

ISSN 0100 - 9351

MARINGÁ

PARANÁ

Revista
unimar

ÓRGÃO OFICIAL DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

VOLUME 6

NÚMERO 1

outubro de 1984

Revista Unimar, Maringá, 6(1):01 – 198, outubro, 1984.

SUMÁRIO

BIOLOGIA

Anatomia do Desenvolvimento do Pericarpo de *Lonchocarpus muehlbergianus* HASSLER (*Leguminosae – Faboideae*) :

Luiz Antonio de Souza

05-19

Sintopia do Nervo Oculomotor com os demais nervos crânicos na fissura orbitária superior :

Jesus Carlos Andreo

João Dias Ambrósio

João Adolfo Caldas Navarro

21-32

COMPUTAÇÃO

Sistema para manuseio de memórias eprom

Paulo de Tarso Sica de Toledo

Nestor Charles Fernandes

33-38

ECONOMIA

Alguns aspectos da reprodução ampliada no modo da produção capitalista, segundo a visão macrodinâmica de Kalecki

Sílvio Antonio F. Cário

Oscar Hisao Ito

39-49

EDUCAÇÃO

A escolarização no meio rural e sua relação com o trabalho

Sandino Hoff

Jane Fadel Gracioso

Leila Leane Lopes Leal

51-69

EDUCAÇÃO FÍSICA

Comparação entre os estilos comando e individual para a aprendizagem da natação

Sônia Maria Toyshima Lima

71-75

O ensino e a aprendizagem dos conhecimentos práticos da natação

Clarice Alves Teixeira

77-81

FARMÁCIA-BIOQUÍMICA

Ação dos produtos naturais da *Stevia rebaudiana* sobre a glicólise em reticulócitos e eritrócitos

Fumie S. Kemmelmeier
Nair S. Yamamoto
Emy L. Ishi
Ana M. Kelmer Bracht
Adelar Bracht

83-97

Efeito dos produtos naturais da *Stevia rebaudiana* sobre mitocôndrias isoladas

A. M. Kelmer Bracht
M. Alvarez
A. Bracht

99-121

Degradação enzimática do steviosídeo e seus derivados com o suco digestivo de *Megalobulimus paranaguensis*

Maria de Lourdes L. Ferraresi
A. M. Kelmer Bracht
Adelar Bracht

123-141

Efeito do steviol e de seus análogos estruturais sobre a produção de glucose e sobre o consumo de oxigênio em túbulos renais isolados

N. S. Yamamoto
A. M. Kelmer Bracht
E. L. Ishii
F. S. Kemmelmeier
M. Alvarez
A. Bracht

143-149

Estudo científico da inibição da NADH-oxidase pelo isosteviol e seus derivados

A. M. Kelmer Bracht
A. Bracht

151-167

Variações em parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue e urina de ratos tratados com extratos aquoso de sementes de *Stryphnodendron obovatum* (barbatimão)

Antonio de Queiroz Neto
Ivaldo Melito
Edanir dos Santos

169-173

Prevalência de anticorpos antitoplásmicos em trabalhadores de matadouros do município de Maringá (PR)

Ana Lucia Falavigna
Maria Luiza Gaspar Goulart Dias
Maria Teresinha Gomes Casavechi

175-179

ZOOTECNIA

Avaliação do comprimento do pêlo, altura do pelame e reflectância da pele e do pelame de bovinos da raça Jersey na região de São Carlos, Estado de São Paulo

Sandra Aidar de Queiroz
Carlos Eduardo Furtado
José Francisco Asseli
José Gomes Arantes Neto

181-188

Estimativa de herdabilidade e correlação de pesos em diferentes idades de camundongos

Sandra Aidar de Queiroz

189-198

ISSN 0100-9351

REVISTA UNIMAR

Órgão Oficial da Universidade Estadual de Maringá

Volume 6(1)

Outubro 1984

Periodicidade anual

FUNDADOR:

Reitor José Carlos Cal Garcia

GESTÃO:

Reitor Paulo Roberto Pereira de Souza

SUPERVISÃO:

DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ervim Lenzi

SUPERVISÃO EDITORIAL:

Prof. Erivelto Goulart

Composição, Impressão e Encadernação

Imprensa Universitária – UEM

Endereço:

Caixa Postal 331 – CEP 87.100 – Maringá (PR) – Brasil

INDEXAÇÃO SELETIVA NO *INDEX MEDICUS LATINO-AMERICANO*

ISSN 0100-9351

Revista UNIMAR, v. 1- 1974-
Maringá, Universidade Estadual de Maringá.
Anual

Mudança de periodicidade e numeração:

1(1),1974; 1(2),1976; 1(3),1977; 2(1),1978;
2(2),1979; 2(3),1980; 3(1),1981; 4(1),1982.
5(1), 1983.

1. Pesquisas. 2. Ciência. 3. Cultura.

CDD – 001.43

Solicita-se permuta – Exchange desired

ANATOMIA DO DESENVOLVIMENTO DO PERICARPO DE
Lonchocarpus muehlbergianus **HASSLER**
(Leguminosae – Faboideae)*

LUIZ ANTONIO DE SOUZA

(Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá
Caixa Postal 331 – CEP 87.100 – Maringá – Paraná – Brasil)

RESUMO

A anatomia do desenvolvimento do pericarpo de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassler foi enquadrada em estádios, com base na diferenciação celular do endocarpo esclerenquimático. Foram considerados 4 (quatro) estádios: I (ovário), II (fruto em desenvolvimento - fase de atividade meristemática), III (fruto em desenvolvimento - fase de alongamento celular) e IV (fruto em fase de maturação celular, subdividida em etapas inicial e final).

ABSTRACT

The evolutionary anatomy of the pericarp of *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassler was fitted in periods of growth, taking as a basis the cell differentiation of sclerenchymatous endocarp. Four periods were considered: I (ovary), II fruit in development - period of meristematic activity), III (fruit in development - period of cell enlargement) e IV (fruit in period of cell maturation; subdivided in initial and final stages).

INTRODUÇÃO

O estudo da anatomia do desenvolvimento de frutos de espécies de Faboideae (Leguminosae) tem se voltado de modo geral para plantas cultivadas de interesse agrônomo. Registram-se na literatura estudos do pericarpo de *Phaseolus* (STARK & MAHONEY, 1942; REEVE & BROWN, 1968), *Arachys hypogaea* L. (WALDRON, 1919), *Vicia faba* L. (KANIEWSKY, 1968) e *Ornithopus sativus* L. (KANIEWSKY & WAZYNSKA, 1968). Outros trabalhos se referem a ontogênese do pericarpo e da semente de *Onobrychis vicciifolia* Scop. (THOMSON, 1960) e *Indigofera enneaphylla* L. (DEHSPANDE & UNTWALE, 1971).

As investigações sobre o desenvolvimento morfoanatômico de frutos de leguminosas nativas de matas brasileiras são conseqüentemente inexistentes.

* Parte da tese de doutoramento, intitulada "Desenvolvimento anatômico e comparativo dos frutos de *Acacia paniculata* Willd. (Leguminosae – Mimosoideae) e *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassler (Leguminosae Faboideae)".

Diante disso, o presente trabalho objetiva a análise do desenvolvimento estrutural do pericarpo de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassler, leguminosa de hábito arbóreo, conhecida vulgarmente como “imbira-de-sapo”, “feijão cru” e “timbó”, que ocorre em reservas florestais da região de Maringá (PR). Esta espécie pertence a um gênero considerado como fonte de madeira (LÖFGREN, 1977) e rotenona (KRUKOFF & SMITH, 1937), substância com propriedade inseticida e ictio-tóxica.

MATERIAIS E MÉTODOS

As flores, em pré e pós-antese, e os frutos, em estádios diversos de diferenciação, foram coletados na reserva florestal Parque do Ingá e no quilômetro 131 da rodovia BR 376, próximo ao município de Maringá.

O material coletado, fixado em FAA 50 e álcool etílico 70° GL, foi inicialmente selecionado com base no tamanho e nos caracteres morfológicos (figuras 1 a 6) e depois analisado anatomicamente. Em seguida, observando-se principalmente as fases de diferenciação histológica do endocarpo esclerenquimático (divisão, alongamento e maturação celular), o material botânico foi enquadrado em estádios de desenvolvimento: Estádio I (ovário), Estádio II e III (frutos jovens: fase de intensa atividade meristemática e outra com predomínio de alongamento celular, respectivamente) e Estádio IV (fruto em fase de maturação celular), subdividido em subestádios inicial e final.

Os ovários e as partes basal, média e apical dos frutos foram emblocados em parafina e seccionados transversal, longitudinal e paradermicamente. A coloração foi feita segundo o método de DNYANSAGER (1958).

O formato celular dos componentes histológicos do pericarpo foi pesquisado em material macerado, de acordo com o método empregado por Jeffrey (JOHANSEN, 1940).

Foram também executados testes histoquímicos para celulose, lignina, cristais de cálcio, substâncias graxas e tanino (STRASBURGER, 1911; JOHANSEN, 1940).

RESULTADOS

ESTÁDIO I

Flores branco-lilases, zigomorfas, diclamídeas, monóclinas e dispostas em inflorescência paniculada. Ovário em pré e pós-antese (figura 1).

OVÁRIO — unicarpelar, sésil, levemente achatado e envolvido pelo andróforo; EPIDERME EXTERNA - cuticularizada, com diferenciações multicelulares (tectoras e glandulares) e estomáticas anomocíticas (figuras 7 a 10); MESO-FILO - parenquimático, com canais secretores e células taníferas (estas com distribuição ampla na base de ovário ou restritas à posição subepidérmica, ou então

adjacentes aos feixes vasculares (figuras 7 e 12); EPIDERME INTERNA - desprovida de pêlos ou estômatos, finamente cuticularizada (figuras 7 e 12); VASCULARIZAÇÃO - feita através de 1 feixe dorsal, 2 ventrais e feixes procambiais imersos no mesofilo (figura 7); PRECURSOR DO TECIDO DE SEPARAÇÃO - restrito à região ventral (figuras 7 e 13); ALA INTERNA - projeção aliforme, de origem subepidérmica, verificada nas regiões ventral (mais desenvolvida) e dorsal da cavidade ovariana (figura 11).

ESTÁDIO II

Logo após a fecundação do ovário observa-se a abscisão das partes florais (pétalas e estames), permanecendo o cálice gamossépalo na base do fruto jovem. Nesta fase predomina a atividade do meristema ventral (figura 2).

EPICARPO (epiderme externa) - uniestratificado com pêlos e estômatos em diferenciação ou já diferenciados (figuras 14 a 19); MESOCARPO - parenquimático (derivado do mesofilo ovariano) salientando-se células hipodérmicas secretoras, células taníferas e canais secretores esquizógenos (figuras 14 a 18); EPIDERME INTERNA - com divisões predominantemente periclinais, originando uma camada dupla de células derivadas que também manifestam atividade meristemática ao longo de toda a fase (figuras 14 e 17); a camada contígua a cavidade seminal é precursora do endocarpo não-esclerenquimático (endocarpo externo), e o estrato subjacente originará o esclerênquima endocárpico (endocarpo interno) (figuras 15 e 18); VASCULARIZAÇÃO - semelhante à do ovário, exceto pela maior diferenciação celular e pelo aparecimento do câmbio vascular (figuras 14 a 16); TECIDO DE SEPARAÇÃO - representado por parênquima imaturo (figura 19).

ESTÁDIO III

O fruto se desenvolve acentuadamente nos sentidos longitudinal e transversal (dorsiventral), delineando-se o seu formato e tamanho definitivos. Nesta fase, o pericarpo possui número definido de camadas, predominando, portanto, o alongamento celular (figuras 3 e 4).

EPICARPO - com pouca atividade meristemática, apresenta já diferenciadas suas formações pilosas tectoras (mais comuns) (figura 21), glandulares e estomáticas; MESOCARPO - com regiões distintas: a) hipoderme bem delimitada na base do fruto (células já esclerificadas); b) tecido parenquimático (a maior parte do mesocarpo) com canais secretores e idioblastos tânicos (figura 21); ENDOCARPO - ainda com sítios de ação meristemática no início do estágio, é constituído também por duas regiões diferentes: a) endocarpo externo - tecido parenquimático multisseriado revestido pela epiderme; b) endocarpo interno - tecido formado por células fibrosas jovens (paredes delgadas) (figuras 20 e 21); nos frutos polispérmicos o endocarpo parenquimático prolifera entre as cavidades seminais, simulando a for-

mação de septos; **VASCULARIZAÇÃO** - feixes vasculares em crescimento secundário, com tecido esclerenquimático na fase floemática (figura 20); **TECIDO DE SEPARAÇÃO** - ocorre na região sutural (ventral), permanecendo apenas resíduos deste tecido na face dorsal (figura 20).

ESTÁDIO IV

As células do endocarpo esclerenquimático - padrão histológico para a consideração de estádios de desenvolvimento - sofrem vacuolização citoplasmática e espessamento (acompanhado de lignificação) parietal.

SUBESTÁDIO 1 – FASE INICIAL DE MATURAÇÃO

O fruto atinge o seu tamanho máximo, adquirindo o formato elipsóide definitivo. Na face ventral ocorre uma ala reduzida; na base conserva-se o cálice floral.

EPICARPO - de natureza epidérmica (figura 23); **MESOCARPO** - constituído de: a) hipoderme uni ou biestratificada com células em esclerificação (intercaladas por células de paredes delgadas); b) tecido parenquimático (figura 23); **ENDOCARPO** - o externo é representado por tecidos parenquimático e epidérmico, e o interno, de natureza esclerenquimática, é constituído de fibras cujas paredes celulares começam a se espessar (figuras 22 e 23); **VASCULARIZAÇÃO** - feixes vasculares em crescimento secundário, acompanhados por esclerênquima localizado na base do floema (figura 22); **TECIDO DE SEPARAÇÃO** - de natureza parenquimática, flanqueado por esclerênquima (figura 22).

SUBESTÁDIO 2: FASE FINAL DE MATURAÇÃO

Quando atinge a maturidade completa, o fruto, estruturalmente um folículo, conserva-se indeiscente. Em geral, apresenta apenas 1 semente, embora algumas vezes apresente 2 ou 3 (raramente mais) unidades seminais. O cálice seco se mantém em sua base (figuras 5 e 6).

EPICARPO - de natureza epidérmica, cuticularizado, com diferenciações pilosas (pêlos tectores e secretores multicelulares) e estomáticas (figuras 25 a 27 e 31); **MESOCARPO** - constituído de: a) hipoderme (uni e pluriestratificada) de esclereídeos, com conteúdo tânico, eventualmente intercalados por células parenquimáticas (figuras 24, 28, 30 e 31); b) parênquima com número variável de estratos (desde 3, observados na base e ápice do fruto, a 20, localizados na cavidade seminal), onde se podem observar células esclerificadas, idioblastos taníferos em disposição seriada e canais secretores (figuras 28 e 31); **ENDOCARPO** - é formado também por 2 regiões diferentes: a) a interna, representada somente pela epiderme unisseriada (base e ápice do fruto) ou pela epiderme simples e um tecido multiestratificado (com número variável de camadas), que pode ser esclerificado (proximi-

dade da base e ápice do fruto) ou parenquimático, que salienta células esclerificadas e colenquimatosas (cavidade seminal e adjacências) (figuras 28 e 31); a epiderme endocárpica que margeia a cavidade possui pêlos uni ou pluricelulares (figura 33); b) a região externa, ausente da região basilar do fruto (figura 24), é constituída por fibras que se caracterizam por paredes espessas e lignificadas, superfície plana ou sinuosa e extremidades retas ou bifendidas; estas fibras se dispõem em estratos (8 a 11) que obedecem a um único padrão de orientação (figuras 28 e 31), exceto na região apical do fruto, onde elas se organizam em 2 estratos (figura 32); VASCULARIZAÇÃO - na base do fruto, é feita por tecidos condutores secundários que envolvem uma medula esclerificada (figura 24); no restante do fruto, esses tecidos vasculares se arranjam em feixes colaterais: 1 dorsal, 2 ventrais, 1 suplementar (ala externa) e vários mesocárpicos (figuras 28 e 31); TECIDO DE SEPARAÇÃO - parcialmente esclerificado, ocorre apenas na região sutural (figura 30); ALA INTERNA - é reconhecível somente na região apical, e encontra-se completamente esclerificada (figura 29).

DISCUSSÃO

O ovário de *L. muehlbergianus* é pluriiovulado, embora, em geral, apenas um óvulo fecundado se diferencie em semente. O fruto monospermico possui tamanho bem inferior ao eventual polispermico, que se caracteriza por seu aspecto segmentado. Isso vem, aparentemente, reforçar a afirmação de que as sementes em diferenciação devem exercer grande influência sobre o crescimento do fruto, alterando-lhe a forma e as dimensões (ULRICH, 1942; ROTH, 1977).

Os pêlos uni ou pluricelulares do endocarpo de *L. muehlbergianus*, que margeia a cavidade seminal, parecem ter a função de manter a umidade no lóculo. Segundo KANIEWSKY (1968), durante o crescimento do fruto de *Ornithopus sativus*, a água se evapora dos pêlos e esta umidade é conservada na cavidade em que as sementes se desenvolvem.

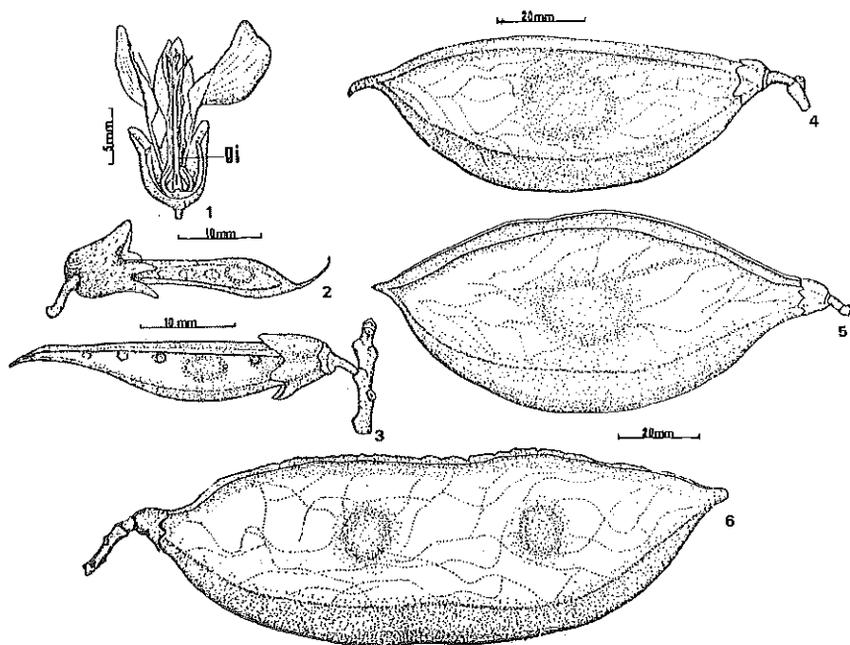
O endocarpo esclerenquimático de *L. muehlbergianus* provém principalmente da epiderme interna do ovário fecundado. A origem epidérmica desta região pericárpica parece ser comum na subfamília Faboideae (KANIEWSKY, 1968; KANIEWSKY & WAZINSKA, 1968; REEVE & BROWN, 1968; SOUZA, 1984).

O fruto maduro de *L. muehlbergianus* apresenta-se estruturalmente como um folículo indeiscente, já que mostra resíduos de tecido de separação parcialmente esclerificado somente ao nível da sutura (região ventral). Embora este tipo de fruto seja considerado filogeneticamente primitivo (FUSCKÓ, 1914), o folículo desta espécie apresenta algumas características julgadas evoluídas, como a indeiscência na maturidade, o número reduzido de sementes, a forma pouco alongada e a existência de um único estrato esclerenquimático interno (FAHN & ZOHARY, 1955; HEYN, 1968; ROTH, 1977). Ressalta-se, entretanto, que a classificação do fruto desta espécie como folículo indeiscente se contrapõe à descrição apresentada por HASSLER (1907), que o considera como legume não-deiscente.

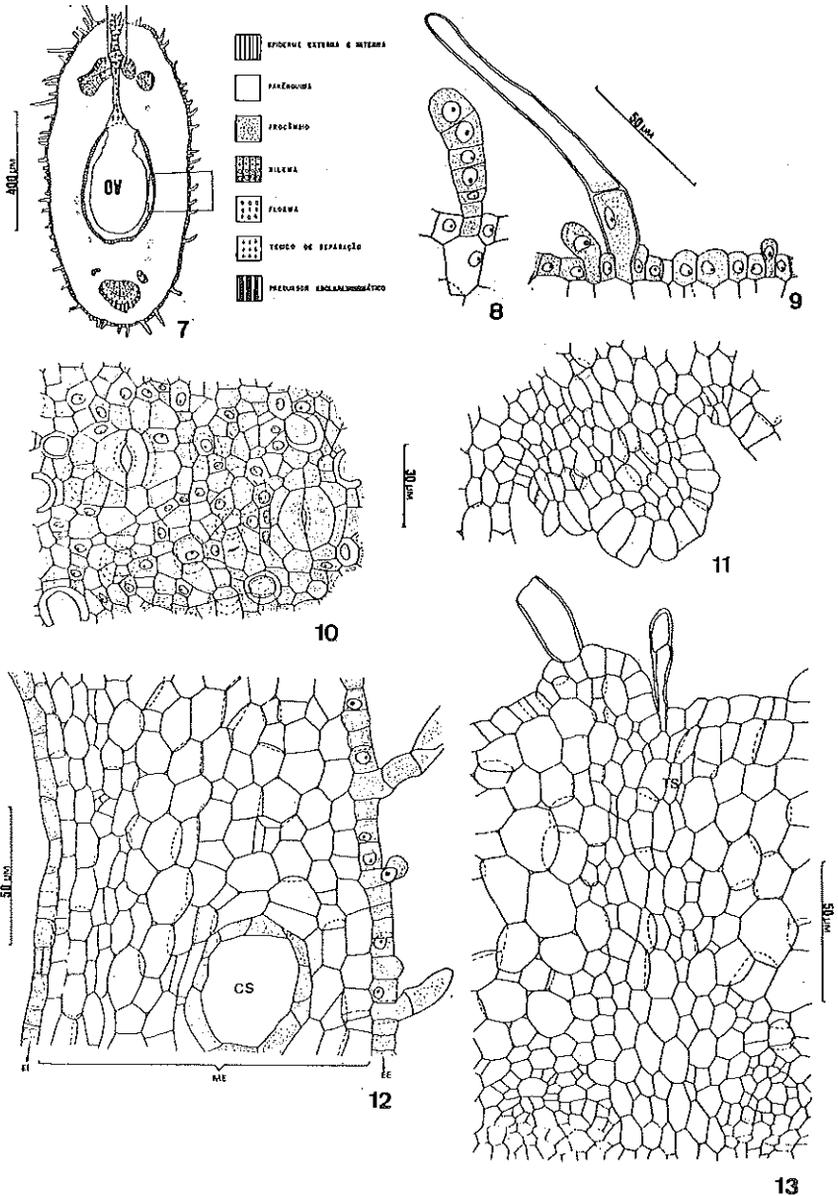
Considerando-se a estrutura do endocarpo esclerenquimático, o fruto

de *L. muehlbergianus* pode ser enquadrado no grupo V, de acordo com a classificação de FAHN & ZOHARY (1955), segundo a qual "as fibras do único estrato são diversamente orientadas em várias partes da valva". Todavia, levando-se em conta a histologia do esclerênquima endocárpico ao nível do ápice do fruto desta espécie, caracterizada por um estrato externo de células pequenas e outro interno de elementos prismáticos, verifica-se que o fruto não se enquadra no grupo mencionado, e sim no Grupo III, onde "o estrato esclerenquimático é constituído por células pétreas e paliádicas". Isto revela que, na classificação de frutos à base de caracteres anatômicos, não podem ser consideradas apenas regiões escolhidas ao acaso. O fruto deve ser analisado estruturalmente como um todo, em virtude das variações histológicas que podem ocorrer ao longo do pericarpo.

