80,0% e 120,0%.

Todas as instalações seguirão todos os padrões normais e as normas técnicas de instalação elétrica de acordo com a ANEEL.

ORÇAMENTO PARA LABORATÓRIO FOTOVOLTAICO

CAPITAL - FAPEG

Item	Descrição	Quantidade	Valor
1	<i>Kits de 7,2kWp (incl. Cabos e quadros)</i>	1	27.964,00
		Sub-total (2020)	27.964,00
2	<i>Kits de 7,2kWp (incl. Cabos e quadros)</i>	1	27.964,00
		Sub-total (2021)	27.964,00
3	Estação meteorológica portátil para análise climatológica	2	25.000,00
4	Notebook AVELL A65-9MUV RTX -i91Tb	2	29.385,50
5	Software Arc Gis Georeferencimaneto	1	9.607,50
6	<i>Kits de 7,2kWp (incl. Cabos e quadros)</i>	1	27.964,00
7	Biodigestor residencial	4	9.600,00
		Sub-total (2022)	101.556,50
		Total (04 anos)	157.484,50

BOLSA - FAPEG

Item	Descrição	Quantidade	Valor
01	Bolsa Doutorado (2 meses)	01	R\$4.000,00
		SubTotal	R\$4.000,00
		(2019)	
02	Bolsa Mestrado (12 meses)	02	R\$32.400,00
03	Bolsa Doutorado (12 meses)	02	R\$48.000,00
04	Bolsa Pós-Doutorado (12meses)	01	R\$49.200,00
		SubTotal	R\$129.600,00
		(2020)	
05	Bolsa Mestrado (12 meses)	02	R\$32.400,00
06	Bolsa Doutorado (12 meses)	02	R\$48.000,00
07	Bolsa Pós-Doutorado (12meses)	01	R\$49.200,00
		SubTotal	R\$129.600,00
		(2021)	

08	Bolsa Mestrado (12 meses)	02	R\$32.400,00
09	Bolsa Doutorado (11 meses)	02	R\$44.000,00
10	Bolsa Pós-Doutorado (12meses)	01	R\$49.200,00
		SubTotal	R\$127.600,00
		(2022)	
		Total (4 anos)	R\$ 388.800,00

Referências bibliográficas:

ANEEL, 2016. Disponível em: <http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/energia_solar/3_4_2.htm>. Acessado em: 30/10/2016.

Basiago AD, 1995. Methods of defining 'sustainability'. Sustainable Development, 3:109-19

BRASIL, 2015. Ministério do Meio Ambiente. Pretendida contribuição nacionalmente determinada para consecução do objetivo da convenção-quadro das Nações Unidas sobre mudança do clima – Disponível em: <http://www.mma.gov.br/images/arquivos/clima/convencao/indc/BRASIL_iNDC_portugues.pdf>. Acessado em 10/10/2016.

BRASIL, 2015. Ministério das Relações Exteriores. Objetivos do Desenvolvimento Sustentável. Disponível em: <http://www.itamaraty.gov.br/images/ed_desenvsust/ODSportugues12fev2016.pdf>. Acessado em: 15/10/2016.

BRASIL, 2015. Ministério do Meio Ambiente. Declaração Conjunta Brasil China – Disponível em: <http://www.mma.gov.br/images/arquivos/clima/convencao/indc/Declaracao%20Conjunta_Brasil_China.pdf>. Acessado em: 11/10/2016.

BRASIL, 2015. Ministério do Meio Ambiente. Mapeamento do Uso e Cobertura do Cerrado: Projeto TerraClass 2013. Brasília: MMA – Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado/projeto-terraclass>>. Acessado em: 12/10/2016.

Cabral IS, Torres AC & Senna PR, 2013. Energia solar – análise comparativa entre Brasil e Alemanha. IV Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, Salvador. IBEAS – Instituto Brasileiro de Estudos Ambientais

EPE, 2014. NOTA TÉCNICA DEA 19/14 - Inserção da Geração Fotovoltaica Distribuída no Brasil – Condicionantes e Impactos. Rio de Janeiro: MME. Disponível em:

<<http://www.epe.gov.br>>. Acessado em: 10/10/2016.

Finnveden G et al., 2003. Strategic environmental assessment methodologies - applications within the energy sector. *Environmental Impact Assessment Review*. 23: 91–123.

Hsu DD et al., 2012. GHG Emissions for Crystalline Silicon PV. *Journal of Industrial Ecology*, 16: SI22-SI35

IBGE, 2016. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?coduf=52>>

IEA, 2015. *World Energy Outlook 2015*. Paris: OECD Publishing.

Kemerich PDC, Ritter LG, Borba WF, 2014. Indicadores de sustentabilidade ambiental: métodos e aplicações. *Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas – Remoa/UFMS*, 13 (5): 3723-3736

Lange W, 2012. Metodologia de mapeamento da área potencial de telhados de edificações residenciais no Brasil para fins de aproveitamento energético fotovoltaico. Empresa De Pesquisa Energética/Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH, estudo interno elaborado por meio da TerraGIS. Rio de Janeiro EPE/GIZ. Disponível em: <https://energypedia.info/images/4/40/Metodologia_de_mapeamento_da_área_potencial_d_e_telhados_residenciais_para_PV_no_Brasil.pdf>. Acessado em 10/10/2016.

Matos MQ & Felfili JM, 2010. Florística, fitossociologia e diversidade da vegetação arbórea nas matas de galeria do Parque Nacional de Sete Cidades (PNSC), Piauí, Brasil. *Acta bot. bras.* 24(2): 483-496.

Menoufi K, Chemisana D & Rosell JI, 2013. Life Cycle Assessment of a Building Integrated Concentrated Photovoltaic scheme. *Applied Energy*, 111:505-514.

Morgan B et al., 2013. Re-considering the economics of photovoltaic power. *Renewable Energy*, 53: 329-338.

ONU, 2015. Acordo de Paris. Paris – Disponível em: <http://www.mma.gov.br/images/arquivos/clima/convencao/indc/Acordo_Paris.pdf>. Acessado em: 17/10/2016.

Peng J et al., 2013. Review on life cycle assessment of energy payback and greenhouse gas emission of solar photovoltaic systems. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19: 255-274.

Vishakha B et al., 2014. Life Cycle Analysis of Solar PV System: A Review. *International Journal of Environmental Research and Development*, 4(2): 183-190.

Projeto 4

Acanthaceae do cerrado goiano: ocorrência, fitoquímica, potencial farmacológico e implicações para conservação.

Profa Dra Lucimar Pinheiro Rosseto
PESQUISADORA RESPONSÁVEL

Anápolis – GO, 2019

PROJETO 4

Acanthaceae do cerrado goiano: ocorrência, fitoquímica, potencial farmacológico e implicações para conservação.

RESUMO

Introdução: Cultivar plantas medicinais é uma prática desenvolvida pelo homem há milênios, para o tratamento, cura e/ou prevenção de diversas enfermidades. Dentre as espécies vegetais ainda inexploradas do bioma Cerrado, Acanthaceae, merece atenção por apresentar poucos estudos fitoquímicos e estes serem escassos para a Região Centro-Oeste. *Justicia thunbergioides* (Lindau), *Leonard* e *Justicia pectoralis* Jacq. (Acanthaceae) são espécies vegetais pertencentes ao bioma Cerrado, cujo gênero é conhecido por apresentar atividades anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiasmática, antitumoral, nefroprotetora, antidiabética, estrogênica, prostragênica, antidiarreica, antimutagênica, antioxidante e antidepressiva. Estudos de bioprospecção identificaram na *J. thunbergioides* a presença de heterosídeos antraquinônicos, cardioativos, saponínicos, alcaloides, flavonóides, cumarinas e taninos, sugerindo que esta espécie também apresenta atividade biológica. Já a espécie *J. pectoralis* já foi estudada demonstrando a ação de cumarina umbeliferona como agente anti-inflamatório e antioxidante. Objetivos: Este projeto tem por objetivo o uso da imagem hiperespectral para distinguir as espécies de *Justicia*, (*J. pectoralis*, *J. thunbergioides*, *J. goianienses*, *J. nodicaulis*), realizar o estudo fitoquímico e avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e toxicidade aguda dos extratos brutos de espécies vegetais do gênero *Justicia*. Materiais e método: A pesquisa é de natureza experimental qualitativa exploratória que será realizada na região de Anápolis-Goiás. A imagem hiperespectral de folhas secas e pulverizadas de espécies de *Justicia* serão obtidas utilizando-se equipamento SisuCHEMA que produz imagens no infravermelho de ondas curtas (Short Wave Infrared; SWIR). O estudo fitoquímico será realizado por meio de técnicas espectroscópicas e cromatográficas (cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas). Das folhas de *Justicia*

serão obtidos os extratos brutos (hexânico [HEX], diclorometânico [DC] e metanólico [ME]). A avaliação da atividade antioxidante dos extratos (HEX, DC e ME) de *Justicia* será realizada pelo método do DPPH (MELAGRAKI et al., 2009). Os testes de atividade antibacteriana com os extratos obtidos das folhas de *Justicia* serão realizados conforme metodologia realizada por Domingues e colaboradores (2018). Para a avaliação da atividade anti-inflamatória será utilizado o método de edema de orelha em camundongos Swiss, seguindo o método de Tubaro e colaboradores (1985) e o ensaio de toxicidade aguda será realizado sobre *Artemia salina* por meio da adaptação da metodologia de Meyer e colaboradores (1982) e sobre Zebrafish seguindo os procedimentos descritos na OECD de nº. 236 (2013). Os resultados esperados visam contribuir para a identificação de metabólitos secundários (especiais) e caracterização das atividades biológicas e segurança na utilização dos extratos das folhas de *Justicia* (Acanthaceae) pertencentes ao bioma Cerrado.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Metabólitos especiais. Atividade Biológica. *Justicia*. Acanthaceae.