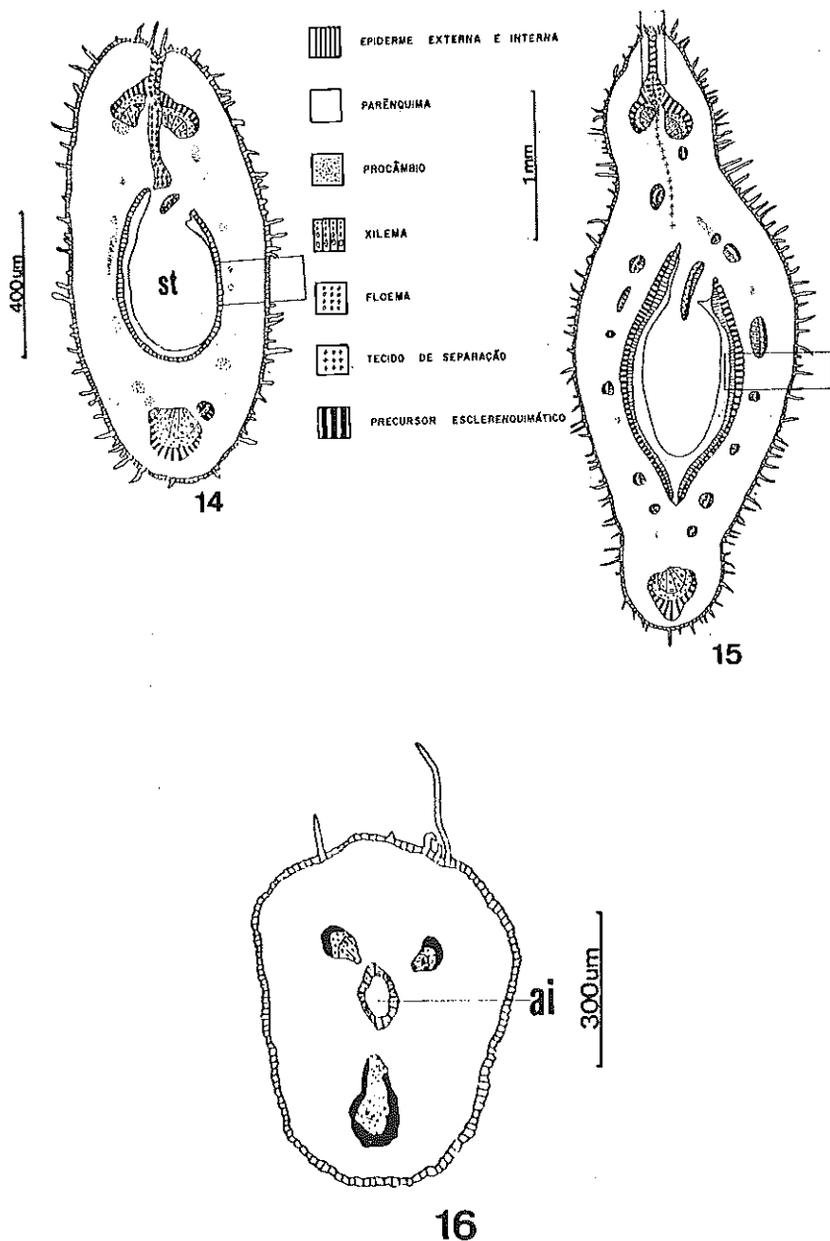
O fôliculo de *L. muehlbergianus* não possui um aparelho ativo de deiscência, conforme este é descrito por FAHN & ZOHARY (1955) e ROTH (1977). Há geralmente um único estrato de fibras arranjadas diversamente no endocarpo interno, e o tecido de separação se encontra parcialmente esclerificado. O endocarpo externo desta espécie apresenta células dispostas compactamente, cujas paredes são espessas e lignificadas, principalmente na base e no ápice do fruto, o que também deve dificultar a sua abertura.



Figuras 1 a 6 - Aspectos morfológicos dos diversos estádios de desenvolvimento do fruto: figura 1 - flor aberta (gi = gineceu) (estádio I); figura 2 - fruto jovem; observe-se o cálice persistente (estádio II); figuras 3 e 4 - frutos jovens, com o cálice na base do fruto (estádio III); figura 5 - fruto maduro, monospermico, indeiscente, ainda com o cálice (estádio IV - final de maturação); figura 6 - fruto também maduro, com duas sementes.



Figuras 7 a 13 – Estrutura do ovário (estádio D): figura 7 – diagrama do corte transversal do ovário, realizado ao nível de sua cavidade (ov = óvulo); figura 8 – pêlo glandular multicelular da epiderme externa; figura 9 – pêlos tectores da epiderme externa, em diferentes fases de diferenciação; figura 10 – pormenor da epiderme externa, em vista frontal; figura 11 – ala interna da região ventral do ovário, em pormenor; figura 12 – pormenor da parede do ovário, indicado na figura 7 (CS= canal secretor; EE= epiderme externa; EI= epiderme interna; ME= mesofilo); figura 13 – pormenor da região sutural, indicado na figura 7 (TS= tecido de separação).



Figuras 14 a 16 – Diagramas de cortes transversais do fruto jovem (estádio II): figuras 14 e 15 – secções feitas ao nível da cavidade seminal (st = semente); figura 16 – região apical (ai = ala interna).

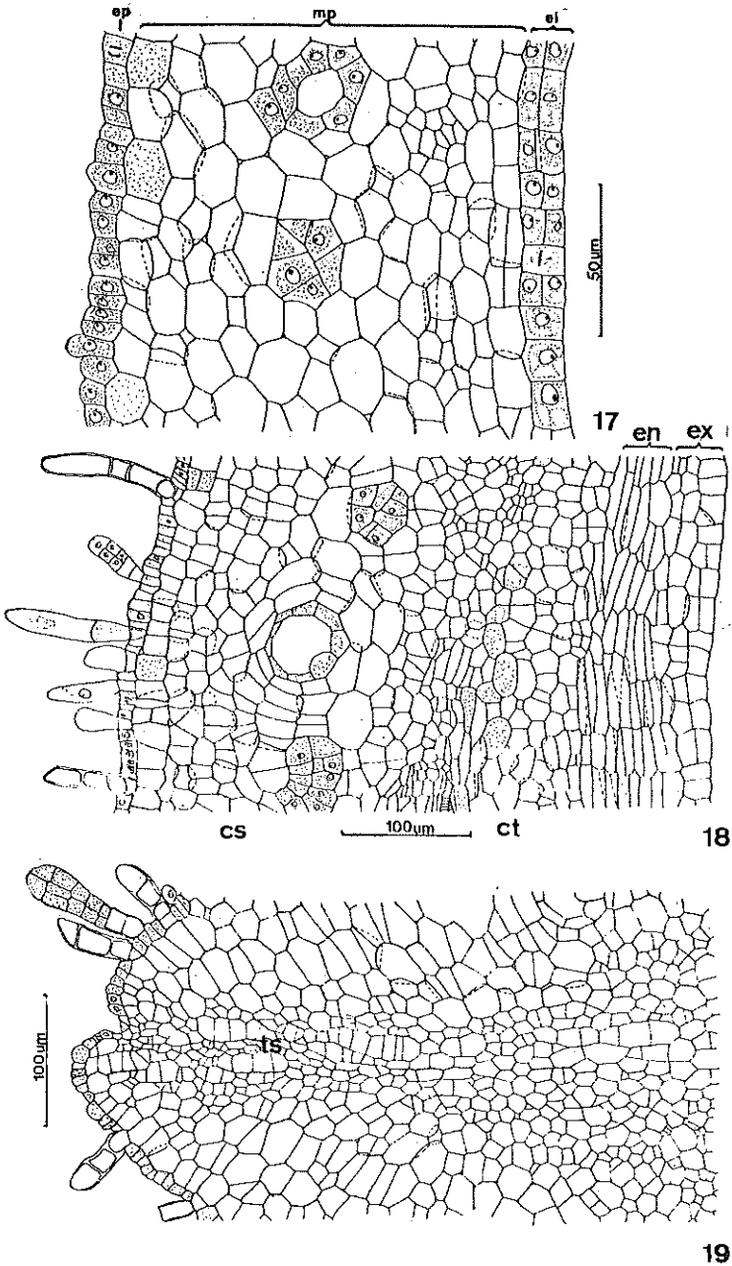
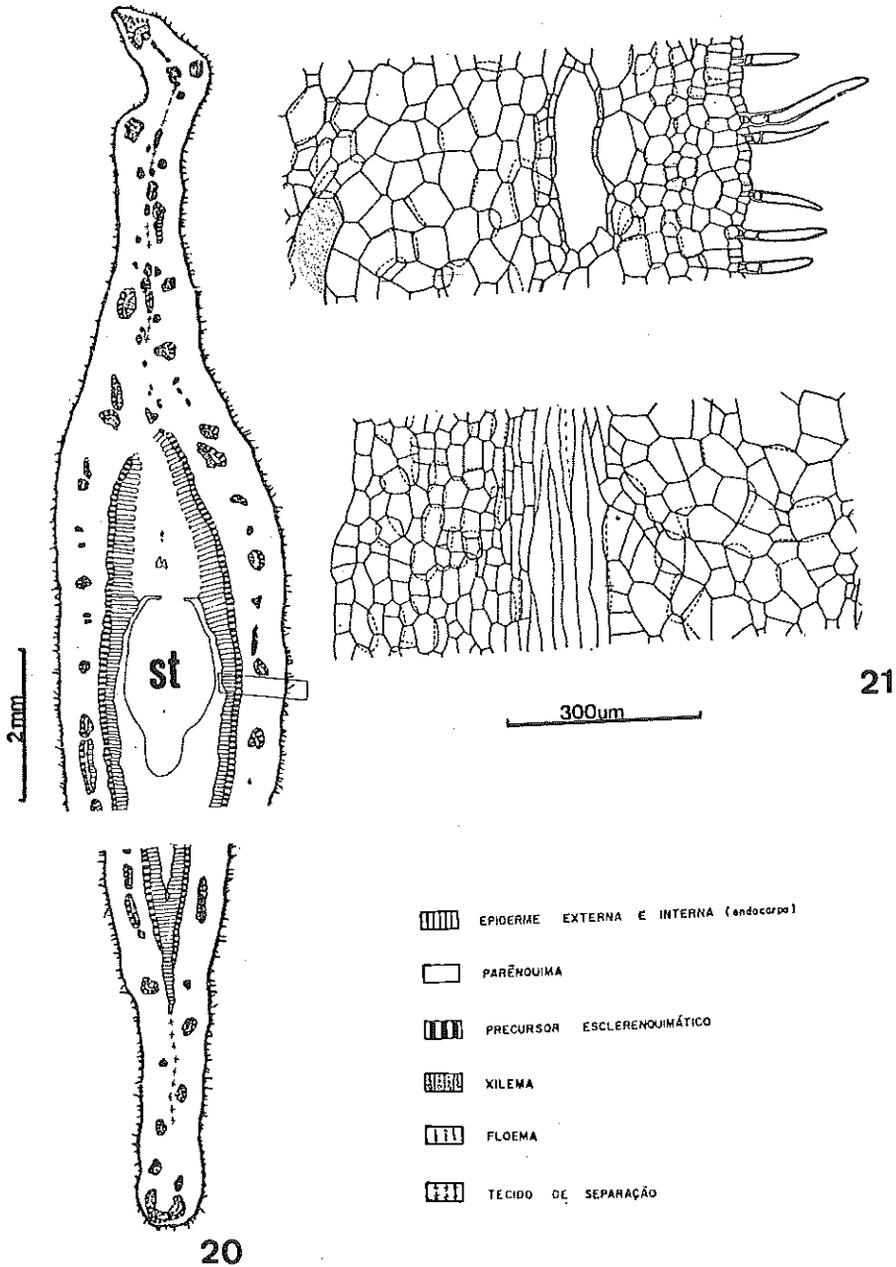
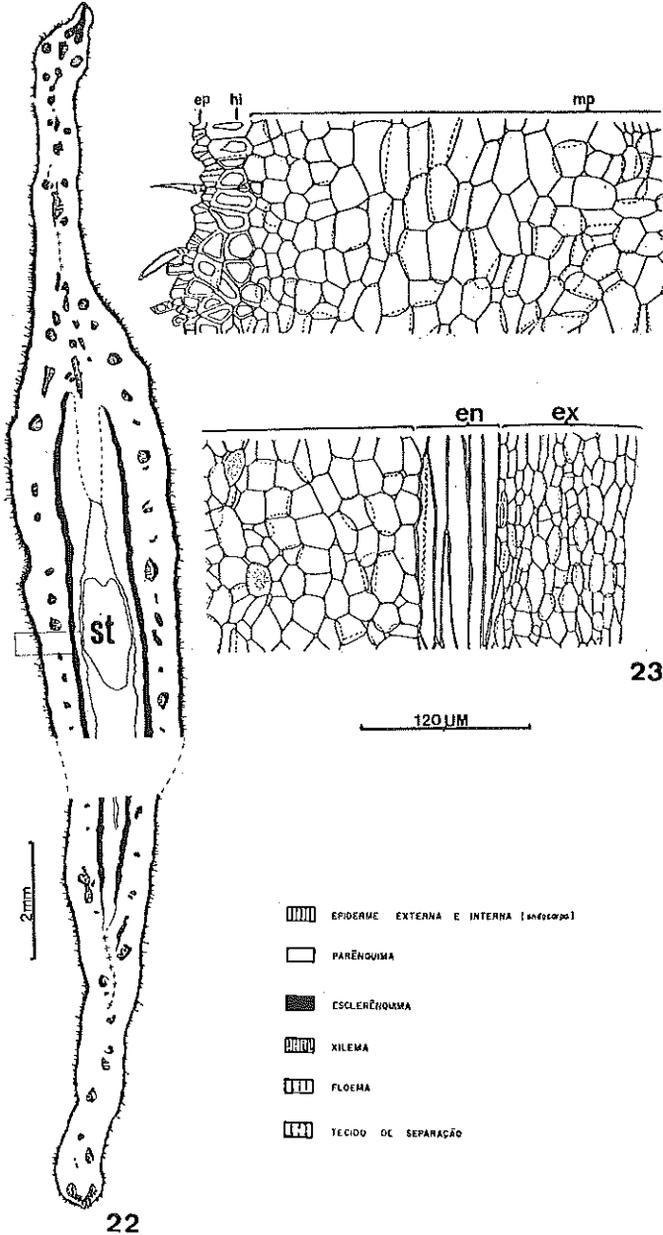


Figura 17 – pormenor da figura 14; figura 18 – pormenor indicado na figura 15 (cs = canal secretor; ct = célula tanífera; ei = epiderme interna em divisão; en = endocarpo interno; ep = epicarpo parenquimático; mp = mesocarpo parenquimático); figura 19 – pormenor da região sutural indicado na figura 15 (ts = tecido de separação).



Figuras 20 e 21 – Cortes transversais do fruto jovem (estádio III): figura 20 – diagrama da seção feita na região da cavidade seminal (st = semente); figura 21 – pormenor indicado na figura 20 (en = endocarpo externo; ep = epicarpo; ex = endocarpo interno; mp = mesocarpo parenquimático).



Figuras 22 e 23 – Cortes transversais do fruto maduro (estádio IV – fase inicial de maturação); figura 22 – diagrama da secção executada na região da cavidade seminal – (set = semente); figura 23 – pormenor indicado na figura 22 (en = endocarpo interno; ep = epicarpo; ex = endocarpo externo; hi = hipoderme; mp = mesocarpo parenquimático).

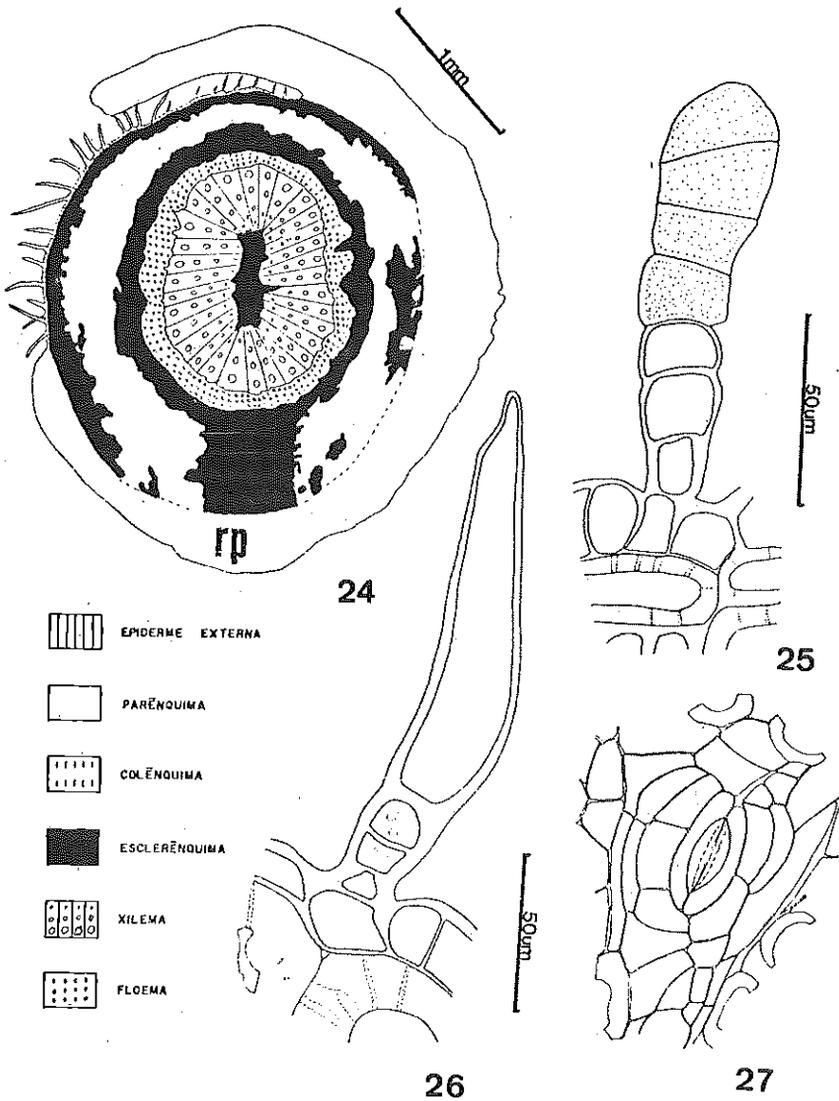
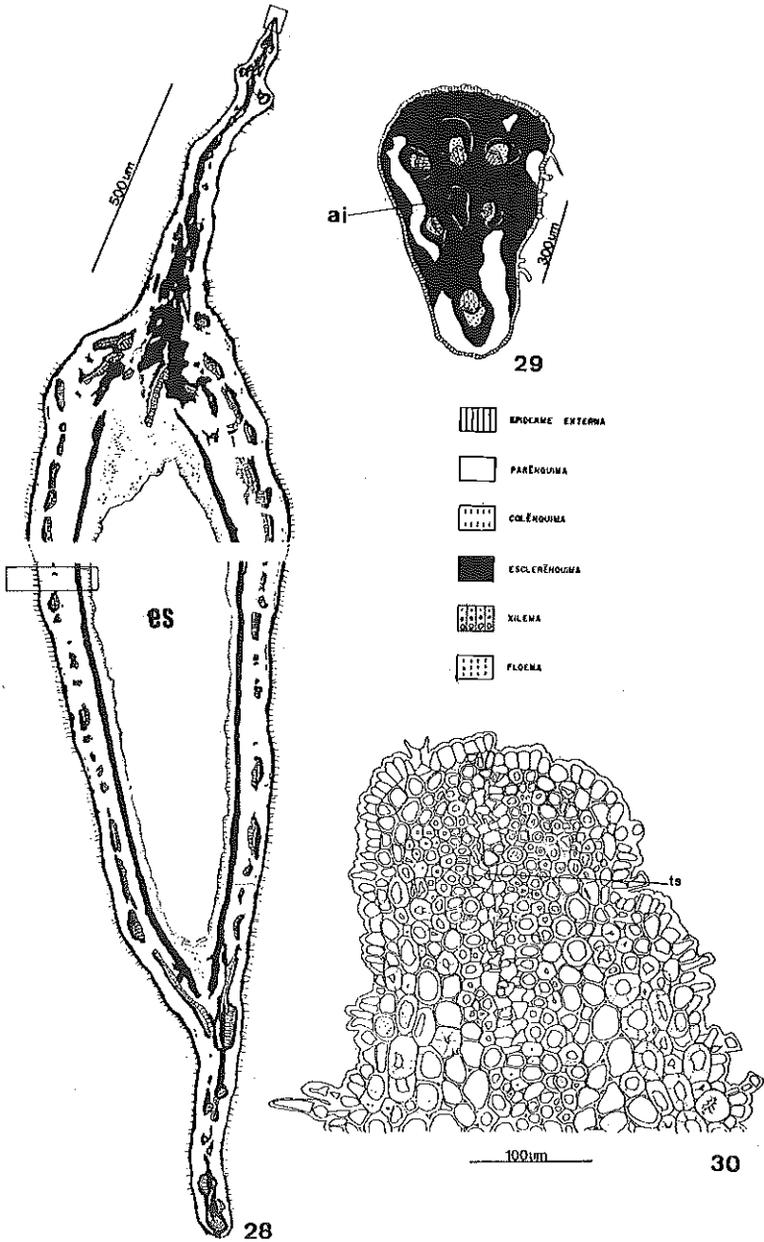


Figura 24 – diagrama do corte transversal executado na base do fruto maduro (estádio IV – fase final); figura 25 – pêlo glandular do epicarpo; figura 26 – pêlo tector do epicarpo; figura 27 – complexo estomático do epicarpo, em vista frontal.