Introdução:

A aquisição dos equipamentos elencados na proposta intitulada: “Inovação, Desenvolvimento e Sustentabilidade: Estreitamento entre Universidade e Setor Produtivo no Estado de Goiás” para o Laboratório de Pesquisa em Biodiversidade (LaPeBio) da UniEVANGÉLICA permitirá o fortalecimento da linha de pesquisa de Biodiversidade e Desenvolvimento Sustentável já existente no Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* Mestrado e Doutorado em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente (PPG STMA).

Além desta linha já existente será possível a criação de novas linhas de investigação, tais como, Biorremediação de compostos orgânicos, que contribuirão para a formação de mão-de-obra qualificada para gerar novos produtos tecnológicos, contribuindo para a inovação, desenvolvimento e sustentabilidade no Estado de Goiás. Neste sentido, entre os projetos de pesquisa que se encontram em andamento e que necessitam dos equipamentos elencados na proposta submetida a Fapeg podem ser citados:

- 1) *Acanthaceae* do Cerrado Goiano: Ocorrência, Fitoquímica, Potencial Farmacológico e Implicações para Conservação. Projeto guarda-chuva: IC, TCC, Mestrado e Doutorado.
- 2) Reposicionamento da auranofina 2,3,4,6-tetra- O -acetil- L -tio-?- D - glycopyranp-sato- S - (trietil-fosfina) - na lagochilascariose experimental
- 3) Avaliação da atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e toxicidade aguda de *Justicia thunbergioides* (Lindau) Leonard. (ACANTHACEAE). Projeto Mestrado
- 4) Controle de Qualidade a avaliação da atividade antimicrobiana de *Justicia pectoralis* (Acanthaceae) - Edital Nº 01/2018 - Programas de Iniciação Científica 2018/2019.
- 5) Análise da Logística Reversa de Medicamentos no Estado de Goiás: Acordos setoriais. Projeto Mestrado
- 6) Avaliação da prevalência do medo e ansiedade e o uso de fitoterápicos em pacientes com odontofobia - Edital Nº 01/2019 - Programas de Iniciação Científica 2019/2020.
- 7) Prospecção fitoquímica e produção de biomassa em *Justicia pectoralis* Jacq (Acanthaceae) sob influência de diferentes fontes de adubação- Projeto de Iniciação científica
- 8) Bioprospecção no Cerrado Goiano: Distribuição geográfica, potencial farmacológico e antimicrobiano, atividade antimalárica de espécies medicinais- Acanthaceae e Myrtaceae - Projeto de Doutorado
- 9) Flora do cerrado goiano: composição e diversidade em remanescentes de cerrado na fazenda betel, cocalzinho de goiás, go Projeto guarda-chuva: IC, TCC, Mestrado e Doutorado
- 10) Cultura do feijoeiro Caupi: Aspectos biotecnológicos - Projeto em parceria com a Universidade Tras Montes, Lisboa, Portugal
- 11) Determinação de elementos traço e características químicas no componente biótico e abiótico dos ecossistemas aquáticos continentais.

1. Contextualização:

A utilização de espécies vegetais para fins terapêuticos é uma prática muito antiga que ainda tem adesão por uma grande parte da população, especialmente as mais carentes (VERDAM, 2009). Esta forma de uso tradicional preocupa pesquisadores pelo fato de que os usuários de plantas medicinais não considerarem os riscos de toxicidade e com isso cresce o número de reações adversas a estas plantas (FERNANDES, 2016; LEAL & TELLIS, 2015). O estudo de plantas na busca por moléculas bioativas com mecanismo inovador tem contribuído para a descoberta de novos fármacos indicados para diversas patologias (OLIVEIRA, 2012). A utilização dessas substâncias ativas é de grande importância em protótipos para o desenvolvimento de fármacos, seja como fitoterápicos e/ou como fonte de insumo ativo para indústria farmacêutica na fabricação de medicamentos elaborados (PEIXOTO & SILVA, 2013). Estima-se que 25% das drogas descritas em farmacopeias modernas sejam moléculas semissintéticas isoladas de plantas (SINGH et al., 2015).

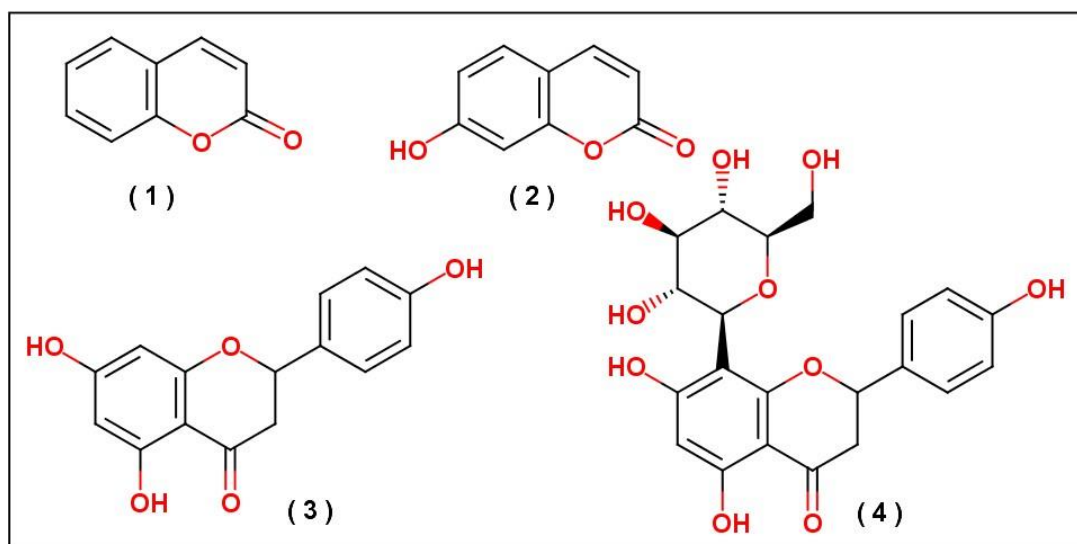
A família *Acanthaceae* apresenta destaque por ser uma família relativamente grande, composta por cerca de 3900 espécies distribuídas em 200 a 205 gêneros (BERGIANSKA, 2015 *apud* EL-GAZZAR et al., 2015). O gênero *Justicia* destaca-se por ser o maior da família *Acanthaceae*, sendo composto por cerca de 600 espécies amplamente estudadas por apresentarem compostos cuja atividade biológica se manifesta em ação anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiasmática, antitumoral, nefroprotetora, antidiabética, estrogênica, prostragênica, antidiarreica, antimutagênica, antioxidante e antidepressiva (VERDAM, 2009; JIN et al., 2014; MOURA, 2016; PAVAL et al., 2009; SAWATZKY et al., 2006; SRIDHAR et al., 2006; MECKES et al., 2004; DAY et al., 2000; CHEN et al., 1996; SANMUGAPRIYA et al., 2005; LEAL et al., 2000; CORRÊA & ALCÂNTARA, 2012).

A atividade anti-inflamatória já foi observada em diferentes espécies do gênero *Justicia*. Sabe-se que em *Justicia pectoralis* este efeito deve-se à presença das cumarinas 1,2-benzopirona (1) e umbeliferona (2), Figura 1 (VERDAM, 2009; JIN et al., 2014). Outro estudo mostrou que a *J. pectoralis* exerce efeito anti-inflamatório em vias aéreas devido à diminuição dos níveis de citocinas, sendo este efeito atribuído à presença de 1,2-benzopirona (cumarina) e 7-hidroxi-cumarina (umbelifenona) (MOURA, 2016).

Em *Justicia gendarussa* a presença de apigenina (3) e flavonóide vitexina (4) confere atividade anti-inflamatória tão relevante que, para tratamento da artrite, foi relatada como similar ao uso do ácido acetilsalicílico (PAVAL et al., 2009).

Em *Justicia spicigera*, *Justicia prostata*, *Justicia ciliata* e *Justicia acuminatissima* foram relatados efeitos anti-inflamatórios devido à presença de diferentes compostos, como apigenina, flavonoide, lignana glicosilada, compostos fenólicos, cumarina umbelifenona (SAWATZKY et al., 2006; SRIDHAR et al., 2006; MECKES et al., 2004; DAY et al., 2000; CHEN et al., 1996; SANMUGAPRIYA et al., 2005; LEAL et al., 2000). Para *J. acuminatissima* estudos de toxicologia aguda foram realizados com extrato aquoso, por via oral, e não demonstraram toxicidade no modelo testado. No entanto, há necessidade de estudos de toxicologia subcrônica e crônica para que se possa inferir sobre a segurança do uso dessa espécie (VERDAM, 2009).

Figura 1 – Estrutura química dos compostos com atividade biológica encontrados na *Justicia pectoralis*.



Fonte: adaptado de MOURA, 2016.