Figuras 28 e 29 – diagramas dos cortes transversais executados nas regiões da cavidade seminal e do ápice, respectivamente, do fruto maduro (estádio IV – fase final) (ai= ala interna; es= cavidade seminal); figura 30 – pormenor da região sutural, indicado na figura 28 (ts= tecido de separação).

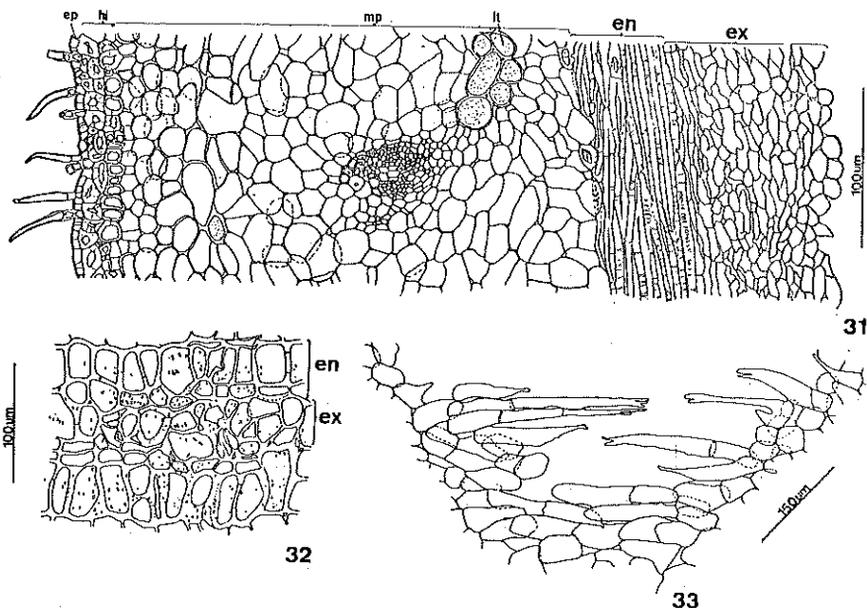


Figura 31 – pormenor da parede do fruto, indicado na figura 28 (en = endocarpo interno; ep = epicarpo; ex = endocarpo externo; hi = hipoderme; li = idioblasto tânico; mp = mesocarpo parenquimático); figura 32 – pormenor do endocarpo externo e interno da região apical do fruto maduro (en = endocarpo interno; ex – endocarpo externo); figura 33 – pormenor do tecido endocárpico externo que margeia a cavidade seminal (notem-se as diferenciações pilosas neste tecido).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DESHPANDE, P. K. & UNTWALE, A.G. Development of seed and fruit in *Indigofera enneaphylla* L. *Bot. Gaz.* **132** (2): 96 – 102, 1971.
- DNYANSAGAR, V. R. Embryological studies un the Leguminosae VIII. *Acacia auriculaeformis* A. Cunn, *Adenanthera pavonina* Linn., *Calliandra hematocephala* Hassk., and *Calliandra grandiflora* Benth. *Lloydia* **21** (1): 1-25, 1958.
- FAHN, A. & ZOHARY, M. On the pericarpial structure of the legumen, its evolution and relation to dehiscence. *Phytomorphology* **5**: 991-1111, 1955.
- FUCSKÓ, M. Studien über den Bau der Fruchtwand der Papilionaceen und die *hygroskopische Bewegung* der Hülsenklappen. *Flora* **106**: 160-215, 1914.
- HASSLER, E. Deux *Lonchocarpus* nouveaux des campos du Paraguay. *B. L'Herbier Boissier* (2^{me} sér.) **8** (3): 161-176, 1907.
- HEYN, C.C. An evolutionary study of fruit morphology in the tribe Trigonelleae (Leguminosae). *Phytomorphology* **18** (1): 54-59, 1968.

- JOHANSEN, D. A. *Plant Microtechnique*. New York, McGraw – Hill Book Company Inc., 1940, 523 p.
- KANIEWSKY, K. Hairs in the loculus of the broad-bean (*Vicia fava* L.) fruit. **B. Acad. pol. Sci (Sér. Sci. Biol)** 16 (9): 585-594, 1968.
- KANIEWSKY, K. & WAZYNSKA, Z. Development of pericarp in *Ornithopus sativus* L. **B. Acad. pol. Sci. (Sér. Sci. Biol.)** 16 (5): 303-306, 1968.
- KRUKOFF, B. A. & SMITH, A. C. Rotenone-yielding plants of south America. *Amer. J. Bot.* 24: 573-587, 1937.
- LÖFGREN, A. **Manual das Famílias Naturaes Phanerogamas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1917. 611 p.
- REEVE, R. M. & BROWN, M. S. Histological development of the green pod as related to culinary texture. 1. Early stages of pod development. **J. Food Sci.** 33: 321-326, 1968.
- ROTH, I. Fruits of Angiosperms. In: LINSBAUER, K., ed., **Encyclopedia of Plant Anatomy**. Berlin, Gebrüder Borntraeger, 1977. vol. 10 (1): 675 p.
- SOUZA, L. A. Anatomia do desenvolvimento dos frutos de *Macroptilium atropurpureum* (DC) Urb. e *Machaerium stipitatum* (DC) Vogel (Faboideae). (Comunicação pessoal), 1984.
- STARK, F. C. & MAHONEY, C. H. A study of the time of development the fibrous sheath in the sidewall of edible snape bean pods with respect to quality. **Amer Soc. hort. Sci.** 41: 353-359, 1942.
- STRASBURGER, E. **Handbook of Practical Botany – for the Botanical Laboratory and Private Student**. New York, The Mac Millan Company, 1911. 527 p.
- THOMSON, J. R. Morphology and anatomy of the seed and fruit of *Onobrychis viciifolia* Scop. **Proc. int. Seed Testing Assoc.** 25 (2): 848-864, 1960.
- ULRICH, R. Observations sur la croissance de quelques fruits. **R. Sci.** 80: 24-30, 1942.
- WALDRON, R. A. The peanut (*Arachis hypogaea*) – its history, histology, physiology, and utility. **Contr. bot. Lab. Univ. Pennsylvania** 4:301-338, 1919.

AGRADECIMENTO

O autor agradece à Dr.^a Berta Lange de Morretes (Departamento de Botânica – USP – São Paulo) pela orientação do presente trabalho.

SINTOPIA DO NERVO OCULOMOTOR COM OS DEMAIS NERVOS CRÂNICOS NA FISSURA ORBITÁRIA SUPERIOR*

JESUS CARLOS ANDREO

Fundação Universidade Estadual de Maringá
Departamento de Biologia – Caixa Postal 331
Maringá – Paraná – Brasil

JOÃO DIAS AMBRÓSIO

Escola Paulista de Medicina
Departamento de Anatomia
São Paulo – SP

JOÃO ADOLFO CALDAS NAVARRO

Universidade de São Paulo
Departamento de Morfologia
Bauru – SP

RESUMO

Os autores estudaram a sintopia e a bifurcação do nervo oculomotor ao cruzar a fissura orbitária superior, em 30 hemicabeças de indivíduos adultos e masculinos, dissecadas ao estereomicroscópio. A sintopia e as características do nervo ao cruzar a fissura orbitária superior foram analisadas e discutidas frente à literatura. Em 15 casos (50%), o nervo oculomotor apresenta-se como tronco único, e em outros 15 casos (50%), bifurcado a esse nível. Foram estudadas suas relações com os nervos troclear, abducente, nasociliar, frontal e lacrimal, bem como os casos de ausência de sintopia dele em algum dos lados.

ABSTRACT

The relationship of the oculomotor to the superior orbital fissure was observed through out 30 dissections of the hemi-heads of adult males. In 15 cases (50%) the nerve was bifurcated and in 15 (50%) not bifurcated at the level. Its relationships with troclear, abducent, nasociliar, frontal, lacrimal nerves and the absence of the nerves were analysed.

INTRODUÇÃO

O nervo oculomotor, que recebe os nomes de motor ocular comum e III par, é o responsável pela inervação motora dos músculos extrínsecos e intrínsecos do globo ocular e, conseqüentemente, por várias patologias que se manifes-

* Trabalho baseado na Tese de Mestrado apresentada por Jesus Carlos Andreo à Escola Paulista de Medicina.

tam por alterações dos movimentos deste órgão.

Este nervo, no seu trajeto, cruza a fissura orbitária superior e neste local pode sofrer pressão, como, por exemplo, após uma fratura, produzindo sintomatologia, por isso resolveu-se fazer um estudo da sua sintopia neste nível, além de observar se, no momento de cruzar a referida fissura, ele se encontra como um tronco único, ou se está bifurcado, porque na literatura consultada este dado apresenta variação.

REVISÃO DA LITERATURA

Para alguns autores, o nervo oculomotor bifurca-se em ramos superior e inferior após cruzar a fissura orbitária superior (SAPPEY, 1880; PEREIRA-GUIMARÃES, 1894; ANILE, 1919; PITRES & TESTUT, 1925; ANSON, 1963; MURAKAMI, 1965; PERNKOPF & PICHLER, 1968; WARWICK & WILLIAMS, 1973; SPALTEHOLZ & TORTELLA, 1976; SOBOTTA & BECHER, 1977), enquanto para outros esta bifurcação ocorre antes desse nível (DEBIERRE, 1890; HEITZMANN, 1896; BOUTIGNY, 1901; CUNÉO, 1904; VALENTI, 1912; FAZZARI, 1914; HOVELACQUE, 1927; FALCONE, 1931; LUNA, 1932; WAMLSLEY, 1936; BARNHILL, 1940; EDWARDS, 1947; TOLDT, 1948; LARSELL, 1953; WOLFF, 1955; ROUVIÈRE, 1961; LAKKE, 1962; DURWARD, 1964; LOCKHART, 1965; WOODBURNE, 1973; TESTUT & JACOB, 1977; TESTUT & LATERJET, 1978).

Na literatura consultada encontra-se o registro de vários tipos de sintopia do nervo oculomotor e seus ramos com os nervos crânicos, como mostram os quadros abaixo:

QUADRO I
SINTOPIA DO NERVO OCULOMOTOR COM OS
NERVOS CRÂNICOS QUE SE RELACIONAM SUPERIORMENTE COM ELE

TIPOS	NERVOS	AUTORES
1	trocLEAR	Pereira-Guimarães, 1894; Anile, 1919; Pitres & Testut, 1925; Sobotta & Becher, 1977.
2	ausência de nervo crânico	Anson, 1963; Pernkopf & Pichler, 1968; Warwick & Williams, 1973; Spalteholz & Tortella, 1976.

QUADRO II
SINTOPIA DO NERVO OCULOMOTOR COM OS
NERVOS CRÂNICOS QUE SE RELACIONAM LATERALMENTE COM ELE

TIPOS	NERVOS	AUTORES
1	frontal e nasociliar	Sappey, 1880; Pereira-Guimarães, 1894
2	frontal, nasociliar e troclear	Pitres & Testut, 1925.
3	oftálmico	Anson, 1963; Sobotta & Becher, 1977
4	frontal	Pernkopf & Pichler, 1968
5	troclear	Warwick & Williams, 1973
6	ausência de nervo crânico	Anile, 1919; Spalteholz & Tortella, 1976

QUADRO III
SINTOPIA DO NERVO OCULOMOTOR COM OS
NERVOS CRÂNICOS QUE SE ENCONTRAM INFERIORMENTE A ELE

TIPOS	NERVOS	AUTORES
1	abducente	Anson, 1963; Pernkopf & Pichler, 1968; Sobotta & Becher, 1977
2	ausência de nervo crânico	Sappey, 1880; Pereira-Guimarães, 1894; Pitres & Testut, 1925; Warwick & Williams, 1973; Spalteholz & Tortella, 1976.

QUADRO IV
SINTOPIA DO NERVO OCULOMOTOR COM OS
NERVOS CRÂNICOS QUE SE ENCONTRAM MEDIALMENTE A ELE

TIPOS	NERVOS	AUTORES
1	ausência de nervo crânico	Sappey, 1880; Pereira-Guimarães, 1894; Anile, 1963; Pernkopf & Pichler, 1968; Warwick & Williams, 1973; Sobotta & Becher, 1977

QUADRO V
SINTOPIA DO RAMO SUPERIOR DO NERVO OCULOMOTOR COM
OS NERVOS CRÂNICOS QUE SE RELACIONAM SUPERIORMENTE A ELE

TIPOS	NERVOS	AUTORES
1	troclear	Heitzmann, 1896; Hovelacque, 1927; Toldt, 1948; Wolff, 1955; Durward, 1964; Lockhart, 1965; Testut & Latarjet, 1978.
2	oftálmico	Lakke, 1962.
3	ausência de nervo crânico	Debierre, 1890; Boutigny, 1901; Cunéo, 1904; Fazzari, 1914; Falcone, 1931; Luna, 1932; Walmsley, 1936; Edwards, 1947; Larsell, 1953; Rouvière, 1961; Woodburne, 1973.

QUADRO VI
SINTOPIA DO RAMO SUPERIOR DO NERVO OCULOMOTOR COM OS
NERVOS CRÂNICOS QUE SE RELACIONAM LATERALMENTE A ELE

TIPOS	NERVOS	AUTORES
1	nasal e nasociliar	Debierre, 1890
2	lacrimal	Heitzmann, 1896; Barnhill, 1940
3	trocLEAR	Boutigny, 1901; Cunéo, 1904; Valenti, 1912; Falcone, 1931; Luna, 1932; Walmsley, 1936; Edward, 1947; Larsell, 1953; Rouvière, 1961; Lockhart, 1965; Woodburne, 1973.
4	frontal e nasociliar	Fazzari, 1914.
5	trocLEAR e frontal	Toldt, 1948
6	trocLEAR e nasociliar	Durward, 1964
7	nasociliar	Wolff, 1955; Testut & Jacob, 1977; Testut & Latarjet, 1978.
8	ausência de nervo crânico	Lakke, 1962.

QUADRO VII
SINTOPIA DO RAMO SUPERIOR DO NERVO OCULOMOTOR COM OS
NERVOS CRÂNICOS QUE SE RELACIONAM INFERIORMENTE A ELE

TIPOS	NERVOS	AUTORES
1	nasociliar e ramo inferior do oculomotor	Debierre, 1890; Durward, 1964;
2	ramo inferior do oculomotor	Heitzmann, 1896; Fazzari, 1914; Edwards, 1947; Toldt, 1948; Larsell, 1953; Wolff, 1955; Lakke, 1962; Lockhart, 1965; Testut & Jacob, 1977; Testut & Latarjet, 1978.
3	nasociliar	Boutigny, 1901; Valenti, 1912.
4	nasociliar e abducente	Cunéo, 1904; Hovelacque, 1927; Falcone, 1931; Luna, 1932.
5	abducente	Rouvière, 1961; Woodburne, 1973;
6	ausência de nervo crânico	Walmsley, 1936; Barnhill, 1940;

QUADRO VIII
SINTOPIA DO RAMO SUPERIOR DO NERVO OCULOMOTOR
COM OS NERVOS CRÂNICOS QUE SE RELACIONAM MEDIALMENTE A ELES

TIPOS	NERVOS	AUTORES
1	nasociliar	Hovelacque, 1927; Walmsley, 1936.
2	ausência de nervo	Debierre, 1890; Heitzmann, 1896; Boutigny, 1901; Cunéo, 1904; Valenti, 1912; Fazzari, 1914; Falcone, 1931; Luna, 1932; Edwards, 1947; Toldt, 1948; Larsell, 1953; Rouvière, 1961; Lakke, 1962; Durward, 1964; Lockhart, 1965; Woodburne, 1973; Testut & Jacob, 1977; Testut & Latarjet, 1978.

QUADRO IX
SINTOPIA DO RAMO INFERIOR DO NERVO OCULOMOTOR, COM OS
NERVOS CRÂNICOS QUE SE RELACIONAM SUPERIORMENTE A ELE

TIPOS	NERVOS	AUTORES
1	ramo superior do oculomotor e vasociliar	Debierre, 1890.
2	ramo superior do oculomotor	Heitzmann, 1896; Fazzari, 1914; Edwards, 1947; Toldt, 1948; Larsell, 1953; Wolff, 1955; Lakke, 1962; Durward, 1964; Lockhart, 1965; Testut & Jacob, 1977; Testut & Latarjet, 1978.
3	nasociliar	Boutigny, 1901; Woodburne, 1973.
4	nasociliar e abducente	Cunéo, 1904; Valenti, 1912; Hovelacque, 1927; Falcone, 1931; Luna, 1932
5	frontal	Barnhill, 1940
6	abducente	Rouvière, 1961
7	ausência de nervo crânico	Walmsley, 1936

QUADRO X
SINTOPIA DO RAMO INFERIOR DO NERVO OCULOMOTOR COM OS
NERVOS CRÂNICOS QUE SE ENCONTRAM LATERALMENTE A ELE

TIPOS	NERVOS	AUTORES
1	abducente e nasociliar	Debierre, 1890; Fazzari, 1914; Wolff, 1955; Durward, 1964; Testut & Jacob, 1977; Testut & Latarjet, 1978
2	abducente	Boutigny, 1901; Hovelacque, 1927; Walmsley, 1936; Edwards, 1947; Larsell, 1953; Lockhart, 1973.
3	frontal	Toldt, 1948
4	nasociliar	Lakke, 1962
5	ausência de nervo crânico	Heitzmann, 1896; Cunéo, 1904; Valenti, 1912; Falcone, 1931; Luna, 1932; Rouvière, 1961

QUADRO XI
SINTOPIA DO RAMO INFERIOR DO NERVO OCULOMOTOR COM OS
NERVOS CRÂNICOS QUE SE RELACIONAM INFERIORMENTE A ELE

TIPOS	NERVOS	AUTORES
1	abducente	Heitzmann, 189; Wolff, 1955; Lakke, 1962.
2	ausência de nervo crânico	Valenti, 1912; Fazzari, 1914; Hovelacque, 1927; Falcone, 1931; Luna, 1932; Walmsley, 1936; Barnhill, 1953; Rouvière, 1961; Durward, 1964; Lockhart, 1965; Woodburne, 1973; Testut & Jacob, 1977; Testut & Latarjet, 1978.

QUADRO XII
SINTOPIA DO RAMO INFERIOR DO NERVO OCULOMOTOR COM OS
NERVOS CRÂNICOS QUE SE RELACIONAM MEDIALMENTE A ELE

TIPOS	NERVOS	AUTORES
1	abducente	Hovelacque, 1927; Barnhill, 1940; Rouvière, 1961; Lockhart, 1965;
2	ausência de nervo crânico	Debierre, 1890; Heitzmann, 1896; Boutigny, 1901; Cunéo, 1904; Valenti, 1912; Fazzari, 1914; Falcone, 1931; Luna, 1932; Walmsley, 1936; Edwards, 1947; Toldt, 1948; Larsell, 1953; Wolff, 1955; Lakke, 1962; Woodburne, 1973; Testut & Jacob, 1977; Testut & Latarjet, 1978

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas 30 hemicabeças de indivíduos adultos e do sexo masculino, das quais 15 do lado direito e 15 do lado esquerdo, escolhidas ao acaso, fixadas em formol a 10%. Houve a remoção dos encéfalos e ressecção das hemicalotas, para facilitar o acesso à região da fissura orbitária superior.

Procedeu-se à dissecação sob um esteromicroscópio OPMI-1 (Zeiss), com o aumento de 10 vezes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados sobre a bifurcação do nervo oculomotor, antes ou depois de cruzar a fissura orbitária superior, estão na tabela 01.

TABELA 01
DISTRIBUIÇÃO DO NERVO OCULOMOTOR,
SEGUNDO SUAS CARACTERÍSTICAS E LADOS

LADOS \ CARACTERÍSTICAS	TRONCO	BIFURCADO	TOTAL
	Esquerdo	08	07
Direito	07	08	15
TOTAL	15	15	30

Em 15 casos (50%), observou-se que o nervo oculomotor não se bifurcava ao cruzar a fissura orbitária superior, como alguns autores mostram (SAPPEY, 1880; PEREIRA-GUIMARÃES, 1894; ANILE, 1919; PITRES & TESTUT, 1925; ANSON, 1963; MURAKAMI, 1965; PERNKOPF & PICHLER, 1968; WARWICK & WILLIAMS, 1973; SPALTEHOLZ & TORTELLA, 1976; SOBOTTA & BECHER, 1977). Nos outros 15 casos (50%), encontrou-se o nervo oculomotor bifurcado neste nível, confirmando o que outros autores afirmam (DÉBIERRE, 1890; HEITZMANN, 1896; BOUTIGNY, 1901; CUNÉO, 1904; VALENTI, 1912; FAZZARI, 1914; HOVELACQUE, 1927; FALCONE, 1931; LUNA, 1932; WAMSLEY, 1936; BARNHILL, 1940; EDWARDS, 1947; TOLDT, 1948; LARSELL, 1953; WOLFF, 1955; ROUVIÈRE, 1961, LAKKE, 1962; DURWARD, 1964; LOCKHART, 1965; WOODBURNE, 1973; TESTUT & JACOB, 1977; TESTUT & LATARJET, 1978).

Pode-se observar, também, que esta característica (estar bifurcado ou não ao nível da fissura orbitária superior) não está relacionada com o lado da hemiface, apesar de esta observação não ser um dos objetivos deste trabalho.

Os dados sobre a sintopia do nervo oculomotor, como tronco único, com os nervos crânicos ao nível da fissura orbitária superior estão na tabela 02.

TABELA 02
DISTRIBUIÇÃO DOS NERVOS QUE SE RELACIONAM COM O TRONCO DO NERVO OCULOMOTOR, SEGUNDO SUAS POSIÇÕES

NERVOS \ POSIÇÕES	POSICÕES			
	SUPERIOR	LATERAL	INFERIOR	MEDIAL
IV	03	02	02	00
IV e nasociliar	00	06	00	00
IV e frontal	00	02	00	00
VI	00	00	09	00
VI e nasociliar	00	00	01	00
Nasociliar	00	01	01	00
Nasociliar e frontal	00	02	00	00
Ausência	12	02	02	15
TOTAL	15	15	15	15

Nas 15 peças em que o nervo oculomotor não se bifurcou antes de cruzar de fissura orbitária superior, houve 4 casos (13%) semelhantes ao tipo 1 e 11 casos (36%) semelhantes ao tipo 2 do quadro I.

Houve 2 casos (6%) semelhantes ao tipo 1, 2 casos (6%) semelhantes ao tipo 5 e 2 casos (6%) semelhantes ao tipo 6 do quadro II. Não foi encontrado nenhum caso semelhante aos tipos 2, 3 e 4 do quadro II, mas foram encontrados casos de tipos diferentes dos descritos neste quadro: 6 casos (20%) de nervo troclear e nasociliar; 2 casos de nervo troclear e frontal; 1 caso (3%) de apenas nervo nasociliar.

Nestas mesmas peças houve 9 casos (30%) semelhantes ao tipo 1 e 2 casos (6%) semelhantes ao tipo 2 do quadro III. Foram encontrados também tipos de sintopia que não foram citados no quadro III: 1 caso (3%) de nervo abducente e nasociliar; 1 caso (3%) de nervo nasociliar; 2 casos de nervo troclear.

O tipo 1 do quadro IV foi encontrado em todas as peças onde o nervo oculomotor não se bifurcou antes de cruzar a fissura orbitária superior.

TABELA 03
DISTRIBUIÇÃO DOS NERVOS QUE SE RELACIONAM COM O
RAMO SUPERIOR DO NERVO OCULOMOTOR SEGUNDO SUAS POSIÇÕES

NERVOS	POSIÇÕES			
	SUPERIOR	LATERAL	INFERIOR	MEDIAL
Ramo inferior do III	00	00	14	00
Ramo inferior do III e nasociliar	00	00	01	00
IV	03	08	00	00
IV e nasociliar	00	03	00	00
IV e frontal	00	01	00	00
Frontal	00	03	00	00
Ausência	12	00	00	15
TOTAL	15	15	15	15

Nas peças em que o nervo oculomotor cruzou a fissura orbitária superior dividido em ramos superior e inferior, houve 3 casos (10%) semelhantes ao tipo 1, nenhum caso semelhante ao tipo 2 e 12 casos (40%) semelhantes ao tipo 3 do quadro V.

Encontraram-se 8 casos (26%) semelhantes ao tipo 3, 1 caso (3%) semelhante ao tipo 5, 3 casos (10%) semelhantes ao tipo 6 e nenhum caso semelhante aos tipos 1, 2, 4, 7 e 8 do quadro VI, mas houve 3 casos (10%) com um tipo diferente de sintopia, apenas com o nervo frontal.

Houve 14 casos (46%) semelhantes ao tipo 2, 1 caso (3%) semelhante ao tipo 1 e nenhum caso semelhante aos tipos 3, 4, 5 e 6 do quadro VII.

Nestas peças todos os casos confirmaram o tipo 2 do quadro VIII.

TABELA 04
DISTRIBUIÇÃO DOS NERVOS QUE SE RELACIONAM COM O
RAMO INFERIOR DO NERVO OCULOMOTOR, SEGUNDO SUAS POSIÇÕES

NERVOS	POSIÇÕES			
	SUPERIOR	LATERAL	INFERIOR	MEDIAL
Ramo superior do III	15	00	00	00
Nasociliar	00	06	00	00
Nasociliar e frontal	00	02	00	00
Nasociliar e lacrimal	00	01	00	00
Nasociliar e VI	00	00	01	00
Frontal	00	04	00	00
VI	00	02	09	00
Ausência	00	00	05	15
TOTAL	15	15	15	15

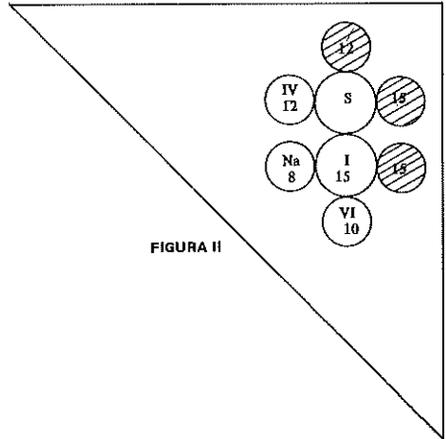
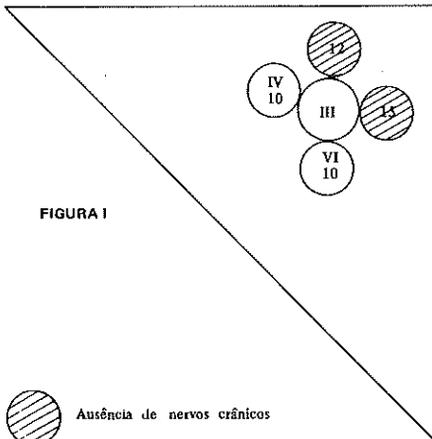
Nas peças em que o ramo inferior do nervo oculomotor foi encontrado, houve 15 casos (50%) semelhantes ao tipo 2 e nenhum caso semelhante aos outros tipos do quadro IX.

Houve 2 casos (6%) semelhantes ao tipo 2, 4 casos (13%) semelhantes ao tipo 3, 6 casos (20%) semelhantes ao tipo 4 e nenhum caso semelhante aos tipos 1 e 5 do quadro X, e foram encontrados 2 tipos diferentes dos citados no referido quadro: 2 casos (6%) de nervos nasociliar e frontal; 1 caso (3%) de nervos nasociliar e lacrimal.

Foram encontrados 9 casos (30%) semelhantes ao tipo 1 e 5 casos (16%) semelhantes ao tipo 2 do quadro XI, além de 1 caso (3%) diferente dos tipos citados nesse quadro.

Nestas peças, todos os casos foram semelhantes ao tipo 2 do quadro XII.

A seguir, são apresentadas 2 figuras que mostram os nervos que são encontrados com maior frequência em sintopia com o nervo oculomotor ou com os ramos superior e inferior deste, ao nível da fissura orbitária superior.



Ausência de nervos crânicos

A figura 01 é um esquema da sintopia do nervo oculomotor como tronco único, ao nível da fissura orbitária superior.

A figura 02 é um esquema da sintopia dos ramos superior e inferior do nervo oculomotor, também ao nível da fissura orbitária superior.

Os algarismos arábicos representam a frequência dos nervos nas posições indicadas, os algarismos romanos representam os nervos crânicos, e as letras "S" e "I" representam os ramos superior e inferior do nervo oculomotor, respectivamente.

CONCLUSÕES

Com base nas observações das microdissecações das 30 hemicabeças, pode-se concluir que:

1) O nervo oculomotor pode cruzar a fissura orbitária superior como tronco (50%) ou bifurcado (50%) em seus ramos superior e inferior.

2) A sintopia do nervo oculomotor como tronco apresentou algumas variações ao cruzar a fissura orbitária superior. Superiormente, encontrou-se 1 único tipo de relação, observado em 3 casos, em que o nervo troclear estava presente. Lateralmente, encontram-se 5 tipos de relações, e o nervo mais freqüente foi o troclear. Inferiormente, encontraram-se 4 tipos de relações, e o nervo mais freqüente foi o abducente. Medialmente, não se encontrou nenhum nervo.

3) A sintopia do ramo superior do nervo oculomotor também apresentou algumas variações. Superiormente, encontrou-se apenas 1 tipo, e em 3 casos, em que o nervo que estava presente era o troclear. Lateralmente, encontraram-se 4 tipos de relações, e o nervo mais freqüente foi o troclear, em 12 casos. Inferiormente, encontraram-se 2 tipos, e o ramo inferior do nervo oculomotor foi encontrado nos 15 casos. Medialmente, não se encontrou nenhum nervo.

4) A sintopia do ramo inferior do nervo oculomotor é menos variável. Superiormente, encontrou-se sempre o ramo superior do nervo oculomotor. Lateralmente, encontraram-se 5 tipos de relações, e o nervo mais freqüente foi o nasociliar, em 9 casos. Inferiormente, encontraram-se 2 tipos de relações, e o nervo encontrado em maior número de vezes foi o abducente, em 10 casos. Medialmente, não se encontrou nenhum nervo.

REFERÊNCIAS

- ANILE, A. *Anatomia sistemática dell'uomo*. Napoli, Elpis, 1919.
- ANSON, B. J. *Atlas of human anatomy*. 2. ed. Philadelphia, W. B. Saunder, 1963.
- BARNHILL, J. F. & MELLINGER, W. J. *Surgical anatomy of the head and neck*. 2. ed. Baltimore, Willi & Wilkins, 1940.
- BOUTIGNY, *Tableaux synoptiques d'anatomie topographique et chirurgicale*. Paris, J. B. Baillièrre et Fils, 1901.

- CUNÉO, B. *Les nerfs*. In: POIRIER, P. & CHARPY, A., eds. **Traité d'anatomie humaine**. Boulevard, Masson, 1904. v.3
- DEBIERRE, C. **Traité élémentaire d'anatomie de l'homme**. Paris, Félix, Alcan, 1890, v. 2.
- DURWARD, A. The peripheral nervous system. In: ROMANES G. J., ed. **Cunningham's textbook of anatomy**. 10 ed. London, Oxford University Press, 1964.
- EDWARDS, L. F. **Concise anatomy**. Philadelphia, Blakiston, 1947.
- FALCONE, C. **Trattato di anatomia umana**. Milano, Francesco Valardi, 1931. v. 3.
- FAZZARI, I. **Anatomia sistematica dell'uomo**. Milano, Società Editrice Libreria, 1914.
- HEITZMANN, C. **Anatomia umana descrittiva e topografica**. 2. ed. Roma, Società Editrice Dante Alighieri, 1896.
- HOVELACQUE, A. **Anatomie des nerfs craniens et rachidiens et du systemè grand sympathique**. Paris, Gaston Doin, 1927.
- INTERNATIONAL ANATOMICAL NOMENCLATURE COMMITTEE. **Nomina anatomica**. 4. ed. Amsterdam, Excerta Medica, 1977.
- LAKKE, J. P. W. F. Superior orbital fissure syndrone. **Arch. Neurol.**, 7: 239-300, 1962.
- LARSELL, O. The nervous system. In: SHAEFFER, J. P., ed. **Morris'human anatomy**. 11. ed. New York, Mc Graw-Hill, 1953.
- LOCKHART, R. D. et al. — **Anatomia humana**. México, Interamericana, 1965.
- LUNA, E. **Trattato di anatomia umana**. 2. ed. Milano, Francesco Vallardi, 1932. v. 5.
- MURAKAMI, I. Decompression of the superior orbital fissure. **Amer. J. Ophthal.**, 59: 803-8, 1965.
- PEREIRA-GUIMARÃES, J. **Tratado de anatomia descriptiva**. Rio de Janeiro, H. Laemmert, 1894, v. 3.
- PENKOPF, E. & PICHLER, A. **Anatomia topográfica humana**. Barcelona, Labor, 1968, v. 4.
- PITRES, A. & TESTUT, L. **Les nerfs en schémas**. Paris, Octave Doin, 1925.
- ROUVIÈRE, H. **Anatomia humana descriptiva y topográfica**. 6. ed. Madrid, Bailly-Bailliere, 1961. v. 1.
- SAPPEY, C. **Trattato di anatomia descrittiva**. Napoli, Enrico Detken, 1880. v. 3.
- SOBÓTTA, J. & BECHER, H. **Atlas de anatomia humana**. 17. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. v. 3.

- SPALTEHOLZ, W. & TORTELLA, P. E. **Atlas de anatomia humana**. 10. ed. Barcelona, Labor, 1976. v. 3.
- TESTUT, L. & JACOB, O. **Tratado de anatomia topográfica com aplicaciones medicoquirúrgicas**. 8. ed. Barcelona, Salvat, 1977. v. 1.
- TESTUT, L. & LATARJET, A. **Tratado de anatomia humana**. Barcelona, Salvat, 1978.
- TOLDT, C. **Atlas of human anatomy**. 2. ed. New York, McMillan, 1948. v. 2.
- VALENTI, G. **Compendio di anatomia dell'uomo**. Milano, Francesco Valardi, 1912, V. 2
- WALMSLEY, T. **Manual of practical anatomy**. London, Longmans, 1936, v. 3.
- WARWICK, R. & WILLIAMS, P. L., eds. — **Gray's anatomy**. 35. ed. London, Longman, 1973.
- WOLFF, E. **Anatomy of the eye and orbit**. 4. ed. New York, Blakistor, 1955.
- WOODBURNE, R. T. **Essential of human anatomy**. 5. ed. New York, Oxford University Press, 1973.

SISTEMA PARA MANUSEIO DE MEMÓRIAS EPROM

PAULO DE TARSO SICA DE TOLEDO *
NESTOR CHARLES FERNANDES **

RESUMO

Desenvolvemos uma interface acoplável a microcomputadores, para gravar memórias do tipo EPROM com aplicações diversas. Os principais fatos levados em consideração foram a versatilidade do aparelho e a facilidade do uso.

ABSTRACT

An interface which can be coupled to a microprocessor was developed in order to register memories of the type EPROM, with the possibility of various applications. The principal facts considered during the said development were the versality of the apparatus and its simple use.

INTRODUÇÃO

Quando temos que desenvolver microcomputadores ou reprogramá-los, deparamos com uma barreira técnica que consiste em como gravar as memórias ou, então, regravar com programa novo as já existentes, realizando as novas funções desejadas.

A Unidade Central de Processamento (CPU) é considerada o "coração" dos microcomputadores, pois comanda todo o sistema; no entanto, quem diz à CPU o que fazer são as instruções armazenadas em memórias programáveis/apagáveis somente de leitura (EPROM's), daí a necessidade de se desenvolver um gravador para estas.

* Professor do Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá
Caixa Postal 331 – CEP 87.100 – MARINGÁ (PR) - BRASIL

** Mestrando em Engenharia Elétrica na Universidade Federal de Santa Catarina
Avenida Santa Catarina, 194 – 88.000 – FLORIANÓPOLIS (SC) - BRASIL

O CIRCUITO

Utilizou-se o microcomputador existente no Departamento de Física (CP 500 da Prológica), na tentativa de abranger todos os tipos de Memórias EPROM existentes no mercado.

O circuito projetado é mostrado na FIGURA 1, que apresenta o diagrama em blocos dos principais componentes.

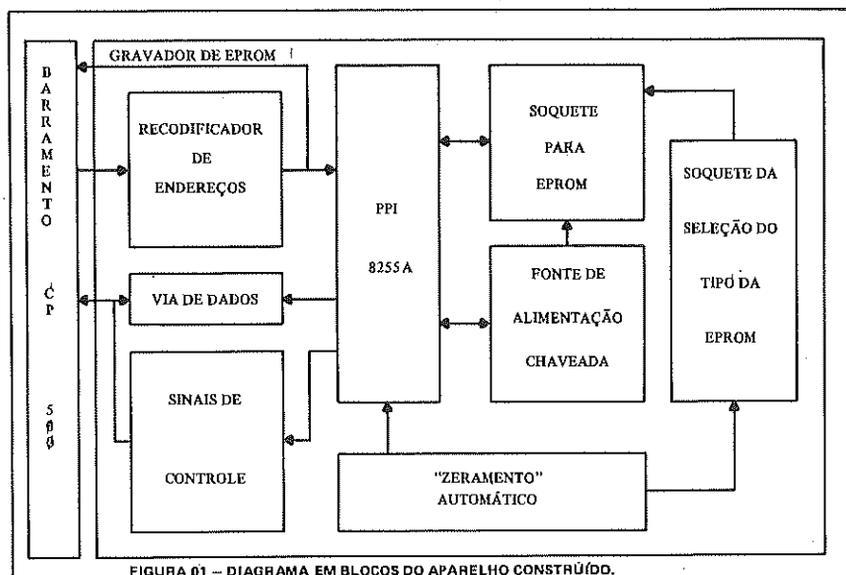
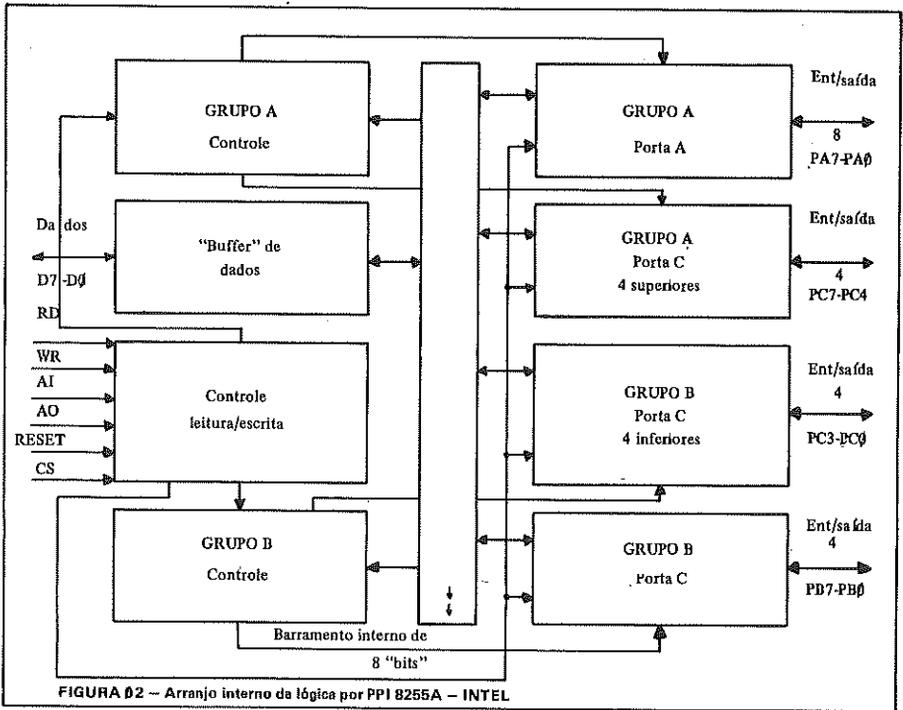


FIGURA 01 - DIAGRAMA EM BLOCOS DO APARELHO CONSTRUIDO.

Nessa figura se destaca o uso do circuito integrado 8255A, que é uma interface periférica programável (PPI), que consiste num sistema de entradas/saídas programáveis de uso geral, com vinte e quatro pinos para estas funções, que podem ser programados em dois grupos de doze pinos e possuem três modos de operação. Pelo primeiro (Modo 0), cada grupo de doze pinos é programado em três grupos de quatro, para serem entradas ou saídas. Pelo segundo (Modo 1), eles são programados em três grupos de oito, como entradas ou saídas. Finalmente, pelo terceiro (Modo 2), teremos oito canais para barramento bidirecional e cinco para comunicação e sinais de controle.

Nos três modos de operação, se o dispositivo não estiver selecionado, todos os vinte e quatro pinos de entradas/saídas estarão no modo alta impedância (tri-state). A FIGURA 2 mostra o diagrama interno e a disposição dos pinos na pastilha.



Outra parte de real importância é a distribuição de funções nos pinos das memórias EPROM utilizadas. Como mostra a FIGURA 3, temos as pinagens das memórias mais usadas, sendo que todas possuem 24 pinos. Por esta razão, o aparelho possui um único soquete para elas (soquete do tipo Textool zero-force).

Como podemos notar, somente alguns pinos possuem funções diversas entre as memórias. Para solucionar este inconveniente, foi desenvolvido um módulo que consta de um soquete e quatorze pinos DIP (dual-in-line), onde são encaixados módulos para cada tipo de EPROM a ser utilizado. Este sistema foi o que apresentou melhor performance em termos de custo e funcionalidade, não ocupando endereços de programação e facilitando, assim, o projeto.

Para a comutação das tensões de programação/leitura, foi utilizado um relé, pelas mesmas justificativas apresentadas para o módulo de seleção da EPROM.

O aparelho utiliza alguns endereços de programa para seu funcionamento, conforme TABELA 1, que os apresenta e detalha a sua função.

"Byte" de controle	Resposta na 8255A	Função
00	zera PC0	zera EPROM end. A8
01	ajusta PC0	ajusta EPROM end. A8
02	zera PC1	zera EPROM end. A9
03	ajusta PC1	ajusta EPROM end. A9
04	zera PC2	zera EPROM end. A10
05	ajusta PC2	ajusta EPROM end. A10
06	zera PC3	zera EPROM end. A11
07	ajusta PC3	ajusta EPROM end. A11
08	zera PC4	desliga os 25,5V
09	ajusta PC4	liga os 25,5V
0A	zera PC5	desliga os 5V
0B	ajusta PC5	liga os 5V
0C	zera PC6	relé no modo programação
0D	ajusta PC6	relé no modo leitura não usado
0E	zera PC7	não usado
0F	ajusta PC7	não usado
80	Todas as portas na 8255 no modo entrada	modo programação
82	Portas A e C no modo saída; porta B no modo entrada	modo leitura

TABELA 01 — Principais endereços de programa.

O microcomputador adotado, como já se salientou na introdução deste trabalho, foi o CP 500 da Prológica, que não permite entradas e saídas de dados antes de usarmos algumas palavras de controle, que são apresentadas na TABELA 2, com suas respectivas funções. Além disso, ele requer um pulso de retorno no pino denominado EXTIOSEL (*External Input/Output Select*), todas as vezes que uma operação de entrada ou saída estiver em andamento.

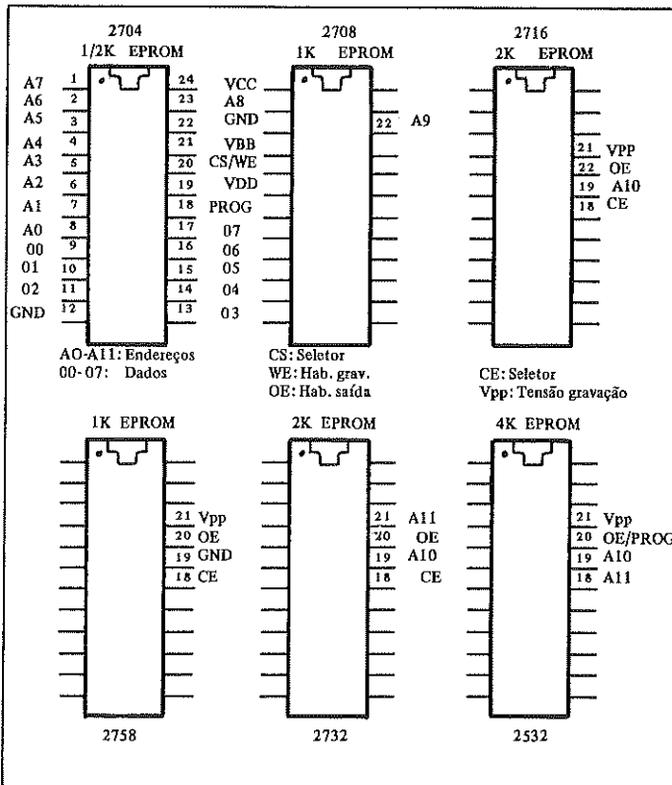
CP 500	Função	Porta do CP 500	Porta do 8255
OUT 236,16 Pino 43 do barramento	modo saída de dados EXTIOSEL — deve estar no nível baixo toda vez que uma operação de entrada estiver em andamento	F8H F9H FAH FBH	A B C Controle

TABELA 02 — Palavras de controle, com suas respectivas funções, utilizadas no CP 500, que permitem a entrada e saída de dados.