Quanto à espécie vegetal *J. thunbergioides*, sabe-se que apresenta inflorescência reduzida e brácteas foliáceas que recobrem todo o cálice, com período de floração de janeiro a abril (VILAR, 2009). São escassos os estudos para esta espécie e devido à similaridade entre as classes de metabólitos secundários (especiais) encontrados nos estudos de bioprospecção entre as espécies do mesmo gênero há a hipótese de que a *J. thunbergioides* assim como outras do mesmo gênero, apresentam atividade biológica, dentre elas, atividade anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana.

Sendo, portanto, necessário realizar estudos para *J. thunbergioides*, *J. goianienses*, *J. nodicaulis* a fim de isolar e identificar os compostos fitoquímicos, avaliando as atividades biológicas e por meio de avaliação de toxicidade aguda, predizer se há segurança no uso terapêutico destas espécies. Além disso, *J. pectoralis* deve ter sua atividade anti-inflamatória confirmada, assim como a segurança de uso testada por testes de toxicidade.

Desse modo, a problemática apresenta-se em dois questionamentos:

- Quais são os metabólitos secundários (especiais) presentes em espécies de *Justicia sp.* (*J. thunbergioides*, *J. goianienses*, *J. nodicaulis*, entre outras)?
- Estes compostos apresentam atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e segurança para o uso humano?

2. Objetivos e metas:

Sendo assim esta pesquisa tem por objetivo geral propor parâmetros para o controle de qualidade, a partir de análises por imagem hiperespectral, realizar o estudo fitoquímico e avaliar as atividades biológicas (antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória) e toxicidade aguda dos extratos e substâncias isoladas obtidos de diferentes espécies de *Justicia sp.* (*Acanthaceae*).

Os objetivos específicos incluem:

- Registrar dados sobre a ocorrência de espécies de *Justicia* (*J. pectoralis*, *J. thunbergioides*, *J. goianienses*, *J. nodicaulis* outras) em diferentes regiões do Cerrado goiano e mapear a distribuição geográfica.

- Propagação de *J. pectoralis*, *J. thunbergioides*, *J. goianienses*, *J. nodicaulis* na Fazenda Experimental da UniEVANGÉLICA, Anápolis, GO.
- Utilizar a imagem hiperespectral em combinação com análise de dados multivariadas para distinguir as drogas vegetais em nível taxonômico;
- Realizar a caracterização das drogas vegetais: identificação microscópica do pó, determinação de umidade, determinação da granulometria do pó, determinação de cinzas totais, determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico.
- Realizar a prospecção fitoquímica das drogas vegetais;
- Preparar extratos brutos de diferentes polaridades das folhas das espécies vegetais de *Justicia sp.* (Acanthaceae);
- Purificar, isolar e identificar os metabólitos secundários presentes nos extratos brutos das folhas de *Justicia sp.* do Cerrado Goiano, utilizando técnicas de análises espectroscópicas e espectrométricas (ultravioleta, infravermelho, espectroscopia de massas e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono);
- Determinar a atividade antioxidante total dos extratos brutos das folhas de *Justicia sp.* pela captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina);
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *Justicia*.
- Avaliar a ação anti-inflamatória e toxicidade aguda dos extratos brutos e das *substâncias isoladas* obtidos das folhas de *Justicia (Acanthaceae)*.
-

3. Fundamentação teórica

Os produtos naturais provenientes de espécies vegetais desempenharam um papel considerável no modo de vida das pessoas em todo o mundo desde a antiguidade, sendo consumidos como alimentos e usados como remédios medicinais (OSATHANUNKUL, MADESIS e BOER, 2015). Desde os tempos antigos busca-se a cura das doenças por meio das plantas. No entanto, o que era apenas empírico começou a ser baseado em estudos científicos para utilizações mais seguras e eficazes (SINGH et al., 2015).

A biodiversidade encontrada no Brasil é uma das mais significativas do planeta, com cerca de 20% do total de espécies do mundo, estimando-se um número entre 350 mil e 550 mil, dentre as quais, apenas 55 mil estão catalogadas e distribuídas pelas regiões do país.

Assim, muitas destas espécies não foram ainda devidamente exploradas quanto às potencialidades terapêuticas (SIMÕES et al., 2003; RIBEIRO et al., 2014). O Bioma Cerrado é formado por enorme diversidade de personagens, costume e paisagens culturais (SILVA, 2015), sendo descrito por Barbosa (1990 *apud* SILVA, 2015) como a cobertura mais antiga da Terra, com cerca 65 milhões de anos, abrange cerca de 2.036.448 km², equivalente a quase um quarto (23,92%) do território nacional, dos quais 57% estão no Centro-Oeste (SANTOS, 2015).

As espécies vegetais endêmicas do bioma Cerrado, usadas para fins medicinais, são utilizadas de diversas formas, principalmente extratos e tinturas, e algumas delas servem como matéria prima para elaboração de insumos ativos para a indústria farmacêutica (ALVES et al. 2011).

Dentre as plantas de interesse farmacêutico, encontradas no Cerrado, a família *Acanthaceae* tem destaque pelo grande número de espécies distribuídas em vários gêneros. Dentre estes, o gênero *Justicia* é o maior e mais complexo taxonomicamente (VILAR, 2009), porém, apenas 36 de aproximadamente 600 espécies estão catalogadas (CORRÊA e ALCÂNTARA, 2012), sendo que para a flora brasileira não há estudos conclusivos de quantas espécies ocorram. Ademais, no Distrito Federal, foram registradas apenas dez espécies, sendo elas: *J. lanstyakii*, *J. nodicaulis*, *J. sarothroides*, *J. chrysotrichoma*, *J. pycnophylla*, *J. oncodes*, *J. irwinii*, *J. tocantina*, *J. thunbergioides* e *J. clivalis* (VILAR, 2009).

O uso medicinal das espécies de *Justicia* ocorre em diversas indicações como tratamento de inflamações, artrite, reumatoide, doenças respiratórias e gastrointestinais, sedativos, alucinógenos, dores de cabeça, febre, hipoglicemiante (CORRÊA e ALCÂNTARA, 2012). Tais ações farmacológicas ocorrem devido à presença dos metabólitos secundários (especiais) presentes nas espécies vegetais, que são substâncias de baixo peso molecular e notável atividade biológica (PEREIRA e CARDOSO, 2012).

Nas espécies de *Justicia*, já foram encontrados principalmente alcaloides, cumarinas, lignanas, flavonoides e terpenóides (iridóides, diterpenos, e triterpenóides) que possuem potencial farmacológico. Além destas, foram descritas outras classes químicas encontradas nas espécies deste gênero, tais como óleos essenciais, vitaminas, ácidos graxos (ácido docosanóico), e ácido salicílico (CORRÊA et.al., 2012).

A atividade anti-inflamatória, desperta interesse médico devido à ampla aplicação na prática clínica, já que substâncias anti-inflamatórias possuem três ações principais: ação anti-inflamatória, ação analgésica e ação antipirética (RANG et al., 2001).

Em algumas espécies do gênero *Justicia* foram identificados metabólitos especiais indicando potencial anti-inflamatório, como é o caso de *J. picta*, onde foram encontrados flavonoides com tal atividade (SINGH et al., 2015). Para *Justicia acuminatissima*, usada popularmente por suas propriedades anti-inflamatórias, foi descrito em perfil fitoquímico a presença de cumarinas, esteróides, saponinas, taninos condensados e catequinas (VERDAM, 2009). *J. pectoralis* tem sua atividade anti-inflamatória atribuída à presença da cumarina umbeliferona (LINO et al., 1998).

Além disso, estudos de bioprospecção identificaram as principais classes de metabólitos secundários presentes nas folhas das espécies de *J. thunbergioides*, entre eles, flavonoides sugerindo o potencial anti-inflamatório desta espécie, além da presença de heterosídeos antraquinônicos, cardioativos, cumarinas e taninos (PEIXOTO e SILVA, 2013). Especialmente às cumarinas são atribuídas atividades farmacológicas, bioquímicas e terapêuticas, sem evidência de toxicidade, incluindo a redução de edema de tecido e inflamação (SIMÕES et al., 2003).

Para avaliação da atividade biológica destas espécies vegetais requerem-se investigações científicas efetivas, pois embora uma planta possua diversos metabólitos especiais, apenas aqueles em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica, havendo a necessidade de análise de extratos, onde se obtém extratos semi-puros, frações e finalmente, os compostos puros (VEIGA JUNIOR et.al, 2005).

O estudo da toxicidade da espécie vegetal deve ser considerado, haja vista que determinadas plantas apresentam substâncias perigosas e seu uso deve respeitar a cautela adequada a depender dos efeitos tóxicos. Tais efeitos também são provocados pela ação dos metabólitos secundários, que quanto à toxicidade já foram descritos o apiol, o safrol, as lignanas, os alcaloides pirroizidínicos, os terpenos, as saponinas, as lactonas sesquiterpênicas e furanocumarinas (CAPASSO et al., 2000).

Assim, devido à diversidade de espécies da família Acanthaceae é necessário avaliar biologicamente tais espécies, especialmente o gênero *Justicia*, com destaque para *J. thunbergioides*, *J. pectoralis*, *J. goianienses*, *J. nodicaulis* cujos estudos ainda são parcos.

3.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e Imagem hiperespectral no controle de qualidade de plantas medicinais

A impressão digital química baseada em várias técnicas analíticas tem sido utilizada para a identificação, autenticação e controle de qualidade de produtos fitoterápicos e produtos relacionados. Algumas técnicas cromatográficas usadas para impressão digital química incluem cromatografia de camada fina de alto desempenho (*High-Performance Thin-Layer Chromatography*, HPTLC), cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*, HPLC), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas – CG-EM (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS) (YANG et al., 2011; DENG; YANG; 2013; HE et al., 2015). As vantagens desses métodos incluem boa repetibilidade, ampla aplicabilidade e capacidades qualitativas e quantitativas.