MICRO-SINEX SOFT & HARD SELEÇÃO INICIAL
A. Leitura da EPROM B. Teste de desgravação C. "Cross-reference" D. Comparação EPROM x RAM E. Gravação dos dados F. Leitura dos dados G. Mover blocos de leitura H. Gravação da EPROM I. Gravação da 2708 J. Saída na tela K. Entrada pelo teclado L. Listagem do diretório do disco M. Retorno ao sistema operacional

TABELA 03 – Principais funções que o equipamento é capaz de realizar.

Todo o "software" utilizado foi elaborado em ASSEMBLER ("Machine Code"), e as principais funções que o equipamento é capaz de realizar são mostradas na TABELA 03, onde temos o "menu" principal do programa.



MEMÓRIA	LEITURA					GRAVAÇÃO		
	18	19	20	21	18	19	20	21
2704, 2708	0	12	0	-5	25,5	12	12	-5
2758, 2716	0	A10	0	5	5	A10	5	25,5
2732	0	A10	0	A11	5	A10	25,5	A11
2532	A11	A10	0	0	A11	A10	5	25,5

FIGURA 03: Funções dos pinos para as memórias do tipo EPROM.

RESULTADOS

Foram feitos diversos testes com as memórias EPROM, para uso em equipamentos já existentes e para os novos microcomputadores por nós projetados e construídos. Todos os testes provaram a eficiência do aparelho. Todavia, notou-se a necessidade de anexar a ele um sistema com lâmpada ultravioleta para efetuar o apagamento das memórias. Isto facilita o seu uso, tornando-o auto-suficiente, podendo-se, desta forma, ler, gravar ou apagar memórias do tipo EPROM.

BIBLIOGRAFIA

- Intel Component Date Catalog. Intel Corporation, 1978.
- Mc CAUL, E. L. — TRS-80 Assembly Language Made Simple. Howard W. Sams & CO., Inc. Indianópolis.
- PROLÓGICA — CP 500. Manual Técnico.
- The TTL Date Book for design luginners. Second Edition. Texas Instruments Incorporated, 1976.
- Voltage Regulator Handbook. National Semiconductor Corporation, 1982.

ALGUNS ASPECTOS DA REPRODUÇÃO AMPLIADA NO MODO DE PRODUÇÃO CAPITALISTA, SEGUNDO A VISÃO MACRODINÂMICA DE KALECKI

SÍLVIO ANTONIO F. CÁRIO*
OSCAR HISAO ITO**

RESUMO

Este artigo procura analisar o modelo de Kalecki sobre a dinâmica econômica do sistema capitalista. Deste modo, examinam-se os determinantes do lucro e do investimento, a função do consumo dos capitalistas e a presença do setor externo e do governo. Finalmente, procura-se discutir a aproximação do raciocínio kaleckiano ao marxista, e suas diferenças em relação ao keynesiano.

ABSTRACT

This article analyses the Kalecki's model about the economic dynamics of the capitalist system. Thus the determinants of the profit and investment, the function of capitalists' consumption and the presence of the external sector and of the government are examined. Finally, it discusses the approximation of Kaleckian argumentation to Marxist system and their differences respecting the Keynesian one.

1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste "paper" é discutir as concepções de Kalecki sobre a dinâmica do sistema capitalista. Apesar de apresentarem fundamental importância para explicação do movimento do capital, as teorias de Kalecki foram praticamente esquecidas, mesmo sendo pioneiras em relação às teorias de Keynes, amplamente divulgadas. Somente nestes últimos anos é que a repercussão de sua teoria movimentou o mundo acadêmico e colocou em discussão a sua validade.

A razão para o esquecimento deve-se ao fato de que sua formação teórica é marxista, portanto de crítica ao sistema capitalista, frente a uma gama de economistas de Cambridge que procuravam não só "justificar" o regime, mas também preservá-lo.

A veracidade de suas formulações tem invertido o cenário teórico e colocado em discussão, frente a frente, os economistas contemporâneos. O tema dis-

* Departamento de Ciências Econômicas da Universidade Federal de Santa Catarina
Caixa Postal 476 – CEP 88.000 – Florianópolis – Santa Catarina

** Departamento de Economia da Universidade Estadual de Maringá
Caixa Postal 331 – CEP 87.100 – Maringá – Paraná

cutido envolve uma série de questões pertinentes hoje ao mundo capitalista e, para tanto, são discutidos separadamente os fatores que determinam a reprodução ampliada do capital no modo de produção capitalista.

Assim, são analisados os determinantes do lucro, o papel do consumo dos capitalistas, o nível de investimento e a presença do comércio externo e do Estado na dinâmica capitalista.

Finalmente, é discutido o grau de aproximação do raciocínio kaleckiiano ao marxista, e suas diferenças frente às concepções keynesianas.

2. DETERMINANTES DO LUCRO

Os determinantes do lucro (P) numa economia capitalista são os gastos efetuados pela classe capitalista e o nível de investimento:

$$P = I + Cc \quad (1)$$

Esta equação simplificada é sustentada pelas seguintes suposições:

- a) a economia é fechada;
- b) a sociedade é dividida em duas classes: os capitalistas e os trabalhadores;
- c) todo salário auferido pelos trabalhadores é gasto em consumo;
- d) não há formação de estoque de produtos não vendidos;
- e) a economia é dividida em 3 setores, sendo que o departamento I produz bens de investimento, o departamento II produz bens de consumo para os capitalistas e o departamento III produz bens de consumo para os trabalhadores;
- f) cada departamento produz os bens finais e intermediários.

É interessante salientar a diferença entre a concepção de Kalecki e a de Marx sobre a produção de bens intermediários, pois, enquanto Marx, na divisão da economia em dois setores — Departamento I (bens de capital) e Departamento II (bens de consumo) —, atribuía a produção de matérias-primas, em sua totalidade, ao Departamento I, Kalecki a rateia pelos três departamentos (JOBIM, 1981).

Assim sendo, o valor da produção dos departamentos refere-se ao valor agregado, composto de lucro bruto (P) e dos salários (W), ou seja, o Departamento I, produtor de bens de investimento (I), obtém o lucro P_1 e o salário W_1 , o Departamento II, produtor de bens de consumo dos capitalistas (Cc), obtém P_2 e W_2 , e o Departamento III, produtor de bens de consumo para os trabalhadores (Cw), obtém P_3 e W_3 .

Dep. I	Dep. II	Dep. III	TOTAL
P_1	P_2	P_3	P
W_1	W_2	W_3	W
I	Cc	Cw	Y

O salário W_3 do Departamento III é destinado à compra de bens de consumo deste departamento. A diferença do valor da produção deste departamento ($C_w - W_3 = P_3$) é destinada aos trabalhadores dos Departamentos II e III, que compram os bens de consumo com seus salários W_1 e W_2 . Assim, o lucro do Departamento III está em função dos gastos dos trabalhadores dos Departamentos I e II:

$$P_3 = W_1 + W_2 \quad (2)$$

Acrescentando P_1 e P_2 , respectivamente lucros dos Departamentos I e II nos dois lados da equação (2), tem-se, de um lado, o total do lucro da economia, e, de outro, os salários dos Departamentos I e II (W_1 e W_2) adicionados aos respectivos lucros (P_1 e P_2).

$$P_1 + P_2 + P_3 = W_1 + P_1 + W_2 + P_2 \quad (3)$$

Então:

$$P = I + C_c \quad (4)$$

Esta equação representa o esquema de reprodução kaleckiano. Os capitalistas obterão o lucro em função de quanto gastarem em consumo e investimento.

É interessante salientar que os gastos dos trabalhadores não fomentam o lucro, visto que os trabalhadores compram os bens de consumo com os salários obtidos pela venda de sua força de trabalho. Essa venda é equivalente ao montante de salários, pois "os trabalhadores gastam o que ganham e os capitalistas ganham o que gastam" (MIGLIOLI, 1980).

A análise feita até agora refere-se ao modelo simplificado de determinação do lucro. Para se alcançar a versão completa devem-se abandonar algumas hipóteses e adicionar outras. Para passar a uma situação real, deve-se considerar a economia não mais como um sistema fechado, e os gastos públicos e a poupança da parte dos trabalhadores como não sendo desprezíveis.

Partindo da ótica da contabilidade social, apresentam-se de um lado da razão os componentes da renda interna, e de outro lado os componentes da despesa interna bruta, assim expressos:

Salários (deduzidos os impostos diretos)	Investimento bruto
Lucros brutos (deduzidos os impostos diretos)	Saldo da balança comercial
Impostos (diretos e indiretos)	Despesa governamental
	Consumo dos capitalistas e dos trabalhadores
RENDA INTERNA BRUTA	DESPESA INTERNA BRUTA

Acrescentam-se pelo lado da renda os tributos diretos e indiretos, única fonte de receita do Governo, e os impostos diretos, que incidem sobre os salários e os lucros.

Acréscimos também são feitos no lado da despesa: os gastos do Governo em bens e serviços e os investimentos públicos, no item despesa governamental, e os valores das exportações subtraídos dos valores das importações, na determinação do saldo da balança comercial.

Supondo que os salários sejam iguais ao consumo dos trabalhadores e que o montante de tributos seja igual à despesa governamental, podem-se eliminar estes itens de suas colunas, "... se os salários excedem o consumo dos trabalhadores, ou seja, se os trabalhadores poupam uma parte de seus salários, esta poupança entra com sinal positivo na coluna da esquerda ou com sinal negativo na coluna da direita, eliminando-se os itens 'salários' e 'consumo dos trabalhadores' de suas respectivas colunas, visto que a poupança dos trabalhadores = salários - consumo dos trabalhadores" (MIGLIOLI, 1981). Considere-se ainda que, "... se os tributos arrecadados pelo Governo fossem maiores do que sua despesa, haveria um saldo orçamentário do Governo; sendo menores do que a despesa, há um déficit orçamentário, o qual é registrado na coluna da direita (com sinal positivo)" (MIGLIOLI, 1981).

Seguindo-se este raciocínio, obtém-se a seguinte equação:

$$\text{lucro bruto} \left(\begin{array}{l} \text{deduzidos os} \\ \text{impostos} \end{array} \right) = \left\{ \begin{array}{l} \text{investimento bruto} \\ + \text{ consumo dos capitalistas} \\ + \text{ saldo de exportação} \\ + \text{ déficit orçamentário do Governo} \\ - \text{ poupança dos trabalhadores} \end{array} \right.$$

No modelo simplificado, os lucros eram determinados pelo investimento mais o consumo dos capitalistas; no modelo completo, os lucros são determinados não só pelo investimento e pelo consumo dos capitalistas, mas também pelo saldo de exportação mais o déficit orçamentário do Governo menos a poupança dos trabalhadores.

No entanto, supondo que tanto o orçamento governamental como o comércio exterior são equilibrados, e que os trabalhadores não poupam, obtém-se a mesma relação do modelo simplificado:

$$\text{lucro bruto} \left(\begin{array}{l} \text{deduzidos os} \\ \text{impostos} \end{array} \right) = \left\{ \begin{array}{l} \text{investimento bruto} \\ + \text{ consumo dos capitalistas} \end{array} \right.$$

Assim sendo, o lucro bruto, deduzidos os impostos, expressa um sistema mais realista e compreensível, podendo-se, a partir disso, concluir que, na visão kaleckiana, os lucros são determinados pelo nível de investimento da economia e pela intensidade do consumo dos capitalistas (KALECKI, 1976).

3. A FUNÇÃO DO CONSUMO DOS CAPITALISTAS

O consumo constitui, na teoria kaleckiana, uma forma de abrir novas áreas para acumulação de capital e estimular antigas. O consumo dos capitalistas é explicado por Kalecki através da seguinte equação:

$$C_{ct} = A + q P_{t-z} \quad (5)$$

onde:

C_{ct} = consumo dos capitalistas no período t

A = consumo autônomo

P_{t-z} = lucro no período anterior a t

q = relação entre o consumo no período t e o lucro no período anterior

Esta equação evidencia que o consumo dos capitalistas no período t é uma função linear dos lucros no período anterior.

A variável A da primeira parte da equação refere-se ao consumo do período t independentemente dos níveis de lucro. A outra parte da equação, $q P_{t-z}$, indica o consumo dos capitalistas em função do lucro obtido no período anterior. Esta relação é direta: se os lucros forem elevados, a parcela do consumo aumenta; caso contrário, o consumo diminui (KALECKI, 1976).

O coeficiente q será sempre menor que 1, pois, "os capitalistas não gastam todos seus lucros exclusivamente em consumo, então seu consumo no período t é menor do que os lucros no período t - z" (MIGLIOLI, 1981).

Kalecki supõe que A e q apresentam um comportamento constante.

Substituindo a equação (5) na equação (4), indicativa do lucro total em função do investimento e consumo do capitalista, obtém-se:

$$P_t = I_t + A + q P_{t-z} \quad (6)$$

Supondo que A e q sejam constantes, tem-se:

$$P_t = I_t + P_{t-z} \quad (7)$$

O lucro no período t é função do investimento do mesmo período e do lucro do período anterior.

Diante deste raciocínio, pode-se afirmar que os lucros acompanham os investimentos dentro de certo intervalo de tempo x, pois o lucro no período anterior t - z é função do investimento nesse mesmo período e do lucro no período t - 2z. Resumindo este raciocínio, a equação se reduz a:

$$P_t = f(I_{t-x}) \quad (8)$$

Diante disto, pode-se concluir que os investimentos constituem a variável dinâmica da economia capitalista, pois o consumo dos capitalistas torna-se variável secundária no modelo, pela constância de A e q.

4. FATORES DETERMINANTES DO NÍVEL DE INVESTIMENTO

Keynes afirmou que a taxa de juros da economia constituía o determinante do nível de investimento. Kalecki buscou razões mais fortes do que esta para

explicar as decisões dos capitalistas sobre os investimentos.

Para Kalecki, os determinantes do investimento eram: "a) a poupança interna bruta das empresas, a qual depende do seu próprio capital e consiste fundamentalmente dos lucros não distribuídos e das reservas de depreciação; b) a variação dos lucros ao longo do tempo, estimulando (ou restringindo) o investimento quando os lucros crescem (ou diminuem); e c) a variação do volume de capital fixo ao longo do tempo". (MIGLIOLI, 1980).

Considerando separadamente cada um dos determinantes do investimento, observa-se que o primeiro fator, poupança interna bruta das empresas, está intimamente relacionada com o processo de acumulação de capital interno. A geração de excedente numa determinada economia leva os capitalistas a empregá-lo em investimento produtivo, que, quando necessário, auxiliado pelos financiamentos externos, conduz a uma maior concentração de capital. Neste sentido, Kalecki considera as decisões de investir em capital, D , como uma função crescente da poupança bruta, S_t .

O segundo fator refere-se às variações dos lucros. A existência do lucro por unidade de tempo estimula o capitalista a levar em consideração projetos anteriormente não-lucrativos, ampliando desta forma os planos de investimento da empresa; quando ocorre o inverso, os planos de investimento são deixados para uma fase posterior ou até abandonados. Desta forma, pode-se afirmar que as decisões de investir, D , é função crescente das variações nas taxas de lucro por unidade de tempo, $\frac{\Delta P}{\Delta t}$.

O terceiro fator refere-se à variação do volume de capital fixo por unidade de tempo, $\frac{\Delta K}{\Delta t}$. Tal relação apresenta-se de forma decrescente, devido ao comportamento do capital fixo em certas atividades. Em determinados ramos ocorre um aumento de sua participação, e em outros ramos uma diminuição, ocasionando um desestímulo para o investimento. Assim, segundo Kalecki, quanto maior for o volume de capital fixo aplicado, menor será o estímulo para o investimento.

Este raciocínio encontra respaldo na seguinte afirmação: "... da mesma forma que uma elevação dos lucros dentro do período considerado torna convidativos projetos de investimento adicional, a acumulação de equipamentos tende a restringir os limites dos planos de investimento. Esse efeito pode ser visto com mais facilidade quando novas empresas entram no ramo e dessa forma fazem com que os planos de investimento das firmas estabelecidas há mais tempo fiquem menos atraentes". (KALECKI, 1976).

Assim, tem-se a seguinte relação:

$$D_t = a S_t + b \frac{\Delta P}{\Delta t} - c \frac{\Delta K}{\Delta t} + d \quad (9)$$

onde:

D = decisões de investimento

S = poupança bruta

$$\frac{\Delta P}{\Delta t} = \text{variação na taxa de lucro}$$

$$\frac{\Delta P}{\Delta t} = \text{variação na taxa de capital fixo}$$

d = modificações de longo prazo

A equação (9), explicativa dos determinantes do investimento em Kalecki, está em função crescente da poupança bruta, S, e da taxa de variação do lucro, $\frac{\Delta P}{\Delta t}$, e em função decrescente da taxa de variação no estoque de capital fixo, $\frac{\Delta K}{\Delta t}$.

Substituindo D_t por $I_t + v$, ou seja, substituindo as decisões de investir pelo montante efetivamente investido, onde $t + v$ refere-se ao período posterior à tomada de decisões, obtém-se o seguinte:

$$I_{t+v} = a S_t + b \frac{\Delta P}{\Delta t} - c \frac{\Delta K}{\Delta t} + d \quad (10)$$

Os coeficientes a, b e c determinam quanto da variável considerada pode ser canalizado para o investimento.

A relevância desta equação encontra-se em dois aspectos: primeiro, na capacidade de as empresas financiarem suas expansões via poupança; segundo, no fato de a expansão do mercado proporcionar modificações no montante de lucro e de capital fixo.

(KALECKI, 1977), considera, além dos fatores determinantes do investimento, a presença das inovações tecnológicas como mais um fator que influencia nas decisões de investimento dos capitalistas. A crescente presença da diversificação tecnológica conduz o capitalista a constantes investimentos novos, para aumentar sua participação no mercado e obter maiores vantagens em relação a seus concorrentes.

Qual o motivo da não-inclusão da taxa de juros na equação dos determinantes do investimento?

Para compreender o motivo pelo qual Kalecki considerou a taxa de juros como secundária na decisão de investimento, devem-se entender inicialmente as diferenças de tipos de taxas de juros, os fatores que as determinam e suas correlações com o nível de investimento.

A taxa de juros apresenta-se sob duas formas: a curto e a longo prazo. A primeira refere-se ao custo dos empréstimos associados às letras de câmbio e aos depósitos bancários, e a segunda refere-se aos custos dos empréstimos vinculados a debêntures e a obrigações do tesouro nacional. Ambas dependem do comportamento da oferta e da demanda de empréstimos, e os tomadores comparam as alternativas que se apresentam.

A curto prazo, as taxas de juros são instáveis e os empréstimos necessitam de constantes renovações, ao passo que, a longo prazo, elas são constantes e

apresentam relativa estabilidade.

A taxa de juros a longo prazo é composta de:

$$r = ie + h \quad (11)$$

onde:

r = taxa de juros de longo prazo

ie = taxa de juros

h = taxa de risco

A taxa de risco (h) varia inversamente à taxa de juros (ie), e a estabilidade decorre do fato de que "... dentro de um ciclo econômico as mais altas taxas reais de juros de curto prazo se encontram na fase ascendente do ciclo (quando são maiores os volumes de transação) e as mais baixas se encontram na fase descendente, de modo que o valor de ie é elevado durante a prosperidade e reduzido durante a depressão; com a taxa de risco h acontece o contrário. Na fase de prosperidade, quando reina o otimismo no 'mundo dos negócios' o risco nos empréstimos de longo prazo parece menor e, portanto, a taxa h diminui; na fase de depressão, a situação é oposta" (MIGLIOLI, 1981).

Diante desta observação, pode-se perceber o motivo por que a taxa de juros não é considerada relevante no modelo kaleckiano.

Tendo em vista a estabilidade da ie a longo prazo, ou seja, no período caracterizado como um ciclo econômico, os capitalistas, ao tomarem empréstimos, farão comparações entre a taxa de lucro e a taxa de juros, e somente quando a esperada taxa de lucro for superior à taxa de juros dos empréstimos é que eles tomarão sua decisão de investimento. Se a ie não apresenta oscilações, deixa de ser importante nas decisões, passando a taxa de lucro a ser a variável determinante do nível de investimento.

5. O COMÉRCIO EXTERIOR E O ESTADO NA DINÂMICA CAPITALISTA

O modelo kaleckiano completa-se a partir da introdução do setor externo e do governo em suas hipóteses básicas.

No modelo completo pode-se observar que o elemento determinante do lucro que se apresenta como o de mais difícil controle por parte dos capitalistas é o saldo de exportações.

As exportações constituem a realização externa para a mais-valia criada internamente e tornam-se o mecanismo que os capitalistas utilizam para assegurar os lucros "externos"

"A luta pela divisão dos mercados externos existentes e a expansão dos impérios coloniais, que propicia novas oportunidades para a exportação de capital ligada à exportação de bens, pode ser vista como um esforço para se obter um salário positivo, na balança comercial, a fonte clássica de lucros externos". (KALECKI, 1976).

Embora seja difícil de alcançar, o saldo positivo na balança comercial é objeto de toda uma política econômica governamental. Mas os capitalistas não

detêm o controle total desta variável, pois, apesar de as políticas internas serem estimuladoras de exportações, elas dependem dos países importadores.

Se os capitalistas não podem ter controle completo do comércio exterior, o mesmo já não se pode afirmar com relação ao Estado. No capitalismo, o econômico determina o político, e, desta forma, o Estado é controlado pelos capitalistas. Com esse controle, os capitalistas exercem o domínio sobre o orçamento governamental, em seu próprio benefício.