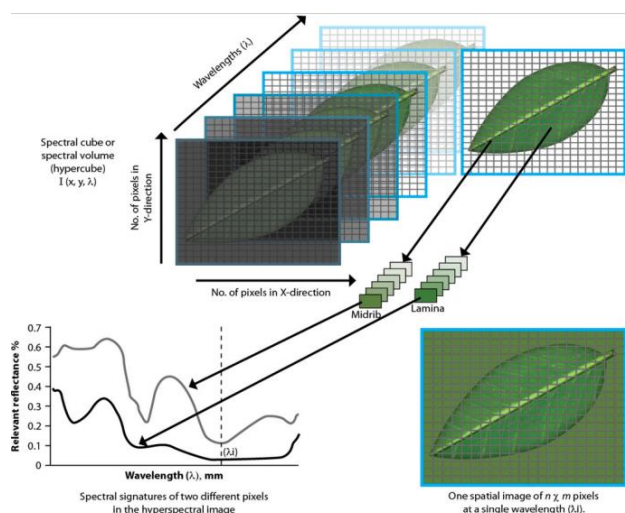
Além destas técnicas, tem sido utilizados na literatura métodos de controle de qualidade que permitem rapidamente autenticar materiais vegetais por meio de análise hiperespectral de imagens (HyperSpectral Image, HSI) (GRAHN; GELADI, 2007).

A imagem HSI é uma técnica que tem a capacidade de analisar tanto as propriedades químicas quanto físicas de uma amostra simultaneamente. HSI combina ambas as informações (espaciais e espectrais) de uma amostra e produz imagens em cada comprimento de onda (λ), resultando num conjunto de imagens/dados (Figura 2) (TANKEU et al., 2015).

Ou seja, as imagens são coletadas em função do comprimento de onda resultando em um conjunto de imagens referidas como um hiper-cubo, este possui duas dimensões espaciais (x;y) e um comprimento de onda. Em qualquer comprimento de onda, a imagem compreende vários pixels, onde cada pixel representa um espectro contendo a informação química. As imagens são analisadas para identificar regiões de onda onde são observadas diferenças químicas nas amostras (ou espécies) investigadas (SANDASI et al., 2014).

Para análise da HSI são usados vários modelos matemáticos, tais como a análise de componentes principais (Principal Component Analysis, PCA), mínimos quadrados parciais e análise discriminante (Partial Least Squares, PLS, Discriminant Analysis, DA). Em geral, PCA é usado em HSI para a redução de imagens e identificação de região espectral importante no processo de classificação de objetos/analitos de interesse (GOWENA et al., 2017). A PLS-DA permite discriminar classes baseadas nos espectros de cada pixel ligados à natureza química dos constituintes da amostra no processo de identificação do objeto/analito de interesse (EYLENBOSCH et al., 2014).

Figura 2 - Ilustração de um hiper-cubo espectral criado através da combinação de duas dimensões espaciais (x;y) e de comprimento de onda (λ).



Fonte: SANDASI et al., 2014.

Na área da botânica os modelos matemáticos são usados para estimar aspectos biofísicos e bioquímicos das plantas, medir a clorofila das plantas, detectar mudanças na vegetação, medir a variação de umidade, assim como ferramenta analítica de controle de qualidade de matérias-primas (SOUZA, 2013). Outra característica da HSI é que se caracteriza por análises não destrutivas e podem ser realizadas num período muito mais curto em comparação com métodos de análise convencionais, tais como, cromatografia a líquido (SANDASI et al., 2014).

O potencial da HSI foi usado como método de controle de qualidade rápido para matérias-primas e produtos contendo três espécies vegetais da família *Echinacea* por Sandasi et al. (2014) onde as análises da PCA mostraram uma clara distinção entre as amostras de raízes e folhas das espécies vegetais, mostrando assim que a HSI é um método de controle de qualidade objetivo e não destrutivo para autenticar matérias-primas de origem vegetal.

Em outro estudo, Tankeu et al. (2015) sugere o uso da HSI e PLS-DA como método para distinguir entre duas espécies de famílias diferentes *Stephania tetrandra* ("hang fang ji") e *Aristolochia fangchi* ("guang fang ji") utilizadas na medicina tradicional chinesa para a mesma finalidade (diurético, antireumático, analgésico e anti-inflamatório) e que são comumente referidas como "fangji".

Neste estudo, as análises por HSI e por CG-EM serão utilizadas com o objetivo de realizar a distinção química e física entre espécies de *Justicia sp.*, tais como, *J. pectoralis* e *J. thunbergioides*. Enquanto que para a primeira espécie vegetal os estudos fitoquímicos são diversos (sendo encontrados cumarinas, heterosídeos antraquinônicos, cardioativos, saponinas, taninos e flavonoides) em contrapartida para a segunda espécie há raros estudos relacionados à sua composição química e atividade biológica (CORRÊA et al., 2012; CORRÊA et al., 2013).

A distinção entre as espécies permitirá avaliar a qualidade dos materiais vegetais através de uma metodologia rápida e não destrutiva em comparação com análises convencionais, tais como, a cromatografia líquida.

4 Principais contribuições científicas e/ou tecnológicas da proposta

Estudos de bioprospecção mostraram que *Justicia thunbergioides* contém em suas folhas adultas a presença de heterosídeos antraquinônicos, heterosídeos cardioativos, heterosídeos saponínicos, alcaloides, flavonóides, cumarinas e taninos, podendo, portanto apresentar efeitos: catártico, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, anti-hemorrágico, expectorante, diurético, anti-hipertensivo, dentre outros (PEIXOTO & SILVA, 2013).

Apesar de haver muitos estudos para o gênero *Justicia*, observa-se até onde se sabe, ausência de estudos fitoquímicos, de atividades farmacológicas envolvendo metabólitos especiais de *J. thunbergioides*, *J. goianienses*, *J. nodicaulis*. Conseqüentemente, o presente projeto reforça a necessidade de isolar as moléculas bioativas presentes nestas espécies vegetais, determinar as atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória dos seus extratos e das substâncias isoladas e avaliar suas toxicidades agudas, podendo tais espécies virem a ser utilizadas como insumos ativos farmacológicos, contribuindo para a descoberta de novos fármacos ou mesmo para uso popular.

Além disso, a espécie *Justicia pectoralis* vem sendo usada popularmente por seus efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, com poucos estudos sobre a toxicidade e segurança de uso. Sendo, assim, necessários estudos científicos para validarem este uso popular. A comprovação de importância farmacoterapêutica das espécies pode servir de apoio para políticas públicas mais eficazes de conservação e proteção do bioma Cerrado.

5 Metodologia

5.1 Tipo de Estudo

Trata-se de uma pesquisa experimental quali-quantitativa exploratória que será realizada na região de Anápolis-Goiás. A cobertura vegetal do município está quase que totalmente descaracterizada pela ação do homem que há décadas, vem substituindo as matas por cultura de cereais, como arroz, milho, café e a formação de pastagens para alimentação do rebanho bovino.

O município localiza-se em uma área de tensão ecológica, ponto de contato entre o cerrado e a região da mata. O Cerrado, predominante a leste, tem dois típicos básicos de cobertura: o cerrado propriamente dito e o campo cerrado. Existem inúmeras plantas de uso na medicina popular nessa região entre elas *Justicia pectoralis* (Acanthaceae).

5.2 Modelagem de distribuição geográfica

Realizará a distribuição geográfica a partir de dados de ocorrência a serem extraídos do SpeciesLink (disponível em: <http://splink.cria.org.br/tools?criaLANG=pt>). A fim de selecionar dados incorretos, dar-se-á preferência para dados identificados por especialistas em família *Acanthaceae*, para que os dados de distribuição sejam mais confiáveis. Serão utilizadas as variáveis climáticas e ambientais derivadas do AMBIDATA, da Divisão de Processamento de Imagens do INPE (DPI), disponível em: (<http://www.dpi.inpe.br/Ambdata/download.php>).

Serão utilizados dados cartográficos como: Limites das unidades ambientais e políticas do Ministério do Meio Ambiente – MMA, em: (<http://mapas.mma.gov.br>), respectivamente. Os mapas serão produzidos usando o programa DIVA-GIS 7.5.0, no qual serão inseridos os limites geográficos, políticos e ambientais como unidades de conservação sobre os resultados da distribuição geográfica.

Como medida estatística para demonstrar a eficiência do modelo, será gerada a área sobre a curva (AUC) que mede a habilidade dos modelos em classificar corretamente se uma espécie está presente ou ausente (PAROLO, 2008). O valor da AUC será interpretado como uma probabilidade, onde o local com a presença (mais próximos de 1) e ausência (mais próximo de 0) serão avaliados aleatoriamente. AUC = 1, mais precisão, AUC= 0,5, predição meramente ao acaso.

5.3 Coleta de material botânico

Para a coleta do material botânico serão realizadas expedições de campo no período de novembro/2019 a abril/2020 no estado de Goiás.

Os locais e as datas das expedições serão escolhidos a partir de levantamentos realizados nos herbários CEN, UB, UFG (idas *in loco*); K e NY (empréstimos) e por indicações contidas no trabalho de Villar (2009) e Sartin (2016). Os locais de coleta serão registrados geograficamente com auxílio de aparelho de GPS. Exsiccatas das folhas serão depositadas no herbário da Universidade Estadual de Goiás, campus Anápolis/GO.

5.4 Secagem e extração

As folhas dos materiais vegetais serão secas em estufa com circulação de ar interna, (40°C) (QUIMIS, modelo Q317M42) durante 7 dias e pulverizados em moinho de facas rotativas (WILLYE TECNAL, modelo TE 650) (OLIVEIRA e AKISUE, 1989). O pó assim obtido de cada espécie será devidamente identificado, acondicionado e armazenado à temperatura ambiente até a sua utilização nos experimentos.

5.5 Obtenção dos Extratos brutos de *Justicia sp.*

Os extratos-brutos serão obtidos a partir do material seco e pulverizado das folhas de *Justicia sp.* através da técnica de maceração dinâmica a frio (CECHINEL FILHO, 1998). Serão realizadas 5 extrações com hexano, 5 extrações com diclorometano e 5 extrações metanol, num intervalo de 24h entre elas, utilizando o mesmo material vegetal e renovando-se apenas o líquido extrator. As proporções entre material vegetal e solvente será de 0,35 g/mL (m/v). Em seguida, cada extrato será concentrado à pressão reduzida em evaporador rotatório (45 °C), os extratos serão armazenados em freezer (-10°C) até a sua utilização nos experimentos.

5.6 Infravermelho de onda curta (SWIR) imagem hiperespectral

As amostras pulverizadas de *Justicia sp.* serão obtidas conforme descrito no item 5.4 e analisados por HSI (TANKEU et al., 2015; SANDASI et al., 2014). As imagens serão adquiridas usando a estação de trabalho SisuCHEM da Specim, Spectral Imaging Ltd. da Finlândia que produz imagens no infravermelho de ondas curtas (Short Wave Infrared; SWIR).

Estas análises serão realizadas no Laboratório de Computação Científica da Escola de Ciências Exatas e da Computação da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás), Goiânia, GO. As amostras de *Justicia sp* serão depositadas em batoques, contendo 6 porções de aproximadamente 5 gramas para cada espécie.

Será realizado um pré-processamento das imagens afim de suavizar ruídos (tanto ambientais quanto dos próprios sensores) e ressaltar características mais relevantes das amostras. Serão utilizados a normalização dos espectros, para que sejam proporcionais entre si e também a variação normal padrão (Standard Normal Variate, SVN) para suavizar atributos que não contribuem na etapa de classificação. A análise exploratória da HSI com o PCA remove informações não relacionadas com as amostras, tais como, o batoque, a bandeja onde são depositadas. Assim, no final do processo de pré-processamento a HSI resultante conterá os espectros mais representativos das amostras.

Uma vez que as amostras são linearmente separáveis no plano da PCA, será possível construir um modelo de classificação capaz de identificar novas amostras, pois a PCA não é capaz de classificar cada amostra. O modelo de classificação utilizado no trabalho será a PLS-DA. A classificação será realizada em duas etapas. A primeira de treinamento será realizada utilizando um subconjunto de amostras de *Justicia* para que o modelo utilizado aprenda a distinguir as espécies, tais como, *J. thunbergioides* e *J. pectoralis*. A segunda etapa será o teste do modelo treinado com o objetivo de verificar a capacidade de identificar cada uma das espécies. O teste será realizado com um subconjunto de amostras de *Justicia sp*. não incluídas na etapa de treinamento.

5.7 Caracterização da droga vegetal

5.7.1 Identificação microscópica do pó

O material vegetal seco e pulverizado será analisado microscopicamente após tratamento com corantes reativos que destacam as estruturas, segundo a metodologia de Kraus e Arduin (1997), Sass (1951) e Costa (2001). Serão utilizados os corantes Azul de Alcian e Safranina, Steinmetz, Lugol, Azul de metileno, Lugol, Cloreto férrico, Etzold e Sudan III para detecção de lignina, compostos fenólicos, celulose, amido e substâncias lipídicas.

As análises e registros fotográficos das estruturas microscópicas do pó serão realizadas no Laboratório de Pesquisa Ecológica e Educação Científica da Universidade Estadual de Goiás, por meio de um microscópio Leica DM500, com câmera Leica ICC50. A identificação será feita seguindo a metodologia de Oliveira e Akisue (2005).

5.7.2 Determinação de umidade

A determinação do teor de umidade da droga vegetal será realizada em triplicata por meio de uma balança com lâmpada de halogênio da marca Shimadzu, modelo MOC63u/Unibloc. Neste método, descrito na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL,2010), serão pesadas amostras de 1g da droga vegetal e a leitura será realizada pela balança após 5 minutos sob temperatura de 105°C.

5.7.3 Determinação da granulometria do pó

A determinação da distribuição granulométrica será realizada, em triplicata, por meio da utilização de tamises de abertura 250µm, 425µm, 1,0mm e 1,4mm, sobrepostos em posição decrescente, de forma que os de maior abertura ficarão sobre os de menor e em fim sobre o recipiente coletor. A amostra pesada (25g) será distribuída uniformemente sobre o tamis superior, tampada, e com o auxílio mecânico de um agitador da marca BERTEL, modelo 2156, será desenvolvida vibração adequada por 15 minutos.

Após este tempo, a amostra será retirada de cada um dos tamises, pesada, bem como a amostra residual dos tamises. A análise será realizada no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Estadual de Goiás, conforme procedimento descrito na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). O cálculo do percentual retido em cada tamis será realizado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ retido pelo tamis} = (P1/P2) \times 100.$$

Em que: P1 – peso da amostra retida em cada tamis (g); P2 – soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (g).

5.7.4 Determinação de cinzas totais

Para a determinação de cinzas totais, a análise será realizada em triplicata, pesando-se 1g da droga vegetal e transferindo esta amostra para um cadinho de porcelana previamente calcinado, resfriado e pesado. A amostra será incinerada em mufla da marca QUIMIS, modelo Q318924, utilizando-se temperaturas crescentes (30 minutos a 200°C, 60 minutos a 40°C e 90 minutos a 600°C) até a obtenção de cinzas brancas, conforme método descrito na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). Após a obtenção das cinzas, a amostra será resfriada em dessecador e pesada. A porcentagem de cinzas totais será calculada utilizando-se a fórmula a seguir: % teor de cinzas = $(N/P1) \times 100$

Em que: P1 – peso inicial da amostra (g); N – peso de cinzas totais da amostra (g)

5.7.5 Determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico

As cinzas insolúveis em ácido clorídrico serão determinadas, conforme a Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). Os resíduos obtidos na análise de cinzas totais serão levados à fervura com ácido clorídrico diluído e filtrados em papel filtro quantitativo, lavados em água destilada previamente aquecida, incinerados e pesados até peso constante. Este método permite a determinação de sílica e constituintes silícicos presentes na droga vegetal. Para o cálculo do teor de cinzas insolúveis em ácido clorídrico, será utilizada a seguinte fórmula: % teor de cinzas solúveis em ácido clorídrico = $(P1 - P2) / P3 \times 100$

Em que: P1 – peso do cadinho após a calcinação e resfriamento (g); P2 – peso do cadinho com a amostra após a calcinação e resfriamento (g); P3 – peso inicial da amostra (g).

5.8 Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica das folhas de *Justicia sp* será realizada por meio de reações de caracterização de compostos fenólicos (fenóis simples, cumarinas, flavonoides, antraquinonas, taninos), compostos nitrogenados (alcaloides) e terpenos (heterosídeos cardioativos), descritas e adaptadas de Matos e Matos (1989), Costa (2001), Matos (2009), e Simões et al. (2010).

A reação de caracterização de saponinas será realizada de acordo com as recomendações adaptadas da Farmacopeia Brasileira V, volume 1 (BRASIL, 2010).

5.9 Estudo fitoquímico

O estudo fitoquímico (produção dos extratos, fracionamento, isolamento e identificação de substâncias) será realizado no Laboratório de Pesquisa e Biodiversidade (LAPEBIO) do Centro Universitário UniEVANGÉLICA e a identificação das principais classes de metabólitos secundários serão realizadas em colaboração com a Universidade Estadual de Goiás (UEG) e Universidade Federal de Goiás (UFG). O material botânico será preparado dessecando as folhas em estufa do tipo FABBE-PRIMA com ventilação forçada a 40 °C e, em seguida, triturado em moinho de facas WILLYE TECNAL modelo TE 650. O pó assim obtido será devidamente identificado, acondicionado e armazenado até a sua utilização nos experimentos. Para a purificação, isolamento e identificação das folhas da espécie em questão serão utilizadas técnicas de análises cromatográficas e espectroscópicas.

O fracionamento e isolamento serão efetuados através da combinação das técnicas de cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada. Para a identificação estrutural de substâncias químicas das folhas serão realizadas análises em *espectroscopia* no infravermelho (*espectroscopia IV*) e ultravioleta (UV) conforme metodologia (ANVISA, 2010), espectroscopia por ressonância magnética nuclear de ^1H , espectroscopia por ressonância magnética nuclear de ^{13}C e RMN 2D com detecções inversas tais como a espectroscopia bidimensional de coerência múltiplo quantum heteronuclear a uma ligação (HMBC) e espectroscopia bidimensional envolvendo transições quânticas heteronucleares simples a uma ligação (HSQC) (HOLZGRABE, 2010) análises espectrométricas através da espectrometria de massas (EM) (ANVISA, 2010).