A atuação governamental restringe-se fundamentalmente a estimular a demanda efetiva (bens de produção x bens de consumo). O denominado déficit governamental constitui uma arma que os capitalistas utilizam para reativar a economia. O déficit financiado por empréstimos estimula a demanda efetiva, que resulta na elevação dos lucros, dos empregos, dos salários e da renda nacional.

6. APROXIMAÇÃO DO RACIOCÍNIO KALECKIANO AO MARXISTA E SUAS DIFERENÇAS EM RELAÇÃO AO KEYNESIANO

O raciocínio kaleckiano está embutido dentro de uma ideologia marxista, principalmente a partir da teoria da acumulação.

Keynes, por sua vez, entregou-se a uma luta incessante para fugir das influências da economia clássica, apesar de ele ser considerado, para muitos teóricos, como um caso particular desta escola.

Estas diferenciações teóricas estão associadas ao comprometimento com o sistema capitalista. Enquanto Kalecki não tinha nenhum comprometimento para a manutenção do sistema capitalista, Keynes procurou introduzir reformas como o intuito não só de salvá-lo, como também de preservá-lo.

Kalecki demonstra a sua formação marxista ao dividir a sociedade em duas classes, a dos capitalistas e a dos trabalhadores, evidenciando, a partir disso, a sua preocupação com a distribuição funcional da renda. Também a partir da divisão marxista da economia em dois setores (bens de produção e bens de consumo). Kalecki, para melhor entendimento, subdivide o setor de bens de consumo em bens de consumo para capitalistas e bens de consumo para trabalhadores.

Posição contrária é a de Keynes, que trata a sociedade como um conjunto de indivíduos e considera a renda agregada. Demonstrou preocupação com a distribuição da renda entre os capitalistas, ou seja, entre os que aplicam com fins produtivos e os que aplicam em atividades especulativas, as quais não contribuem para a expansão da atividade econômica.

Sabendo que o sistema capitalista não se interessa pela igualdade e conhecendo o comportamento decrescente a taxa de mais-valia a partir da luta de classes, Kalecki afirma que o sistema jamais estaria interessado no pleno emprego. Nesta situação, aumenta-se o poder de negociação dos trabalhadores por melhores salários, conduzindo a uma redistribuição da renda a seu favor.

Por sua vez, Keynes já propunha um final feliz para o sistema, desde que as políticas econômicas fosse aplicadas racionalmente: "... nossos netos poderiam se dedicar inteiramente às artes e aos prazeres da vida". (ROBINSON, 1977).

A visão kaleckiana é dinâmica e a longo prazo. Os monopólios deteriam, dependendo do seu grau, poder sobre os preços, a produção e as inovações tecnológicas, controlando assim a economia capitalista.

A visão keynesiana é estática, a curto prazo, e permanece presa aos modelos de livre concorrência, não discutindo o papel das inovações tecnológicas.

A teoria keynesiana da preferência pela liquidez evidencia preocupação com a incerteza do futuro, devido à qual as pessoas deveriam esperar uma oportunidade adequada para investirem. Kalecki, por sua vez, não se preocupa com estes mecanismos monetários, e sim com as decisões de investimentos e com o acesso aos financiamentos.

Existem, porém, alguns pontos de concordância entre o pensamento kaleckiano e o keynesiano. Enquanto o montante de investimento, para os neoclássicos, era determinado pela poupança e pela taxa de juros, para Kalecki e Keynes os investimentos, além de gerarem a poupança, são a variável fundamental para explicar o nível de renda para a economia capitalista. Conforme ROBINSON (1977), "em uma economia capitalista moderna, a acumulação não é controlada por poupanças familiares, mas por decisões de investimento das firmas, que visam maximizar os lucros"

Ademais, Keynes e Kalecki viam na ação governamental a saída para a crise do sistema capitalista e estavam preocupados com o problema da demanda efetiva.

7. CONCLUSÃO

O realismo com que Kalecki expõe os determinantes do lucro pode ser entendido pela própria forma de exposição: inicialmente, numa economia fechada, o consumo dos capitalistas e o nível de investimento são os primeiros influenciadores; quando se analisa uma economia aberta, é necessário incluir o saldo de exportação, o déficit governamental e a poupança dos trabalhadores.

Considerando que o orçamento governamental e o comércio externo são equilibrados e que os trabalhadores não poupam, visto que seus salários servem apenas para a reprodução da força de trabalho, a equação geral dos lucros, quer numa economia simples, quer numa economia complexa, será dada em função do nível de investimento e da intensidade dos gastos dos capitalistas.

Por seu lado, a intensidade de consumo dos capitalistas passa a ser, no próprio desenvolvimento do modelo, variável secundária, pois os capitalistas não gastam seus lucros exclusivamente em consumo, deixando que o nível de investimento constitua a variável dinâmica do sistema capitalista.

Tendo em vista que o nível de investimento é o motor da reprodução ampliada desejada pelo sistema capitalista, pergunta-se: Quais são as principais variáveis que determinam o investimento?

Kalecki expõe uma série de variáveis explicativas, tais como decisões de investimento, poupança bruta, variação na taxa de lucro, variação na taxa de capital

fixo e inovações tecnológicas, relegando a segundo plano a famosa taxa de juros do modelo keynesiano.

A própria lei imposta pelo capitalismo, denominado por Marx de lei coercitiva externa, exige que estas variáveis sejam constantemente fomentadas pelo capitalista, se este não desejava ver seu capital centralizado nas mãos de outro capitalista, que obedece fielmente a este “jogo de vida ou morte”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- JOBIM, A. J. Michal Kalecki e a economia contemporânea. *Revista de Economia Política*. São Paulo, 1(2): 111-137, abr/jun. 1981.
- KALECKI, M. Teoria da dinâmica econômica. in: KEYNES, John M. et al. *Ensaio econômico*. São Paulo, Abril Cultural, 1976. p. 55-207.
- *Crescimento e ciclo das economias capitalistas*. São Paulo, HUCITEC, 1977. 193 p.
- MIGLIOLI, J. (Org.) *Kalecki: economia*. São Paulo, Ática, 1980. 224 p. (Grandes Cientistas Sociais, 16).
- MIGLIOLI, J. *Acumulação de capital e demanda efetiva*. São Paulo, T. A. Queiroz, 1981. 301 p.
- ROBINSON, J. Michal Kalecki, um profeta esquecido. *Ensaio de Opinião*. Rio de Janeiro, 4 : 24-31, 1977.

A ESCOLARIZAÇÃO NO MEIO RURAL E SUA RELAÇÃO COM O TRABALHO

SANDINO HOFF*

JANE FADEL GRACIOSO**

LEILA LEANE LOPES LEAL***

Universidade Estadual de Maringá

Departamento de Educação

Caixa Postal 331 – 87.100 – Maringá – Paraná – Brasil

ABSTRACT

This paper identifies the meaning of education as administered to rural populations considered as pioneers in the region. Therefore, its theme is schooling in rural areas; here we have different types of work occupying these populations. The vital problem deals with the meaning of the different kind of work established in the coffee plantations, in the modernization of agriculture and in the feasibility or infeasibility of public schooling in rural areas.

RESUMO

Este estudo procura identificar o significado da educação escolar para os habitantes da zona rural, originariamente identificados como "pioneiros" da região. O tema é, pois, educação no campo, na medida em que contém o movimento das diferentes modalidades de trabalho daquelas populações. A questão básica refere-se ao significado das formas de trabalho estabelecidas na produção cafeeira e na posterior modernização da agricultura e a sua determinação na (in)viabilidade da escolarização no meio rural.

INTRODUÇÃO

A educação no Brasil vem sendo objeto de reflexões e teorizações em vários sentidos, começando a ter expressão tendências teóricas que abordam a questão educacional levando em conta a relação sociedade-escola, trabalhada, embora de forma insuficiente, a partir das teorias crítico-reprodutivistas, se aceitamos a classificação proposta por Saviani (SAVIANI, 1983).

* Professor do Departamento de Educação da UEM.

** Aluna do curso de Mestrado em Educação da UNIMEP.

*** Aluna do curso de Pedagogia da UEM.

Esta articulação, à medida que expressa a dinâmica em várias direções - uma articulação entre instâncias estruturais - remete o pesquisador a um quadro mais geral e mais efetivo, pelo qual se pode entender e explicar a educação com mais propriedade. Tal articulação necessita quebrar os limites das particularidades fechadas. Para isso, buscamos uma lógica da totalidade, em que os significados vão aparecendo e podem se afastar do diâmetro do específico, quebrando as barreiras de um campo do saber e atingindo outros, não para tratar o seu específico de forma reduzida aos outros, mas para enriquecer-se. Tal necessidade, então, não deixa de criar problemas e de realizar-se sob um grande esforço do pesquisador.

Dentro desta preliminar metodológica é que propomos este estudo sobre educação-escolarização no meio rural, no município de Maringá, procurando identificar seu sentido e importância para os habitantes da zona rural, originária e predominantemente identificados como "pioneiros" da região.

O primeiro lote rural do município de Maringá foi vendido em 1938, o que configura uma história recente. Por isso, se, por um lado, há a facilidade de se contar com pessoas-fontes, "testemunhas", há, por outro lado, escassez de estudos precedentes, o que dificulta o trabalho a que nos propomos.

O tema educação no campo pode reverter-se a um tratamento que negue o processo educacional escolar no campo, ou que tome a educação no campo adaptada à cidade, ou, ainda, que a trate até de forma exageradamente afirmativa frente à educação formal. O entendimento de que essa educação é um fenômeno urbano, já pela concentração demográfica desse meio, já pelas necessidades de função do homem da cidade, e de que a cidade constitui a força hegemônica na relação cidade-campo desde o advento do capitalismo, leva a pensar no primeiro ou no segundo tratamento como mais adequado.

Estas direções serão contempladas nesse estudo à medida que o movimento educacional, por sua vez, contiver o movimento das relações de trabalho e das formas de produção da vida material daquelas populações. Nesse sentido, uma idéia geral e provisória serve de guia à investigação, e a expressaremos como segue: as diversas relações de trabalho estabelecidas na produção cafeeira, inicialmente, e a modernização das culturas de soja e trigo, bem como a pecuária, posteriormente, conformam o leito em que correram as expectativas dos trabalhadores rurais quanto à escolarização dos seus filhos. Isto é, a expectativa pela educação entre os camponeses é alimentada, mesmo que indiretamente, pelas suas atividades produtivas. Não podemos, entretanto, negar a riqueza das relações sociais e o seu significado como um comprovante também do tecido dessas aspirações. O jogo dessas influências tentará ser especificado e captado em suas tendências.

O período a que corresponde o nosso estudo é o constituído pelas décadas de 40 a 80. Fez-se incursão por períodos anteriores, à medida que se revelou útil voltar ao passado a partir do presente, isto é, de modo seletivo e ditado pela necessidade do presente.

PROBLEMA – RAÍZES E DEFINIÇÃO

É comum ouvir que foi a produção cafeeira, no Norte do Paraná, que produziu a riqueza da região. Alguns pesquisadores trabalham a temática com tal linha de argumentação.¹

Se se pode constatar a acumulação de riquezas na região, mesmo não se questionando a sua distribuição desigual, não se pode, contudo, constatar a presença continuada do café na construção dessa riqueza: sua produção foi substituída pela produção de soja e pela criação de gado.

Esta problemática, de desdobramentos complexos com referência à produção cafeeira, que também estabeleceu as relações de trabalho (colonato, formação de café-empregado, café-porcentagem, etc.), e com referência às adaptações das forças produtivas às novas condições que o capital impôs aos trabalhadores rurais, constituiu objeto de estudo anterior.² Três idéias substantivas foram captadas nesse estudo: uma, a da incessante procura, por parte do trabalhador rural, de autonomia para organizar seu trabalho e de ser proprietário de terra independente; outra, a do movimento dos interesses do capital, que subordina todas as formas de trabalho existentes, até sob a aparência não-capitalista, ao curso do capitalismo; outra, ainda, a da acumulação capitalista, que, por um lado, destruiu a pequena propriedade e a produção direta do trabalho familiar, e, por outro lado, concentrou as terras em empresas rurais e instituiu o assalariamento dos trabalhadores.

Esta investigação, voltada como estava para captar as raízes da acumulação da riqueza na região, à medida que pôde aproximar-se do trabalhador, enquanto categoria econômica, não apenas como proprietário da força de trabalho ou como proprietário de terras, mas como categoria civil de chefe de família, organizador da distribuição ou do uso da força de trabalho familiar, aproximou-se de outro aspecto da questão: a educação dos filhos dos trabalhadores rurais.

Neste instante cabem umas perguntas, que começam a nos aproximar do problema básico de nossa investigação: Que bases concretas estariam a sustentar o desinteresse inicial expresso pelos pioneiros com respeito à educação dos seus filhos? Que bases concretas estariam, por outro lado, a sustentar a ausência de ofensivas educacionais no tocante à abertura de escolas na região, por parte das classes dirigentes (prefeitos, vereadores, colonizadora, cerealistas, etc.)? Que sentido assume tal educação, se confrontada a outras expressões de sua vida, como o trabalho, por exemplo?

Outro dado acrescentamos agora aos iniciais daquele estudo, qual seja, a constatação de que ao desinteresse inicial dos pioneiros pela escola parece ter-se oposto, em épocas posteriores, um fenômeno de significado contrário: a lenta abertura de escolas na região, em decorrência da "grita" crescente dos moradores por elas. Num período de aproximadamente uma década, observa-se um movimento

1 France Luz: "O Fenômeno Urbano numa Zona Pioneira", e Nadir Cancian: "Cafecultura Paranaense: 1900-1970".

2 Sandino Hoff: "O Movimento da Produção de Excedentes numa Região Pioneira."

que tende da indiferença pela escola e da preponderância do trabalho sobre ela à reivindicação pela escola e à conservação do trabalho, mesmo em novos moldes.

Este movimento aponta questões que continuam a série já começada e que participam da nossa questão central, que enunciaremos ao final: O que ocorreu no mundo do trabalho no campo, em suas diversas formas, de modo a influenciar o interesse dos pais pioneiros rurais pela escola? A escola que "atendeu" às populações rurais teria acompanhado o movimento do capital no processo da implantação do capitalismo no campo, isto é, no processo de modernização agrícola, de mudança da produção, de concentração de terras e de esvaziamento populacional rural?

Essas questões apontam o fundamental de nossa investigação: captar o significado da escolarização no meio rural. Enfim, pode-se dizer que, à medida que as classes dirigentes, mesmo de forma indireta, impunham aos trabalhadores rurais uma situação que se expressa predominantemente em trabalho duro e intenso, os trabalhadores repunham outra situação, exigindo escolas para seus filhos? A escolarização dos filhos dos agricultores colocar-se-ia, então, de permeio a esta imposição-reposição?

Dessa forma, a questão básica a ser investigada se refere ao seguinte: Qual o significado das relações de trabalho estabelecidas na produção cafeeira e na posterior modernização da agricultura e qual a sua determinação na (m)viabilidade da escolarização no meio rural, considerando o possível movimento da imposição/reposição dos participantes dessas relações?

INCURSÃO TEÓRICA PRELIMINAR

A compreensão e possível explicação do tema que nos propusemos estudar - a escolarização no meio rural e sua relação com o movimento da produção agrícola - nos coloca diante do alinhamento de duas grandes ordens de problemas teóricos: aqueles presos à terra, ao "locus" em que se dá o fenômeno educacional, e aqueles vinculados ao próprio educacional. É claro que, quando falamos da terra, estamos nos referindo a todo o processo humano que está contido nesse "locus", que produz as condições materiais de subsistência e que, de certa forma, influencia a vida, o pensamento, a cultura e a educação das pessoas que nele vivem.

Tentaremos, pois, rastrear algumas idéias que julgamos úteis nesse contexto. Iniciamos pelo aspecto que podemos chamar de estrutural, para, em seguida, nos ocuparmos dos aspectos superestruturais, na medida em que seja possível tal separação didática.

O acesso à terra - meio de produção tão necessário à autonomia do agricultor quanto o instrumental para o artesanato - foi a motivação principal dos trabalhadores agrícolas sem terra na época da colonização de Maringá e região. Ao se concretizar a conquista da terra, a própria compra do lote rural tornou-se obstáculo para o novo proprietário: ao gastar o primeiro capital na compra da terra e sem dispor de um segundo capital, teve que recorrer a outros mecanismos para fazer a terra produzir. A superação do entrave dava-se, em primeiro lugar, pelo trabalho familiar intensivo aliado à privação. Em segundo lugar, a superação dava-se pelo es-

tabelecimento de formas desiguais de trabalho: no caso do café-porcentagem, o proprietário utilizava o trabalho alheio sem remunerá-lo, apropriando-se da maior parte do produto à época da colheita; no caso da empreita-formação de café, o proprietário da terra entregava ao empreiteiro a terra, durante 5 ou 6 anos, o empreiteiro derrubava a mata, plantava café e cuidava da planta, cabendo-lhe os frutos da colheita durante os anos de contrato, findo o qual devolvia a terra ao proprietário, mas não só devolvia a terra, como também deixava ela toda uma infraestrutura: estradas, casinha de morar, tulha e um cafezal formado; o proprietário da terra esperava 5 ou 6 anos, não investia capital e recebia o cafezal pronto.

Dessa maneira, num e noutro caso, o dono da terra superava o entrave, sem investir capital. No caso da empreita, agora ele é proprietário de terra e de um cafezal; é proprietário e capitalista ao mesmo tempo; pode, agora, assalariar o trabalhador rural. Ou, no caso do café porcentagem, se não tiver um segundo capital, pode entregar ao meeiro a terra em que está formado o cafezal.

Apesar das aparências não-monetárias que caracterizavam as relações de produção do café, revela-se o movimento do capital, revela-se o que está oculto na produção do excedente: fazer avançar as forças produtivas na agricultura pioneira e camuflar a contradição capital-trabalho, criando formas não-monetárias de pagamento pela formação do café e pelo arrendamento da terra.

Por isso, a questão fundamental não é apenas investigar as formas particulares que submeteram o trabalho ao capital, mas procurar analisar como elas foram úteis ao capital, num dado momento da história, para propiciar o excedente. Dessa maneira, é o processo geral de todas as relações de produção mercantil sob o domínio do capital que determina o conteúdo a ser investigado, porque determina o conteúdo a ser investigado, porque determina o conteúdo do movimento do capital.

Este movimento iniciou-se com a instalação, no município de Maringá, de 3.096 lotes rurais com menos de 15 alqueires de área, de 346 lotes de 15 a 30 alqueires e de 215 lotes com mais de 30 alqueires. Os lotes rurais foram ocupados rapidamente. Os dados de 1960 registram 56.539 habitantes rurais em Maringá.

Ao final da década de 60, na região de Maringá, muitos trabalhadores rurais foram se afastando do campo. A progressiva destruição da pequena propriedade também modificou as relações de trabalho. A produção direta sob o trabalho familiar - a pequena propriedade e as formas desiguais - cedeu lugar ao trabalho assalariado do "bóia-fria". Produtores diretos, diante de situações difíceis, como a ocorrência de geadas, os altos custos de inseticidas, adubos, empréstimos bancários, máquinas e sementes, foram sendo expulsos da região rural. Esse fato parece confirmar a análise de Marx, que, apontando as várias causas que arruinam a pequena propriedade, destaca a "usurpação pelos grandes proprietários de terras (...)", a concorrência da agricultura em grande escala da empresa capitalista..." (Marx, 1977).

A acumulação capitalista inicia-se com o processo histórico que dissocia o trabalhador dos meios de produção, e termina no assalariamento do traba-

lhador. Por isso, considera-se a pequena propriedade rural como “estádio necessário ao desenvolvimento da agricultura” (Marx, 1977). Por ser apenas uma fase, o movimento do capital a supera e a destrói, num processo dialético.

Outro elemento valioso no nosso contexto, e de certa forma já abordado, parece ser a questão decorrente da destruição da pequena propriedade de produção direta pelo capitalismo, quando os pequenos proprietários se tornavam, de certa forma, economicamente estáveis e passavam a constituir um mercado consumidor de produtos industrializados (3). Então, por que se destruíam a pequena propriedade de produção imediata quando ela parecia criar um mercado consumidor? Não seria melhor, em termos capitalistas, proteger, ao invés de destruir, a produção direta e manter este mercado, que, por sua vez, produzia mercadoria para o mercado externo? O esvaziamento demográfico verificado nesta região rural na época da concentração da propriedade de terras, quando, do Paraná, migram um milhão e meio de pessoas, não acarretaria a ausência de mercados internos? Arruinando-se a economia camponesa não se arruinaria, também, o mercado interno, principalmente considerando-se a instabilidade que ocorria no mercado externo do café? Nossa inquietação é respondida abaixo.

Lenin desenvolveu a teoria do desenvolvimento de capitalismo a partir de dados empíricos, estatisticamente comprovados, e, para uma sociedade de base agrícola, trata desse aspecto da função do mercado interno na forma que exporemos simplificadamente a seguir.

O processo de emergência do capitalismo, numa sociedade de base agrária, está a demonstrar que a ruína dos pequenos produtores diretos — proprietários ou não — não implica a liquidação do mercado interno para o capitalismo. Ao contrário, a destruição da pequena produção é uma consequência do “processo de emergência e evolução do capitalismo, que promove a industrialização e que acelera e aprofunda os antagonismos que, já existentes no bojo da comunidade camponesa, desintegram o campesinato e liberam massas para a formação do proletariado”. (Lenin, 1983).

À luz desse raciocínio, nosso questionamento sobre a existência e a destruição de um mercado interno relacionado ao consumo das massas no norte do Paraná pode ser tratado de forma mais adequada, como seja: o desenvolvimento do mercado interno não se vincula diretamente à capacidade de consumo das massas; o que lhe é decisivo é o grau do “consumo produtivo” e a “demanda de meios de produção”, isto é, o desenvolvimento dos meios de produção nas mãos dos capitalistas e a consequente subordinação do trabalhador. (Lenin, 1983).

O processo de formação do capitalismo no Norte do Paraná parece ter seguido o caminho da gradual retirada dos meios de produção das mãos dos pequenos proprietários rurais. Estes foram subordinados ao capital industrial e comercial, com o intuito da produção da mais-valia. Diz Lenin:

3. Não é desconhecida a ofensiva estimuladora do consumo pelas populações rurais por parte das lojas de Maringá, que mantinham veículos à disposição dos consumidores, para levá-los de volta às suas residências.

A transformação do pequeno produtor a operário assalariado pressupõe que tenha perdido os meios de produção-terra, instrumentos de trabalho, etc., quer dizer, seu "em pobrecimento"; sua ruína". (Lenin, 1983).