5.9.1 Fracionamento, purificação e identificação dos constituintes químicos presentes nos extratos brutos de *Justicia sp*

5.9.1.1 Cromatografia em coluna

O fracionamento e purificação das substâncias será realizado por cromatografia líquida em coluna (CC) de sílica-gel 60 VETEC (63 – 200 μm). Serão utilizadas colunas de diâmetro variável, preparadas com fases móveis em hexano:acetato de etila de modo isocrático e/ou gradiente de acordo com as características de cada amostra.

5.9.1.2 Cromatografia em camada delgada analítica

As análises das frações por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) serão realizadas utilizando-se cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60, F₂₅₄, (espessura de 0,250 mm). As placas serão observadas sob lâmpada ultravioleta (254 nm), ou reveladores contendo, por exemplo, solução de anisaldeído e permanganato de potássio (KMnO₄).

5.9.1.3 Cromatografia gasosa – CG-EM

As análises por cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS) serão realizadas em um aparelho da marca Agilent (modelo 8860) com um detector seletivo de massa (modelo 5977B) em modo ionização eletrônica (EI, 70 eV). O GC-MS será equipado com uma coluna de cromatografia tipo DB-5MS (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm , J & W Scientific), com programação de temperatura inicial de 60 °C (permanência: 1 min) elevação de 5 °C/min até 250 °C; modo de injeção split 1:20; fluxo de 1 μL , o gás de arraste foi hélio a 57kPa.

5.9.1.4 Fracionamento dos extratos brutos das folhas de *Justicia sp.*

Os extratos brutos serão purificados em colunas cromatográficas de adsorção em sílica gel 60, utilizando como fase móvel sistemas de eluentes em sistemas isocrático ou em gradiente. As frações serão concentradas a pressão reduzida em evaporador rotatório e analisadas por cromatografia em camada delgada e/ou CG-EM. Após a eluição por CCDA as placas serão reveladas com reagentes específicos, tais como, anisaldeído e permanganato de potássio (KMnO₄) e analisadas em câmara de UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm.

5.9.1.5 Análises por CG-EM das frações purificadas obtidas do fracionamento dos extratos brutos das folhas de *Justicia sp.*

Os compostos serão identificados através da comparação dos seus índices de retenção e espectros de massas com àqueles existentes na literatura (ADAMS,1995). A concentração dos constituintes será calculada através da área integral de seus respectivos picos, relacionada com a área total de todos os constituintes da amostra. Os compostos das frações purificadas serão identificados através do índice de retenção de Kováts (KI). Serão injetados 1mg/mL de amostra das frações purificadas em acetato de etila, assim como padrões de hidrocarbonetos saturados (com cadeias de 9 a 22 átomos de carbono) a 1mg/mL do solvente apropriado, injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras.

Os KI serão calculados através da equação: $ikx = 100n + 100\Delta n[(trx - trn)/(trm - trn)]$

Em que:

ikx= índice de retenção de Kovats da substância desconhecida “x”

n = número de carbonos do hidrocarboneto que elui antes de x

Δn = número de carbonos do hidrocarboneto que elui depois de x menos o número de carbonos do hidrocarboneto que elui antes de x

trx = tempo de retenção da substância desconhecida

trn = tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes de x

trm = tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois de x

5.10 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila DPPH.

A atividade antioxidante para os extratos brutos de diferentes polaridades (hexânico, diclorometânico e metanólico) serão realizadas pela captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). O procedimento consistirá no preparo de uma solução estoque de DPPH em etanol (0.1 mmol), a qual será adicionada 1ml desta à 1 mL das soluções contendo os extratos brutos de diferentes polaridades e concentrações (MELAGRAKI et al., 2009).

As soluções contendo os extratos metanólico, diclorometânico e hexânico de *Justicia sp* serão preparados nas concentrações ($\mu\text{g/mL}$) adequadas a partir das respectivas soluções estoques. As misturas serão agitadas a 450 rpm por 30 min e mantidas em ambiente sem luz a temperatura ambiente (25°C).

As leituras das absorvâncias das amostras serão realizadas em espectrofotômetro (UV-VIS Shimadzu). Como branco (controle negativo) será utilizada uma solução contendo 1 mL de DPPH e 1 mL de etanol, e como controle positivo será utilizada uma solução contendo ácido gálico a $10 \mu\text{mol}$ (BORGES, et.al., 2015; MALKI, et al., 2017). O experimento será realizado em duplicata.

$$\text{\% DPPH capturado} = (\text{Abs}_0 - \text{Abs}_1 / \text{Abs}_0) \times$$

O IC_{50} será calculado com base na equação da reta obtida por meio de regressão linear.

$$y = ax + b$$
$$\text{IC}_{50} = (50 - b)/a$$

Em que: - a e b são os coeficientes da equação da reta $Y = ax + b$.

O index de atividade antioxidante (AAI) será calculado com base na seguinte equação (SCHERER et al., 2009). Sendo que $0,5 \text{ mmol}$ equivalem a $19,71 \mu\text{g/mL}$ de DPPH.

$$\text{AAI} = \text{concentração final de DPPH (19,71 } \mu\text{g/mL)} / \text{IC}_{50}$$

5.11 Avaliação da atividade antimicrobiana

O teste de atividade antibacteriana com os extratos brutos obtidos das folhas de *Justicia sp*. será realizado conforme metodologia realizada por Domingues e colaboradores (2018).

Serão realizados testes de microdiluição em caldo para o ensaio microbiológico, conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI). Para as leituras das placas será utilizada a resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) como indicador visual de viabilidade bacteriana e colorimétrico de óxido-redução.

Serão utilizadas cepas-padrão *American Type Culture Collection* (ATCC), de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) (bactérias Gram positiva) e *Escherichia coli* (ATCC 25312) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) (bactérias Gram negativa) na determinação da concentração mínima inibitória (CMI). Os testes serão realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário de Anápolis – UniEVANGÉLICA.

As culturas bacterianas serão desenvolvidas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) por 24 horas e semeadas em ágar Mueller-Hinton (MH). Após incubação à 35°C por 24 horas, serão transferidas de 3 a 5 colônias para um tubo com solução fisiológica 0,9% em diluição 0,5 da escala de McFarland. O extrato das folhas de *Justicia sp.* será solubilizado em Tween 80® a 0,02% e diluído em caldo MH de modo a obter uma concentração de 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 µg.ml⁻¹. As diluições do antibiótico cloranfenicol, para controle positivo (CP), serão preparadas conforme recomendado pelo CLSI (2010), nas concentrações de 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 µg.ml⁻¹.

Após o preparo das cepas, extrato e antibiótico, serão pipetados 100 µl de cada concentração do antibiótico da coluna 1 até a coluna 7 e das linhas A a D. Na coluna 9, da linha A até a linha D, 100 µl de caldo Muller Hinton (MH) com o inóculo das bactérias a serem testadas (controle positivo - CP) e na coluna 11, da linha A até a linha D, 100 µl de MH sem inóculo (controle negativo – CN). A microplaca foi tampada e incubada a 35°C por 22 horas. Após o período de incubação na estufa, foram acrescentados em todos os poços 20 µl de resazurina 0,001% em solução fisiológica 0,9% e a placa foi novamente incubada por 2 horas.

A leitura das placas com os microrganismos foi realizada através da comparação da turvação das amostras nos poços antes e após acrescentar a resazurina, sendo que o aumento da turbidez ou opacidade no meio indica o crescimento de microrganismos.

Dessa forma, a Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) será definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, nos poços de microdiluição, detectada pela cor a olho nu mediante utilização de resazurina como revelador visual (PEREIRA, 2010).

5.12 Teste geral de atividade farmacológica e Avaliação da atividade anti-inflamatória

Os grupos de animais (n= 3) serão tratados pelas vias oral, intraperitoneal ou subcutânea com doses crescentes de extrato de *Justicia sp* (10, 30, 100, 300 e 1000 mg/kg), enquanto o grupo controle receberá a solução veículo Tween 80 2% 10 mL/kg. Após os tratamentos, os animais serão observados por 3 minutos em deambulação livre sobre a superfície plana nos tempos de 5, 10, 20, 30 e 60 minutos, e após 4, 8, 24 e 48 horas dos tratamentos e novamente após 4 e 7 dias. As alterações comportamentais observadas que diferenciam os animais tratados dos animais do grupo controle serão anotadas em ficha padrão de triagem farmacológica (Quadro 1) adaptada da proposta de Irwin (1968).

Para a avaliação anti-inflamatória do extrato aquoso das espécies em estudo obtido conforme descrito no item 5.3 será utilizado o método de edema de orelha em camundongos Swiss pesando entre 25 e 40 g provenientes do Biotério do Centro Universitário de Anápolis. Os animais serão mantidos em condições de temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12/12 h e com livre acesso a água e ração comercial.

Os animais serão mantidos na sala de experimentação durante pelo menos 1h antes da realização dos experimentos para adaptação. Inicialmente será realizado um teste em branco, para obtenção de parâmetros de medida de espessura e de peso de tecido auricular. Os animais serão divididos em grupos de seis, conforme o uso ou não do extrato aquoso e/ou metabólitos secundários isolados das folhas de *Justicia sp*. Os grupos controle serão denominados: grupo controle negativo (GC N), tratados com 20 µL de acetona/água (7:3), grupo controle positivo (GC P), tratados com dexametasona 0,1 mg/20 µL e grupo *Justicia* (GJ) , todas tratadas por via tópica. O método utilizado foi descrito por Tubaro e colaboradores (1985). Os animais serão deixados em jejum, com livre acesso a água por um período de 12 horas antes do protocolo experimental.

Quadro 1: Ficha padrão de triagem farmacológica adaptado da proposta descrita por IRWIN, 1968

PARÂMETROS	5	10	20	30	60	4	8	24	48	4	7
Contorções											
Motilidade											
Piloereção											
Movimentos											
Ptose palpebral											
Amontoados no canto											
Salivação											
Ereção de cauda											
Apreensão de patas											
Analgesia											
Alienação ambiental											
Convulsões											
Reação de fuga											
Agressividade											
Outras manifestações											
Morte											

O edema será induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton (20 RL) na orelha esquerda e orelha direita dos camundongos. O extrato aquoso e os metabólitos secundários de *Justicia sp* serão utilizados imediatamente após a indução da dermatite, assim como as soluções utilizadas como controle, acetona e dexametasona 0,1 mg, respectivamente. Após 6 horas à indução da inflamação, os animais serão submetidos à eutanásia com dose letal de tiopental 30mg/Kg e biópsias com 6 mm de tecido auricular serão coletadas com auxílio de um *punch* de biópsia (MELO et al. 2006). Será estabelecida a diferença de peso entre a amostra da orelha controle (esquerda) e a orelha estimulada (direita), expressando os resultados obtidos em peso(g). (BERNARDELLI et al.,2011).

Todos os experimentos com animais serão realizados após aprovação do presente Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética no uso de Animais do Centro Universitário de Anápolis (CEUA) desta instituição.

5.13 Avaliação da toxicidade aguda

Para avaliação da toxicidade aguda será utilizado o ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* por meio da adaptação da metodologia de Meyer e colaboradores. (1982). Será preparada uma solução com sal marinho na concentração de 30 g L^{-1} e o pH ajustado entre 8,0 e 9,0, por meio de solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. Esta solução será utilizada para eclosão dos ovos de *Artemia salina* e no preparo das demais diluições. Os ovos serão colocados para eclodir na solução salina por 48 horas, com aeração constante a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Serão transferidas cerca de 10 larvas de *Artemia salina* para tubos contendo a solução salina e amostras a serem testadas, nas seguintes concentrações do extrato aquoso e das substâncias isoladas de *Justicia sp*: 10, 100, 500, 1000 e 1500 ppm. O ensaio será realizado em triplicata de amostras, sendo a contagem dos animais mortos e vivos realizada após 24 horas. O teste será acompanhado de um controle negativo, somente com água salina.

5.14 Análise dos dados

Após a realização do experimento para avaliação de atividade anti-inflamatória os resultados serão enviados para análise estatística sendo realizada a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey's Multiple Comparison Test. Quanto ao teste de toxicidade aguda, será utilizada uma equação linear simples para estimar a concentração de extrato responsável por matar 50% das larvas de *Artemia salina*, valor representativo da DL50. *Os dados obtidos serão organizados e preparados para elaboração dos artigos científicos e relatórios técnicos a serem encaminhados à FAPEG e ao Centro Universitário de Anápolis (UniEVANGÉLICA).*

5.15 Caracterização dos riscos (físicos, biológicos, psicológicos e sociais) para os pesquisadores

As metodologias empregadas neste estudo não causam danos biológicos ou ambientais potenciais. O manuseio de animais é baseado no “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Resources, Commission of Life Sciences, National Research Council, 1996”.

Os modelos propostos estão padronizados ou em desenvolvimento nos laboratórios envolvidos, e não apresentam risco de nenhuma natureza para os pesquisadores. As dificuldades inerentes ao desenvolvimento desse projeto estão dentro das perspectivas de pesquisa de nossa instituição. Os departamentos nos quais os laboratórios estão situados oferecem serviços de apoio que reduzem as dificuldades que possam por ventura ocorrer.

5.16 Disponibilidade efetiva de infraestrutura para os animais e de apoio técnico para o desenvolvimento do projeto

Os procedimentos serão conduzidos pela equipe de pesquisadores e alunos de pós-graduação orientados pela Dr^a. Lucimar Pinheiro Rosseto com a colaboração do Prof.Dr. Bruno Junior Neves, e da Prof^a Dr^a Josana de Castro Peixoto nos laboratórios de Farmacognosia e Química Instrumental da Universidade Estadual de Goiás (UEG) e no Laboratório de Pesquisa e Biodiversidade (LAPEBIO) do Centro Universitário de Anápolis UniEVANGÉLICA. As coletas acontecerão nos locais de ocorrência das espécies em estudo, bordas de mata e cerrado na região de Anápolis – Goiás. Os estudos em animais serão desenvolvidos no biotério do Centro Universitário de Anápolis sob a supervisão do médico veterinário Raphael Rocha de Oliveira.

6 RESULTADOS ESPERADOS

Por meio desse projeto pretende-se:

- a) Contribuir para a formação de recursos humanos qualificados capazes de atender as demandas do estado de Goiás, através do Programa de Pós-Graduação em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente (PPG STMA) da UniEVANGÉLICA.

- b) **Descobrir novos fármacos para tratamento de doenças crônicas e infecciosas** de acordo com as demandas propostas pelo Sistema Único de saúde (SUS);
- c) Contribuir para o avanço nos estudos de produtos naturais do Cerrado.
- d) Caracterizar a atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e segurança na utilização dos extratos das folhas de *Justicia sp* (Acanthaceae), visando melhor aproveitamento farmacoterapêutico destas espécies pertencentes ao bioma Cerrado.
- e) Apresentar os resultados obtidos nesta pesquisa em congressos científicos e publicá-los em periódicos internacionais com alto fator de impacto e classificados pela CAPES em extratos superiores.

7 CRONOGRAMA

	2019	2020	2021	2022
ATIVIDADE				
Levantamento bibliográfico	x	x	x	x
Aprovação no CEUA/ UniEVANGÉLICA	x			
Apresentação do Projeto no CGEN	x			
Pesquisa nos herbários e coleta de material botânico	x			
Mapeamento da distribuição geográfica	x	x		
Propagação da espécie vegetal	x	x		
Prospecção fitoquímica	x	x		
Preparo de extratos	x	x		
Caracterização da espécie vegetal	x	x		
Estudo fitoquímico		x	x	
Quantificação dos constituintes químicos		x	x	
Avaliação da atividade antimicrobiana		x	x	
Avaliação da atividade antioxidante		x	x	
Avaliação de toxicidade aguda		x	x	
Avaliação da atividade anti-inflamatória		x	x	x
Análise dos dados	x	x	x	x
Redação de relatórios parciais	x	x	x	x
Publicação dos resultados em artigos científicos		x		x

ORÇAMENTO LapeBIO

CAPITAL - FAPEG

Item	Descrição	Quantidade	Valor
01	Rotaevaporador rotatório (Modelo RV 3 V Ika)	1	21.383,00
02	Bomba à vácuo N810.3 FT.18	1	7.930,00
SubTotal			
(2020)			R\$29.313,00
03	Cromatógrafo gasoso, p/ espectrometria de massas (GC Agilent mod. 5977B (MS) acoplado a GC modelo 8860.	1	183.688,00
SubTotal			183.688,00
(2021)			
04	Microtomo criostato YD 1900 ANC	1	83.727,00
05	Incubadora de bancada com agitação orbital - Marca Tecnal, Mod. TE-420	1	11.756,00
06	Bomba de vácuo	1	2.436,00
07	Freezer -80 graus Celsius	1	25.766,00
SubTotal			123.685,00
(2022)			
Total			336.686,00
(04 anos)			R\$336.686,00

BOLSA - FAPEG

Item	Descrição	Quantidade	Valor
01	Bolsa Mestrado (12 meses)	02	R\$32.400,00
SubTotal			R\$32.400,00

		(2020)	
02	Bolsa Mestrado (12 meses)	02	R\$32.400,00
03		SubTotal	R\$32.400,00
		(2021)	
	Bolsa Mestrado (12 meses)	02	R\$32.400,00
		SubTotal	R\$32.400,00
		(2022)	
		Total	R\$97.200,00
		(04 anos)	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream. 1995.

ALVES, M.M.; PEREIRA, A.M.S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; BERTONI, B. W. Caracterização química de tinturas e extratos secos de plantas medicinais do Cerrado por cromatografia em camada delgada. Scientia Plena, n. 12, v. 7, 2011.

ANVISA. Farmacopeia Brasileira, v. 1. 5ª Ed. Brasília, 2010.

BERGIANSKA. In: Johansson, J. T. The Phylogeny of Angiosperms. Disponível em: www.angio.bergianska.se/asterids/Plantaginales/Plantagin-ales.html, 2013.

BERNADELLI, A.K.; REIS, J.A.O.; KRYZANIAK, L.M.; AMARAL, V.; SARTOR, C.F.P. Estudo da ação anti-inflamatória do extrato bruto de *Pereskia aculeata* em camundongos. In: Encontro Internacional de Produção Científica. 7., 2011, Maringá. Anais Eletrônico - VII Encontro Internacional de Produção Científica. Disponível em <http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2011/pg1.php>. Acesso em 12 de abril de 2017.

BORGES, R. S.; CASTLE, S. L. Bioorganic Med. Chem. Lett. 25, 4808–4811. 2015.