Com isto, parece que se caminha no quadro do desenvolvimento do capitalismo, que agrega em si um componente demográfico expresso no movimento das populações campo-cidade: "O capitalismo, pois, é inimaginável sem o crescimento da população industrial e comercial às expensas da população agrícola . . ." (Lenin, 1983).

A ruína da pequena propriedade rural de produção imediata na região em estudo parece dever-se ao movimento do capitalismo: a população rural ou procura outras frentes pioneiras ou se assalaria na cidade ou no campo, como "bóia-fria". Como a educação acompanha esse movimento?

José de Souza Martins, em sua obra "A valorização da escola e o trabalho no meio rural" (4) trata da problemática do trabalho e da escolarização no meio rural sob o teor das representações dos agentes. No seu entender, o significado da escolarização no meio rural está estreitamente associado às condições históricas do trabalho produtivo. Constatou que, em determinado momento da história rural, houve desinteresse dos trabalhadores rurais pela escola. Essa atitude alterou-se acompanhando as alterações das suas condições de trabalho. A escola seria valorizada porque ler, escrever e contar se tornam atividades necessárias ao ajustamento social. Seria o envolvimento da população em relações indispensáveis, através da mercadoria, com a sociedade. E, na economia do excedente, em que o trabalho é principalmente produtor de valores, de valores de uso, a escola tende a sofrer rejeição, uma vez que tende a "fechar-se sobre si mesma", circunscrita a relações sociais diretas e pessoais, tanto para o intercâmbio de bens como da força de trabalho. Neste âmbito, a mensagem escolar não seria captada. A escola não teria utilidade, não ajudaria a vida do campo; seria dura e contumaz como o trabalho.

Lia Fukui, ao pesquisar, entre as populações urbanas e rurais de São Paulo, o nível de escolarização, educação formal e procura educacional, constatou não existirem diferenças significativas, segundo o local de residência, quanto ao desempenho efetivo dos pais na escolaridade dos filhos. A pesquisadora, em seu estudo, conclui: "As opiniões dos informantes que mostram empenho efetivo na escolaridade dos filhos, ao que tudo indica, estão mais associadas às escolas como um instrumento de sobrevivência do que de ascensão social." (Fukui, 1979).

Apesar dos momentos diferenciados que foram captados pelos autores acima assinalados, hão de se ver os aspectos comuns entre eles: o fator trabalho como responsável por um tipo de concepção que se faz da escola; a idéia de que a escola é percebida como instrumental necessário, sem o qual se torna difícil competir no mercado de trabalho; a constatação de que a escola é mais valorizada quando se estabelece a dinâmica do processo de urbanização em curso.

4. In: Capitalismo e Tradicionalismo, 1976, p. 83-98.

Se o fator trabalho na lavoura é importante na análise da escolarização podemos concluir que os fatores econômicos são os que mais marcam e definem os momentos e as situações a partir dos quais as famílias assumem e manifestam opiniões.

Concordamos com o pressuposto de Arroyo (1981), na sua pesquisa sobre as relações entre educação e trabalho, segundo o qual a reconstrução história da relação educação-trabalho seria parcial se vista apenas pelo ângulo do Estado — classes dirigentes e suas políticas. Ele deixa supor a necessidade de resgatar o papel político do povo na história (que a historiografia trata geralmente de ocultar), de se considerar o papel ativo e não passivo do povo no estabelecimento das políticas educacionais. Escreve ele: “Esquecemos que o Estado e seus intelectuais e educadores passam a orientar sua política levando em conta o comportamento das pressões dessas classes (classes subalternas)”. (Arroyo, 1981).

Então, é necessária a observação dessa trajetória das classes populares no campo. É preciso saber como as classes se põem frente ao problema da escolarização. Ao realizar um estudo sobre o movimento da escolarização no meio rural — e nele se coloca determinada população a manifestar suas opiniões como uma das fontes empíricas da investigação — é preciso ter presente o contexto sócio-econômico em que essa população está inserida.

José de Souza Martins desenvolve a tese de que a escola é comparada ao trabalho para os filhos dos agricultores paulistas. Em outras palavras, há o trabalho da lavoura e o trabalho da escola, conforme sua análise da representação dos entrevistados. Dirigimos nossa hipótese nesta direção: o trabalho da escola contrapõe-se ao trabalho da lavoura.

Um outro elemento interessante ao nosso estudo é o contido na tese de Antônio Cândido sobre “equilíbrio social”. Esse autor fundamenta toda a ação trabalhadora da família rural. Para ele, então, o equilíbrio social depende da correlação entre necessidades básicas e sua satisfação.

Como a educação aparece nesse “equilíbrio social”? Ao nível das idéias sobre a educação, em termos nacionais, difundiu-se a crença de que a educação é fator de desenvolvimento (anos 20 a 60), e o pensamento pedagógico orientava-se para a reconstrução social, numa sociedade aberta e justa.

Supõe-se que os chefes de família, à época pioneira, objetivavam organizar o trabalho familiar na lavoura de tal modo que pudessem produzir os meios necessários para a vida material. Esta era a responsabilidade que se impunha. O pai de família tinha a responsabilidade de garantir, de um lado, a satisfação das necessidades da família e, de outro lado, o controle do número de necessidades básicas.

Observa-se em Antuniassi a idéia sobre o aspecto negativo da relação escola-trabalho, evidentemente nos termos deste quadro: “A incorporação precoce à atividade de trabalho tem conseqüências bastante negativas em relação à escolarização do trabalhador rural”. (Antuniassi, 1983).

Por outro lado, Costa Pinto sublinha o papel positivo para a sociedade agrária tradicional desempenhado pela ignorância: “A ignorância desempenha um

papel fundamental estrutural e perfeitamente definido. (Costa Pinto, 1970).

Ao retomar um aspecto do pensamento liberal que considera a educação como fator de desenvolvimento, como entender a escolarização do meio rural na região em estudo? Terá a população rural permanecido na fase de negação da escola? Havia época em que era preciso fazer a população rural permanecer no campo, e a escola aparecia como um instrumento adequado ao cumprimento dessa função, que teve expressão no "ruralismo pedagógico" do começo do século e que parece ter tido continuidade até a década de 60 na política educacional e agrícola. Em época posterior, com a penetração do capitalismo no campo, a escola teve que ser reconsiderada pelas classes dirigentes.

A análise preliminar que tentamos realizar a respeito do movimento do capitalismo na região de Maringá, no intuito de entender bem a educação, esta enquanto fenômeno superestrutural que se dá num determinado "locus" e "recebe" dele um peso, abrange tanto as formas das relações de trabalho no campo quanto outros elementos que apareceram no processo de desenvolvimento do capitalismo, com a mudança da produção de café para a de trigo, de soja, a criação de gado de corte, a concentração de terras, etc. Todos estes elementos, sendo formas particulares constitutivas do capital em seu desenvolvimento na região, expressam a generalidade capitalista e constituem particularidades de algo geral que existe nelas. Essa leitura da relação entre a generalidade e o particular ajuda a compreender as realidades específicas, através do que se tem a visão da totalidade no processo histórico.

A INVIABILIDADE DA ESCOLARIZAÇÃO NO MEIO RURAL

Duque Estrada, vereador de Maringá, em sessão legislativa, criticou a Companhia Melhoramentos Norte do Paraná (CMNP) por não ter construído escolas no meio rural, terminando um discurso com a seguinte frase: "A Cia. Colonizadora em particular e as colonizadoras em geral, atraindo os homens de todas as regiões para desbravarem as matas, valorizando suas propriedades, esqueceram-se de fincar templos do saber." (Atas da Câmara Municipal de Maringá, 1954).

Por que a CMNP não se preocupou com a educação da população rural? Afirma ela que a educação formal é dever exclusivo do Estado, que já favoreceu muito os trabalhadores rurais realizando a infraestrutura das localidades colonizadas. E o município de Mandaguari, de quem Maringá era distrito até 1952, também não se interessou em construir escolas rurais.

A busca nos arquivos da Câmara Municipal de Mandaguari revelou que somente nas localidades rurais em fase de produção efetiva das mercadorias eram construídas escolas, muitas vezes precárias e sempre insuficientes para atender à demanda. A hipótese inicial com que vamos trabalhar tem referência muito significativa no município de Mandaguari, porque somente nas áreas rurais de colonização já efetivada, isto é, nos locais em que os pioneiros já haviam derrubado a mata, plantando o cafezal e colhido os frutos, estabeleciam escolas. Nas áreas em que o cafezal ainda não produzia frutos para o mercado, a ausência de escolas se tornava

imperativa.

A população de Mandaguari, na área rural, era de 83 mil habitantes em 1950, enquanto a população urbana era composta por 18 mil pessoas (FIBGE, Censo de 1950). E as poucas escolas rurais construídas na década de 40 não eram suficientes para a demanda escolar. Conseqüentemente, os grupos escolares das áreas urbanas também começaram a não suportar a demanda. O vereador José de Andrade, em sessão de Câmara realizada no dia 24 de janeiro de 1952, relatou que o Grupo Escolar de Mandaguari estava com superlotação de alunos, afirmando que “mais de 800 crianças tiveram suas matrículas de alunos rejeitadas”. (Atas da Câmara Municipal de Mandaguari, 1952, p. 56).

Nas regiões onde estava concentrada a população rural, mas em que o trabalho humano ainda não havia conseguido “domar” totalmente a terra para a produção e de onde ainda não escoavam as sacas de café para a comercialização, simplesmente não existia escola. O abandono da região rural quanto à escolas, torna-se evidente em uma carta assinada pelo vereador que representava Mandaguari, endereçada ao Presidente da Câmara Municipal de Mandaguari, a 5 de abril de 1952

Senhor Presidente:

Cumprindo resolução desse Legislativo, concomitantemente, determinação de V. Excia., passo à informar-vos juntamente com a egrégia Câmara, sobre a situação do ensino Primário nesta localidade e suas adjacências: deixo de fazer um relatório, pelo simples fato de não haver o que relatar; nesta terra, não existem Escolas Municipaes. Na cidade temos uma Escola Estadual, funcionando em uma casa de madeira em

caráter provisório, casa construída pelo Diretório local do meu Partido, sem nenhum auxílio da municipalidade.

Nessa escola lotada com apenas 4 professoras, estão matriculados 364 alunos, de todas as séries do Curso Primário; por falta de professoras

bem como de acomodações, deixou-se de aceitar 280 matrículas de alunos ou melhor; de crianças que se apresentaram pleiteando as mesmas. (. . .) Na extensa e populosa Zona Rural que circunda esta cidade, não existe senhor presidente uma única Escola Municipal; ahí, centenas de infelizes brasileirinhos, crecem agrilhoados às trevas do analfabetismo. (. . .) Pedindo excusas caso não tenha correspondido à expectativa de V. Excia., subscrevo-me com estima, respeito e consideração.

*Respeitosas Saudações
(Assinatura)*

As entrevistas com os primeiros habitantes rurais confirmam a ausência da escolarização para seus filhos, durante a primeira década da formação das localidades rurais. Esse período considerado, cronologicamente, é diferente nas diversas regiões, e segue o avanço da colonização dirigida. Mas é necessário considerar que, a partir da década de 60, em todas as outras regiões de avanço da colonização do Paraná, a tese da inviabilidade de colonização não se sustém mais. No município de Mandaguari encontram-se localidades que na década de 40 tiveram

escolas municipais, e outras, do mesmo município, que somente na década de 50 tiveram efetivada a escolarização. Neste último caso, encontra-se a área rural que corresponde, hoje, a Maringá e a municípios adjacentes. A idéia básica se sustenta: os primeiros dez anos de "vida" da localidade, enquanto o fruto do café estava em sação, não importando a quantidade de famílias que nela moravam e o número de de crianças em idade escolar, não oportunizaram a construção de escolas no meio rural.

As entrevistas distinguem bem o período inicial (em que havia um número de crianças em idade escolar suficiente para se criar uma escola) e os dois períodos de efetivação da escolarização:

—*Vim em 1946 para a Estrada Borba Gato. Em 1950 havia número suficiente de crianças. Em 1954, um sírio construiu uma escola, uma venda e uma igreja. (Ex-formador).*

—*Cheguei em 1948. Em 50 já tinha crianças para a escola. A primeira escola foi construída somente em 1960 pela Prefeitura. (Pequeno proprietário).*

A ausência de escolas no meio rural durante o período inicial da abertura das terras nas localidades rurais explica-se pelo fato de os agricultores ainda não terem envolvimento com a mercadoria. Os meios de subsistência produzidos nestas áreas aceleravam o aparecimento de valores de uso para o auto consumo. O comércio foi estabelecido a partir dos frutos do café, que demoravam a aparecer: o longo tempo de plantio e colheita da mercadoria-café mantinha o isolamento do trabalhador na sua lavoura. A intensificação do trabalho produtivo na roça exigia o esforço familiar, com o intuito de adquirir o mínimo para a sobrevivência da família. Por outro lado, explica-se a ausência da escola também pelos interesses dos grupos econômicos, para quem a escola dos trabalhadores rouba tempo do trabalho.

Analisemos primeiramente a inviabilidade da escolarização a partir da compreensão do que significava o trabalho familiar.

Os chefes de famílias representam a época pioneira da região rural como a expressão de um objetivo único: organizar o trabalho na lavoura de tal modo que pudessem sobreviver. Essa é a concepção primeira e a responsabilidade que se impunha. Havia consenso familiar a esse respeito. O pai de família tinha a responsabilidade de garantir, de um lado, a satisfação das necessidades da família, e, de outro, o controle do número de necessidades básicas. Esse rigoroso controle impedia o aumento das necessidades da família - geralmente reduzidas ao vestir moderado, à alimentação e à habitação. A medida desse controle regulava-se pela pequena quantidade de dinheiro de que o chefe dispunha durante o decorrer do ano agrícola até a primeira safra ou até a safra seguinte.

Antônio Cândido afirma que o equilíbrio social depende da correlação entre as necessidades básicas e sua satisfação. No pensamento do pai de família, introjetado em todos os membros desta, o desequilíbrio começa a surgir quando aparece a dificuldade ou a impossibilidade de correlacionar as necessidades e a sua satisfação. A concentração do pouco dinheiro nos bolsos do pai de família, que impunha essa situação aos filhos - quando estes trabalhavam como "volantes" eventuais

tinham que entregar a “diária” aos pais -, fazia com que houvesse uma reorganização criativa por parte dos filhos: o “bico”, um trabalho complementar executado no período do descanso semanal, para conseguir um dinheirinho para gastar.

O período de escolarização geralmente correspondeu ao início do trabalho produtivo das crianças. Pelos 8 ou 9 anos, estão aptas a ingressar na força de trabalho. As entrevistas comprovam esta afirmação. Exemplificando:

—Os meninos cedo iam comigo na roça. (Ex-porcenteiro).

Mínimos vitais de alimentação e de abrigo exigiam que se organizassem mínimos sociais para obtê-los. O equilíbrio social dependia de uma equação entre o mínimo social e o mínimo vital. A escolarização, como categoria histórica ligada às etapas do desenvolvimento da agricultura, em que os instrumentos de produção eram rudimentares e exigiam trabalho intensivo e prolongamento da jornada do trabalho, não estava incluída, nesse momento, nos mínimos sociais da população rural.

O significado da escolarização, dentro deste quadro, é definido, nesta fase, não a partir do sujeito - o indivíduo e sua ascensão social -, mas principalmente a partir dos componentes cruciais da situação da família rural, isto é, a partir das necessidades absolutas do trabalho de toda a família. Neste sentido, parece ser legítimo supor que, para o trabalhador rural, a escola está sempre associada implicitamente a uma negação: a negação da escola propriamente dita, para a liberação do educando para o trabalho rural, ou a negação da educação formal frente à necessidade de “equilíbrio social” da família. Veremos que o tempo corrigiu esta concepção dos trabalhadores rurais, quando então se firmou a vida rural e a idéia da escola. Posteriormente, através da escolarização, nega-se a vida rural.

Por toda esta análise, chega-se à conclusão de que o determinante não era a possibilidade de uma ascensão social pela via da educação, neste primeiro período: era a necessidade premente de sobreviver por meio do trabalho intensivo. Em suma, a base material da vida determinava a ausência de escola na região rural. A necessidade do trabalho familiar, como forma insubstituível de produzir meios de sobrevivência, obrigava as crianças da roça a permanecerem no trabalho, sem tempo para a escola.

Cumpre-nos, ainda, analisar a inviabilidade da escolarização no meio rural, sob o ângulo das classes dirigentes, dos grupos econômicos.

Encontramos em Szmressányi e Queda explicação para o fato de a classe dominante não ter mostrado nenhum interesse em proporcionar uma educação de base para a população rural brasileira. Escrevem esses autores:

...Tanto a situação como a visão dos problemas da educação escolar no campo permaneceram praticamente inalteradas. (...) A situação de inferioridade educacional do campo em relação às cidades, foi-se mantendo inalterada apesar das grandes modificações na distribuição espacial da população, cada vez mais concentrada nas áreas urbanas. (Szmressányi e Queda, 1976).

O determinante econômico obrigava o agricultor a subordinar as crianças ao trabalho produtivo e, os interesses do capital exigiam que não se criassem es-

colas, que roubariam tempo de trabalho produtivo.

A citada crítica de um vereador (“...esqueceram-se de fincar templos do saber”) é baseada na realidade, mas caracteriza uma análise em termos de senso comum. A questão se coloca de forma diferente: não havia interesse em “fincar templos do saber”.

A ausência de escolarização rural não era apenas fruto, mas antes uma condição essencial de nosso desenvolvimento. “Na economia e na sociedade subdesenvolvida, a ignorância desempenha um papel fundamental, estrutural e perfeitamente definido”. (Costa Pinto, 1970). A economia e a sociedade agrária tradicionais não necessitavam de um tipo de mão-de-obra mais instruída ou mais qualificada do que aquela com que sempre contou e que era por ela mesma produzida. Esta concepção acompanhou as classes dirigentes às terras novas do Paraná. Nesta estrutura tinha-se o de que se precisava: um trabalhador com bons músculos e disposto a enfrentar o trabalho duro, que se iludisse com a idéia do acesso à terra e da autonomia na organização do trabalho próprio. A intelectualização das operações agrárias de trabalho era quase nula, pois o nível da tecnologia e dos instrumentos de produção eram rudimentares. Assim se explica a tese de o trabalho familiar intenso e prolongado ser absolutamente necessário para os grupos dirigentes, pois se produziria de forma rápida e barata a mercadoria necessária à exportação. Conseqüentemente, impedia-se a escolarização no meio rural.

Esta ausência de ofensivas educacionais era aceita tanto pelas classes dirigentes como pelos trabalhadores. Estes apenas ensaiavam uma reposição da utilidade da escola, sem forças e sem tempo para viabilizar o processo educacional. As poucas consciências que sentiam a necessidade da escolarização no meio rural não conseguiam traduzí-la em termos concretos, expressando-a sem maior vigor.

O DESPERTAR DA CONSCIÊNCIA EDUCACIONAL NO MEIO RURAL

A população rural, na medida em que se organizava em comunidades, começava a reivindicar escolas para seus filhos. O motivo dessa reivindicação prendia-se à consciência formada quanto ao futuro dos filhos: a pequena propriedade, já conquistada, tornava-se obstáculo para o futuro dos filhos. Uma família com 5 ou 6 filhos não poderia subdividir as terras de sua propriedade. Os filhos teriam que buscar outros lotes para o cultivo da terra ou arrumar outra profissão. A situação se agravava para as famílias que trabalhavam ainda na esperança de conquistar uma propriedade rural. A realidade histórica do momento — tanto em Mandaguari como posteriormente em Maringá — estava a oferecer empregos nessas cidades.

O envolvimento da população rural em relações indispensáveis, através da mercadoria, com a sociedade urbana, e a necessidade de prover empregos para seus filhos levam ao entusiasmo das famílias rurais pela educação. As atitudes e aspirações dos pais em relação à escolarização dos filhos modificam-se ao se colocar a pequena produção familiar sob o signo da produção da mercadoria e ao surgirem as opiniões dos pais a realidade de que a propriedade de terra é pequena e não

resistirá a uma divisão entre os filhos quando estes crescerem. A escola seria, então, o caminho que abriria a possibilidade de emprego urbano. No caso específico, essas aspirações eram motivadas também pela emancipação recente do município de Maringá, em que o estabelecimento de serviços necessários e de casas comerciais propiciavam novos empregos. Esta linha de pensamento vem ao encontro da realidade rural constatada no Estado de São Paulo: *“para a maioria dos entrevistados a escola apresentava uma utilidade real, sendo inclusive encarada como um meio de possibilitar a liberação das atividades agrícolas.”* (Demartini. In: Antunias, 1983).

A população rural, neste segundo período, nas diversas localidades, estava aumentando muito. A lavoura cafeeira exigia muita mão-de-obra, que se distribuía em trabalho familiar de produção imediata, como o dos pequenos proprietários, formadores, porcenteiros, volantes, camaradas e colonos. As modalidades de trabalho não haviam mudado nesta fase.

Os documentos da Câmara Municipal de Mandaguari expressam o entusiasmo pela educação ocorrida no meio rural e revelam a “corrida” dos políticos para patrocinar a instalação de escolas. Vereadores que representavam o distrito de Maringá propuseram, em 1952, a criação de escolas em Polinópolis, Copacabana do Norte e Sumaré (Atas da Câmara de Mandaguari, 21/07/52) e Florai (idem 05/08/52). Anteriormente, entre os anos de 1948 e 1952, os dois representantes de Maringá haviam-se manifestado apenas uma vez sobre a educação escolar: num requerimento dirigido ao Prefeito Municipal solicitaram *“informar quais os motivos que levaram a demitir a Professora Josefina Peralta”* (idem, novembro de 1949). Esta informação comprova que não havia interesse pela educação escolar e que este interesse surgiu quase repentinamente para atender os eleitores. Enquanto estes não reconheciam a importância na escolarização dos filhos, os grupos dirigentes não se preocupavam com ela.

Quando se afirma que o interesse surgiu “quase repentinamente”, há necessidade de buscar comprovantes desta afirmação. Solicitações para a criação de outras escolas municipais aparecem nas Atas da Câmara Municipal de Mandaguari, sob a iniciativa de vários vereadores: de Chapecó, Lote n.º 183 de Ourizona, Água Guadiana, Gleba Atlantic, Patrimônio Altaneira, Gleba Esperança, Estrada Fruteira, Gleba Atalaia (24/01/52), Vila Moranguera (14/02/52), Lote 157 da Gleba Centenário (01/03/52), Itambé, Estrada Jaçanã (22/08/52), Estrada Cambota (07/02/53).