CAPASSO, R.; et al.; Fitoterapia, 2000.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHEN, C. C.; HSIN, W. W.; KO F. N.; HUANG Y. L.; OU, J. C.; TENG, C. M.; 1996. Antiplatelet aryl naphthali de lignans from *Justicia procumbens*. *Journal of Natural Products*, n. 59, p. 1149-1150, 1996.

CORRÊA, G. M. E.; ALCÂNTARA, A. F. de C. Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia*- a review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, n. 22, v. 1, p. 220-238, Jan-Feb. 2012.

CORRÊA, G. M. Estudo fitoquímico de *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae): caracterização química, avaliação biológica, contaminação fúngica e detecção de produtos radiolíticos. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, BH, 2013.

DAY, S. H.; CHIU N. Y.; TSAO L. T.; WANG, J. P.; LIN, C. N. New lignan glycosides with potent antiinflammatory effect, isolated from *Justicia ciliata*. *Journal of Natural Products* n. 63, p. 1560-1562, 2000.

DENG, J.; YANG, Y. Chemical fingerprint analysis for quality assessment and control of Bansha herbal tea using paper spray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 785, p. 82-90, 2013.

FERNANDES, R. D. Estudo Fitoquímico de *Justicia wasshauseniana* (Acanthaceae), *Tetrapteryx acutifoliae* *Lophanthera lactescens* (Malpighiaceae) e Atividades biológicas. 2016. 220 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

FILETO, F. et al. Plano de Manejo – Reserva particular do patrimônio natural sítio pirilampo. Lavras, 2016. Disponível em <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/plano-de->

manejo/DCOM_plano_de_manejo_RPPN_Sitio_Pirilampo.pdf. Acesso em 29 de maio de 2017.

FONTES, L. E. F. et al. Estudo técnico para criação do refúgio de vida silvestre Macaúba. [s.d.]. Disponível em http://www.ief.mg.gov.br/images/stories/consulta_publica/vetor_norte/rvsmacaubasfim1.pdf. Acesso em 29 de maio de 2017.

FURTADO, J. M.; AMORIM, A. S.; FERNANDES, M. V. M.; OLIVEIRA, M. A. S. Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Eucalyptus globulus*, *Justicia pectoralis* e *Cymbopogon citratus* frente a bactérias de interesse. *Cient Ciênc Biol Saúde*, n. 17, v. 4, p. 233-237, 2015.

GRAHN, H.; GELADI, P. *Techniques and Applications of Hyperspectral Image Analysis*, Wiley, 2007.

HE, X.; LI, J.; ZHAO, W.; LIU, R.; ZHANG, L.; KONG, X. Chemical fingerprint analysis for quality control and identification of Ziyang green tea by HPLC. *Food Chemical*, v. 171, p. 405–411, 2015.

JIN, H.; YIN, H.; LIU, S.; CHEN, L. TIAN, Y.; LI, B.; WANG, Q. DONG, J. Cytotoxic activity of lignans from *Justicia procumbens*. *Fitoterapia*, n. 94, p. 70–76, 2014.

LEAL, L. K. A. M. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 70, p. 151-159, 2000.

LEAL, L. R.; TELLIS, C. J. M. Farmacovigilância de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: uma breve revisão. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, v. 9, p. 253-303, Out-Dez 2015.

MALKI, F.; TOUATI, A; MOULAY, S. J. Comparative study of antioxidant activity of some amides. *Journal of Pharmaceutical Research and Analysis*, n. 5, p. 1–5, 2017.

MECKES, M.; DAVID-RIVERA A. D.; NAVA-AGUILAR, V.; JIMENEZ, A. Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine*, n. 11, 446-451, 2004.

MELAGRAKI, G.; A. AFANTITIS, O. IGGLESSI-MARKOPOULOU, A. DETSI, M. KOUFAKI, C. KONTOGIORGIS, D. J. HADJIPAVLOU-LITINA, *EUR. Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, p. 3020–3026, 2009.

MELO, J.O.; TRUITI, M.C.T.; MUSCARÁ, M.N.; BOLONHEIS, S.M.; DANTAS, J.A.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; CUMAN, R.K.N.; BERSANI-AMADO, C.A. Anti-inflammatory activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.29, n.11, p. 2241-2245, 2006.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; AUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

MOURA, C. T. M. Envolvimento de vias capacitativas de cálcio nos efeitos inibitórios do extrato padronizado de *Justicia pectoralis* na hiper-reatividade traqueal induzida por desafio antigênico. 2016. 169 p. Tese (Doutor em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

OLIVEIRA, F. R. de. Avaliação antifúngica, farmacognóstica e toxicológica sazonal de *Petveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). 2012. 108 p. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Pará, Belém.

OSATHANUNKUL, M.; MADEISIS, P.; BOER, H. Bar-HRM for authentication of plant-based medicines: evaluation of tree medicinal products derived from Acanthaceae species. Plos One, v. 10, n. 5, 2015.

PAVAL, J. B. F.; KAITHERI.S. K.; POTU, B. K., GOVINDAN; S., KUMAR, R. S.; NARAYANAN, S. N.;MOORKOTH, S. **Anti-arthritic potential of the plant *Justicia gendarussa***. Clinical Science,v. 64, p.357-362, 2009.

PAROLO, G.; ROSSI, G.; FERRATINE, A. Toward improved species niche modeling: Arnica montana in the Alps as a case study. Journal of Applied Ecology. 45, 1410-18, 2008.

PEIXOTO, J.C.; SILVA, R.S.G. Acanthaceae do bioma cerrado: identificação dos fitoquímicos das folhas da espécie *Justicia thunbergioides* (lindau) leonard (acanthaceae) ocorrente no parque estadual serra dos pirenus, pirenópolis, GO. Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science, v. 2, n. 1, p.17, 2013.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Farmacologia. Tradução Patrícia Josephine Voeux. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO, D.A.; MACÊDO, D.G.; OLIVEIRA, L.G.S.; SARAIVA, M.E.; OLIVEIRA, S.F.; SOUZA, M.M.A.; MENEZES, I.R.A. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas, v.16, n.4, p.912-930, 2014.

SANDASI, M et al. Hyperspectral Imaging and Chemometric Modeling of Echinacea. A Novel Approach in the Quality Control of Herbal Medicines. Molecules, 19, 13104-21, 2014.

SANMUGAPRIYA, E.; SHANMUGASUNDARAM P.; VENKATARAMAN, S.; Anti-inflammatory activity of *Justicia prostrata* Gamble in acute and sub-acute models of inflammation. *Inflammo pharmacology*, n. 13, p. 493-500, 2005.

SANTOS, S.S. Otimização multi-objetivo aplicada ao planejamento sistemático de conservação para espécies de plantas do cerrado brasileiro. 2015. 278p. Tese (Doutorado em Informática) – Universidade de Brasília, Brasília.

SARTIN, R. D. O Gênero *Justicia* L. (Acanthaceae) no Estado de Goiás. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, SP 2015.

SAWATZKY, D.; WILLOUGHBY, D.; COLVILLE-NASH, P.; ROSSI, A. The involvement of the apoptosis-modulating proteins Erk 1/2, Bcl-xL, and Bax in the resolution of acute inflammation in vivo. *Am J Pathol*, v. 168, p. 33-41, 2006.

SILVA, A.M.S. A inter-relação entre plantas medicinais e as paisagens culturais do cerrado segundo a população local no município de Mirabela. *Revista Desenvolvimento Social*, n. 16/01, p. 65-75, 2015.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.

SINGH, P.; KHOSA, R. L.; MISHRA, G.; TAHSEEN, M. A. A phytopharmacological review on *Justicia picta* (Acanthaceae): A well known tropical folklore medicinal plant. *Journal of Coastal Life Medicine*, n. 3, v. 12, p. 1000-1002, 2015.

SOUZA, V. O uso de imagens hiperespectrais com efeitos de reflectância bidirecional na melhoria da classificação de culturas agrícolas. Revista Eletrônica: Tempo - Técnica - Território, v.4, n. 1, p. 1-21, 2013.

SRIDHAR, C.; KRISHNARAJU, A.V.; SUBBARAJU, G. V. Antiinflammatory constituents of *Teramnus labialis*. Indian J Pharm Sci, n. 68, p. 111-114, 2006.

TANKEU, V. I.; CHEN W.; SANDASI M.; VILJOEN, A. Differentiation between two “fang ji” herbal medicines, *Stephania tetrandra* and the nephrotoxic *Aristolochia fangchi*, using hyperspectral imaging. Phytochemistry, v. 122, p. 213-222, 2016

TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; ZILLI, C.; LOGGIA, R.D. The Cronto oil ear test revisited. Agents and Actions, v.17, p.3-4, 1985.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.. Plantas medicinais: cura segura. Quím. Nova, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERDAM, M. C. dos S. Estudo farmacognóstico e abordagem farmacológica de *Justicia acuminatissima* (MIQ.) Bremek. (Acanthaceae). 2009. 105 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

VILAR, T. S. Acanthaceae Juss. no Distrito Federal, Brasil. 2009. 125p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília.

YANG, D. Z.; AN, Y. Q.; JIANG, X. L.; TANG, D. Q.; GAO, Y. Y.; ZHAO, H. T.; WU, X. W. Development of a novel method combining HPLC fingerprint and multi-ingredients quantitative analysis for quality evaluation of traditional chinese medicine preparation. Talanta, v. 85, p. 885-890, 2011.