Ao enumerar todas essas solicitações de vereadores, não queremos afirmar que as escolas foram de fato criadas, ou que somente estas foram criadas. Na pesquisa, pretende-se apenas detectar as representações com relação à escolarização no meio rural. Assim, podemos seguramente afirmar que a classe dirigente de Mandaguari não se interessou em momento algum pela educação das regiões rurais pioneiras. Somente se verificam uma repentina explosão na “corrida” pela instalação de escolas a partir de fins do ano de 1951.

As manifestações dos vereadores da Câmara Municipal de Maringá são igualmente férteis em prol da instalação de escolas municipais. Requerimentos, soli-

citações, brigas com o Prefeito, etc., visam à criação de escolas municipais em Maringá, município instalado em 1952.

Há clareza na manifestação dos entrevistados no tocante à ênfase ao trabalho rural, quando se exige uma escola local e adaptada aos horários de trabalho. Há indicadores, também, da negação do trabalho rural, como quando alguém afirma que *"ao menos um dos meus filhos deve procurar emprego na cidade"* (pequeno proprietário). É necessário a educação escolar para se terem as condições mínimas para executar o trabalho urbano.

A escolarização não chega a ser definida apenas nestes termos, nem chega a ser definida com clareza. Expressões reais definem a educação escolar: *"pra gente se defender"*, *"pra conseguir emprego"*, *"pra não se judiar na roça"*, etc. São expressões que não apresentam os atributos da educação, mas são expressões muito concretas, vitais para o trabalhador rural. A definição de escola inclui a certeza de que a educação serve como instrumental apto, necessário e único para se atingirem os objetivos colocados.

O entusiasmo pela escolarização no meio rural partiu dos agricultores, à medida que se organizavam em pequenas comunidades e tinham diminuída a preocupação pela sobrevivência. As entrevistas esclarecem:

– *A primeira escola fomo nós que construímo, foi um velho barracão. Nós não tivemos muitas condições de estudar, e sacrificuemo a vida um pouco. Mas, deu para fazer com que os filhos estudassem um pouco. (Ex. porcenteiro).*

– *Todos os proprietários deram um pouco de madeira, telhas e fizeram um mutirão para fazer a escola em 1952, a Escola Isolada do Bairro São João na Gleba Piúna, em 1951. (Ex-formador).*

As informações trazem aspectos complementares sobre as primeiras escolas:

– *As professoras eram leigas, mas pareciam ser bem mais eficientes do que as que temos hoje em dia. Havia uma professora que percorria 9 km. por dia, a cavalo, para lecionar em uma escola. (Ex-proprietário da Gleba Pinguim).*

– *Nossos filhos iam a uma escolinha que ficava no sítio, as professoras eram particulares pois não havia escola pública. O professor era uma pessoa que havia cursado o 4.º ano primário, mais ou menos. (Ex-proprietário).*

A luta dos trabalhadores rurais e a *"corrida"* dos políticos em prol da construção de escolas muitas vezes eram barradas pela falta de recursos das Prefeituras. Vozes veementes se fizeram ouvir na Câmara Municipal de Maringá a este respeito, a partir do ano de 1953.

À medida que os agricultores ampliavam seus mínimos vitais e sociais e ampliavam as necessidades de seu grupo, organizavam-se, também, em formas simples, que servissem como proteção grupal. A fundação de capelas e, conseqüentemente, de uma organização formal de comunidade, a criação de sindicatos rurais, um pouco mais tarde, e de outras organizações menores concorreram para reforçar a idéia da escolarização.

A educação torna-se um instrumento pelo qual a população exige sua participação nos bens culturais. A população rural já estava envolvida, através da mercadoria, em relações indispensáveis com a sociedade urbana, já mantinha um vínculo com esta, o que faz concretizar-se a aceitação da escola, fato constatado também por Martins:

O discernimento das concepções que ditam a aceitação da escola no meio rural depende da explicação desse modo de vida a partir das relações que cada homem rural mantém com a sociedade urbana dominante e inclusiva. (Martins, 1976).

Através da análise de entrevistas foi possível descobrir a influência da emancipação de Maringá, ocorrida em 1952, na concepção da população quanto à educação. Esta concepção já antes estava em embrião, algumas vezes se manifestava. No discurso político, porém, quase repentinamente explodiu a exigência da educação formal na roça. As condições do trabalho produtivo exigiam escolas em cada localidade. O colonato de café, a formação-emprego, o sistema de parceria e a pequena propriedade, todos utilizando o trabalho familiar, recompunham a prioridade do trabalho sobre a escola, por isso exigiam, também, uma escola que se adequasse ao trabalho: localização próxima, flexibilidade, para a dispensa dos alunos em dias de colheita, sem prejuízo para os estudos, e professores que morassem na localidade.

Assim como os interesses do capital impunham uma atividade árdua e constante, na modalidade de trabalho braçal — sem o qual a família não sobreviveria e também não se produziria a mercadoria para exportação —, na primeira fase da colonização, deve-se ver que esta imposição não ocorria sem reação, e, se ocorresse, tinha tempo determinado para existir. A reação dos dominados no processo social se dirigia para a reposição. O que o capital impunha, os trabalhadores rurais repunham, bem mais cedo do que se pudesse esperar.

No plano das relações políticas, toda vez que o povo deixa de ser uma entidade e passa a ser uma realidade, tende-se a empregar a tutela paternalista. Daí, ocorreu a entrada do político na “*corrida*” pela instalação de escolas e a conseqüente dominação sobre a pessoa do professor local. Objetiva-se que o agricultor, sempre isolado dos valores urbanos, agora “*qualifique-se como cidadão e aspire maior participação em todas as esferas da vida social e política*”. (Costa Pinto, 1970).

A escola é percebida como instrumental relevante para essa participação, e sem esse instrumental tornar-se-ia muito difícil competir no mercado de trabalho. Quanto à valorização da escola para os sujeitos da escolarização, nesse momento histórico, enquanto ela proporcionava a aquisição de habilidades básicas — ler, escrever e contar —, contrastava com os longos anos de dedicação que são roubados do trabalho. Além disso, a atividade escolar é concebida como um instrumental que dá conta de certas abstrações fundamentais da sociedade urbana e fica inserida no projeto familiar de que algum dos filhos negue o meio rural e procure emprego urbano.

Diversas pesquisas que tratam da escolarização no meio rural sustentam existir correlação entre desenvolvimento rural e educação. A escola teria papel ativo no desenvolvimento econômico, no desenvolvimento de atitudes novas, na aceitação de novos estilos de vida e de valorização do trabalho. Por meio da educação, a população substituiria suas técnicas tradicionais de trabalho pelas novas, alcançando desta forma maior produtividade. Esses estudos apresentam a adequação do sistema educacional às necessidades das comunidades rurais, com o objetivo de alcançar o desenvolvimento equilibrado da região e sua integração na comunidade produtiva. A escola é que deveria provocar a mudança do meio. Na realidade, porém, a integração, o desenvolvimento e a vontade de participação é que provocaram a viabilidade da educação na região rural de Maringá. Por isso, a escolarização foi implantada quando a população rural a exigiu. E a exigiu fundada em bases concretas da vida rural. A força do ambiente familiar é importante na implantação da escola rural: "Não tem a dúvida de que as capacidades de desenvolvimento das crianças dependem da formação dos pais e de que todas as mutilações dos indivíduos são o produto histórico das condições de vida existente até aqui". (Marx e Engels, 1982). Não há dúvida de que há interdependência entre a escola e a família. Ambas pre existem ao indivíduo, coexistem simultaneamente, mantendo relações necessárias; mas não se pode esquecer que quem, em última instância, determina as instituições são as relações sociais de produção.

Em nosso estudo, que princípio motivador despertou a classe dirigente para a escolarização no meio rural? Evidentemente, a exigência da própria população rural motivou o interesse da classe política e dirigente. Neste sentido, o objetivo dos interesses econômicos e políticos era manter a mão-de-obra no campo para a produção do excedente. Por isso, era necessário apoiar o projeto educacional da população rural. Anteriormente a classe dirigente não abria escolas no meio rural porque estas roubavam tempo do trabalho; agora, ela instala escolas municipais na roça, porque, sem estas, esvaziar-se-ia mais facilmente o campo.

Dessa forma, no que se refere à classe dominante, a escolarização, a partir de 1952, em Maringá, foi realizada com o apoio da classe dirigente, no intuito de manter trabalhadores no meio rural, mas foi realizada sob o signo do interesse da população agrícola em começar a negar o trabalho rural, rumo à conquista do emprego urbano.

O interesse dos pequenos proprietários e dos trabalhadores de produção imediata não era impor seus próprios valores, conservadores e religiosos, ameaçados por valores urbanos, liberais, mas ter um espaço no jogo dos interesses e garantir um lugar para seus filhos, como empregados nas repartições públicas, no comércio, nos bancos. Mas, para que se pudesse exigir um emprego, havia a necessidade da escolarização.

A escola, então, medeia a passagem do "caótico" - trabalhar intensamente, sem tempo para ocupar-se de outras idéias - para o organizado - refletir o valor da educação. O ponto de partida seria a prática social comum a todos os agricultores. Os níveis de compreensão da prática social tornam-se mais agudos. Embo-

ra esta compreensão seja sincrética, torna-se suficiente para uma decisão: a escola para os filhos é importante. A prática social demonstrou que, sem escolas, os filhos não seriam agentes sociais. Na evolução das opiniões dos pioneiros rurais, a educação operou a passagem do "caótico", proveniente do intenso trabalho rural para o organizado, em termos de enfrentamento e/ou participação na sociedade.

O antigo desinteresse pela escola repentinamente é negado quando se afirma a utilidade da educação, como mediação exercida nas relações sociais. Enquanto o "caótico" revelava a impossibilidade física de articulação com a sociedade urbana e suas relações, a situação de organizado restabelece a função educacional como mediação necessária para a sobrevivência da família rural.

Com o decorrer dos anos, a comunidade rural, igualitária e homogênea, desintegrou-se, dando origem a segmentos nitidamente diferenciados e com interesses conflitantes.

Com a concentração das terras em mãos de fazendeiros, as diferenças sociais tornam-se palpáveis. E essa concentração da propriedade das terras foi também a responsável pelo esvaziamento da população rural e pela introdução da moraldade de trabalho do chamado "bóia-fria".

O trabalho rural predominante, agora à base de soja, trigo e pecuária, e não mais de cafezais, exigia uma redimensão da escola no meio rural. A modernização da agricultura exigia a modernização das escolas. Para que se possa penetrar na especificidade da "nuclearização das escolas rurais", impõe-se a tarefa de aprofundar a teoria geral do capitalismo, tarefa que deixaremos para outra ocasião.

BIBLIOGRAFIA

- ANTUNIASSI, M. H. R. **Trabalhador infantil e escolarização no meio rural**. Rio de Janeiro, Zahar, 1983.
- ARROYO, M. **Educação para novas relações de trabalho no campo**. 1981 (Nimeo)
- ATAS da Câmara Municipal de Mandaguari, 1948-1952.
- ATAS da Câmara Municipal de Maringá. 1953-1956.
- BRANDÃO, C. R. **Casa de escola**. Campinas, Papyrus, 1983.
- CÂNDIDO, A. **Os parceiros do Rio Bonito**. São Paulo, Duas Cidades, 1982.
- COSTA PINTO, L.A. **Desenvolvimento econômico e transição social**. Rio de Janeiro, Zahar, 1970.
- FUKUI, L. Educação e meio rural: breve contribuição visando a proposição de temas para a pesquisa sócio-educacional: **Ciência e Cultura**. 30(2): 141-147, 1978.
- HOFF, S. **As formas de trabalho numa região pioneira e sua investigação**. Revista Unimar. Maringá, 4(1): 23-32, 1982.

- HOFF, S. **O movimento da produção de excedentes numa região pioneira.** Maringá, UEM, 1983.
- LENIN, I. **O desenvolvimento do capitalismo na Rússia.** São Paulo, Ed. Abril, 1982. (Os Economistas, n.º 5).
- MARTINS, J. de S. **A valorização da escola e o trabalho no meio rural.** Capitalismo e Tradicionalismo. São Paulo, Pioneira, 1975.
- MARX e ENGELS. **A ideologia alemã.** São Paulo, Ciências Humanas, 1982.
- MARX, K. **Contribuição à crítica da economia política.** São Paulo, Martins Fontes, 1977.
- PEIXOTO, A. C. **Educação no Brasil anos vinte.** São Paulo.
- RIBEIRO, M. L. S. **História da Educação brasileira.** São Paulo, Cortes & Moraes, 1978.
- SAVIANI, D. **Escola e democracia.** São Paulo, Cortes & Aut. Associação, 1983.
- SZMRESSÁNYI, T. e QUEDA, O. (org.) **Vida Rural e mudança social.** São Paulo, Nacional, 1976.

COMPARAÇÃO ENTRE OS ESTILOS COMANDO E INDIVIDUAL PARA A APRENDIZAGEM DA NATAÇÃO

SÔNIA MARIA TOYSHIMA LIMA

Universidade Estadual de Maringá

Departamento de Educação Física

Caixa Postal 331 – Maringá – PR – Brasil

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi comparar dois estilos de ensino propostos por Mosston (1978), comando e individual, para verificar qual seria mais eficaz na aprendizagem da natação.

A pesquisa teve cunho experimental e, através dos resultados obtidos, concluiu-se que, para iniciar a aprendizagem da natação, o estilo de ensino mais eficaz é o individual.

ABSTRACT

The principal objective of this work was to compare two types of instruction proposed by Mosston (1978), command and individual, to verify which would be more effective in instruction. The research was experimental and due to the results obtained, it followed that to begin swimming instruction, the individual method was the most effective.

INTRODUÇÃO

“Ensinar quer dizer estimular, guiar, orientar e dirigir o processo de aprendizagem. A função do professor é dirigir a aprendizagem espontânea, que se manifesta nas atividades naturais da criança”. (Bigge, 1977)

Kueth (1977) afirma que é difícil formular proposições sobre como se deve ensinar, ou sobre qual seria a melhor maneira de fazê-lo, e que, em geral, uma técnica é eficiente porque preenche os requisitos de uma situação que é muito específica.

Neste caso, procurou-se comparar os estilos comando e individual na aprendizagem da natação, para saber qual é o mais eficaz para crianças.

Segundo Faria Junior (1972), é erro bastante comum pensar que, para haver aprendizagem, basta ensinar e exigir que os alunos aprendam. Na realidade, o indivíduo só aprende aquilo em que está interessado. Alguns dos estilos de Mosston (1978) estimulam, levam ao interesse e ao gosto pelo que se está fazendo, e isto faz com que o educando se esforce para aprender cada vez mais.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo Lenk (1966), os exercícios mais aconselháveis para o bem-estar físico são os que se realizam dentro da água, pois ela é um elemento essencial para a vida do homem, sendo preciso conhecê-la para dominá-la.

Afirma ainda Lenk (1966) que a natação exercita todos os músculos fundamentais do tronco e dos membros, e que sobre a superfície da água o ar é mais puro, devido à ação dos raios solares. Dentro da água os exercícios são considerados como estimulantes, beneficiando o sistema nervoso.

Horn diz que muitos vivem em estado de hipertensão e que, através da prática da natação, os músculos tendem a relaxar-se. Ademais, a natação atua sobre o coração e pulmões, propiciando uma melhor irrigação sanguínea.

Le Boulch (1979) afirma que a natação é um excelente formador de caráter, despertando a coragem e a audácia, pois o nadador precisa dessas qualidades a cada momento.

Convencidos da utilidade do ensino da natação e cientes de que ela pode ser iniciada na infância, devemos utilizá-la da melhor maneira possível na educação, difundindo-a em escolas, clubes e centros de esportes.

ESTILO COMANDO

Segundo Canfield (1981) e Mosston (1978), são dez as atitudes que devem ser seguidas pelo professor no estilo comando:

1. Estruturação: identificar aos papéis de cada um, isto é, o seu e o do aluno; estabelecer o foco da aula.
2. Organização: ser o comandante da aula; organizar a turma, estabelecendo inclusive o local onde o aluno deve ficar.
3. Apresentação da tarefa: descrever ou demonstrar e estabelecer as bases para a qualidade da resposta.
4. Solicitação: comandar a tarefa, dizendo quando se inicia e termina o exercício.
5. Processo passivo de apoio: examinar silenciosamente o aluno naquilo que ele está executando.
6. Processo ativo de apoio: intervir ativamente na resposta.
7. Recomendação e ajuste das respostas.
8. Identificação de erros.
9. Reforço.
10. Encerramento da aula: sumarizar a aula, preparando os alunos para uma próxima e frisando que ele é que comanda a aula.

Para os que defendem este estilo de ensino é necessário utilizar um reforço, que é feito através de estímulos repetidos acompanhados de respostas.

Mosston (1978) demonstra, através de um gráfico, os aspectos que os alunos desenvolvem através deste estilo, e a intensidade do desenvolvimento:

	Mínimo	Máximo
Desenvolvimento físico		x
Desenvolvimento social	x	
Desenvolvimento emocional	x	
Desenvolvimento intelectual	x	

ESTILO INDIVIDUAL

O estilo individual de ensino e de aprendizagem implica, para os alunos, em comparação com o estilo comando, um passo adiante para a formação de indivíduos independentes.

Este estilo é baseado em um programa individual. É uma forma adequada de proporcionar aos alunos várias oportunidades de automotivação na aprendizagem. O educando avalia seu desempenho e toma decisões durante a aula.

As atitudes do professor, segundo Canfield (1981) e Mosston (1978), no estilo individual, são as seguintes:

1. Estruturação: estabelecer no início o que vai ser executado.
2. Organização: induzir o aluno a escolher o melhor lugar para ficar durante a aula e explicar para que servem os exercícios.
3. Orientação: induzir o aluno a realizar vários deslocamentos.
4. Observação do aluno.
5. Processo ativo: intervir à medida que o aluno requerer a intervenção
6. Esclarecimento da tarefa: esclarecer ao grupo ou ao aluno a tarefa a ser executada.
7. Reforço.
8. Controle de comportamentos imprevistos
9. Encerramento da aula: fazer comentários gerais ao grupo e individuais aos alunos que os desejarem.

Esses autores dizem ainda que a principal meta da educação democrática é fazer com que os estudantes se tornem indivíduos. Isso significa que os estudantes:

- devem ter iniciativa e ser responsáveis por suas ações;
- devem ser capazes de fazer escolhas inteligentes e tomar suas próprias decisões;
- devem ser criativos e livres.

Mosston (1978) demonstra, através de um gráfico, os aspectos que os alunos desenvolvem através deste estilo, e a intensidade do desenvolvimento:

	Mínimo	Máximo
Desenvolvimento físico		x
Desenvolvimento social		x
Desenvolvimento emocional		x
Desenvolvimento intelectual	x	

MÉTODOS E PROCEDIMENTOS

Para analisar os dois estilos de ensino, foi realizada uma pesquisa de campo, com alunos do Centro de Esportes e Recreação "José Geraldo da Costa Moreira", na cidade de Maringá.

A amostra utilizada foi constituída de 40 alunos de ambos os sexos, na faixa etária de 8 a 12 anos, escolhidos aleatoriamente e distribuídos em dois grupos de 20 alunos cada um.

As aulas se iniciaram no dia 8 de setembro de 1981 e terminaram no dia 9 de outubro de 1981, tendo, portanto, a duração de 32 dias. Foram ministradas 15 aulas para cada grupo.

Para o primeiro grupo, foi utilizado o estilo comando, com aulas das 9 às 10h, às terças, quintas e sábados; para o segundo grupo foi utilizado o estilo individual, com aulas das 8 às 9h, também às terças, quintas e sábados.

A monitora de ambos os grupos foi a própria pesquisadora.

Para o pré-teste foram formuladas questões sobre flutuação, batimento de pernas e movimentação de braços, sendo verificados na prática.

O pós-teste consistiu em exercícios práticos, sendo observados os itens constantes no pré-teste.

RESULTADOS

Após serem ministradas as aulas, para o primeiro grupo pelo estilo comando e para o segundo grupo pelo estilo individual, verificaram-se os seguintes resultados:

	Estilo comando		Estilo individual	
	quantidade de alunos	percentual	quantidade de alunos	percentual
Boiar em decúbito ventral	16	80	18	90
Mergulhar	15	75	20	100
Bater pernas	16	80	20	100
Bater braços	10	50	16	80
Nadar "crawl"	4	20	8	40
Nadar de costas	6	30	8	40

Pode-se notar que, em todos os itens, os resultados foram superiores no estilo individual, o que confirma o que dizem Mosston (1978), Lawter (1978) e Canfield (1981).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que o estilo individual oferece aos alunos condições de verificar e aprimorar seu próprio desempenho, de fazer descobertas e pô-las em prática, enquanto que o estilo comando tolhe essas iniciativas.

Isto corrobora o que diz Faria Junior (1972) a respeito da educação: esta deve favorecer o desenvolvimento humano, permitindo adquirir autonomia e assumir responsabilidades.

Para isto, sugere-se que os professores tenham conhecimento da variedade de métodos e técnicas de ensino, para buscar o melhor desenvolvimento da criança.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIGGE, M., *Teorias da aprendizagem para professores*. São Paulo, EDUSP, 1977, 370p.
- CANFIELD, J. T., *Aprendizagem motora*. Santa Maria, Imprensa Universitária, 1981, 59p.
- FARIA JÚNIOR, A.G. de *Introdução à didática da educação*. Ed. Forum, 1972.
- HORN, B. *Técnicas de natação em figuras*. Rio de Janeiro, Ed. Ouro, 1979. 92p.
- KUETHE, J. L., *O processo ensino-aprendizagem*. Porto Alegre, Ed. Globo, 1977.
- LAWTHER, J. D., *Aprendizaje de las habilidades, motrices*. Buenos Aires, Ed. Paidós, 1978, 186p.
- LE BOUCH, J. *La educacion por el movimiento en la edad escolar*. Buenos Aires, Paidós, 1979. 284p.
- LENK, M., *Natação olímpica*. Rio de Janeiro, Ed. Americana, 1966, 189p.
- MOSSTON, M., *La enseñanza de la educacion física del comando al descubrimiento*. Buenos Aires, Ed. Paidós, 1978, 246p.

O ENSINO E A APRENDIZAGEM DOS CONHECIMENTOS PRÁTICOS DA NATAÇÃO

CLARICE ALVES TEIXEIRA

Fundação Universidade Estadual de Maringá
Departamento de Educação Física
Caixa Postal 331 – Maringá – Paraná – Brasil

RESUMO

Procurou-se, neste trabalho, estabelecer uma comparação entre a teoria de tentativa-e-erro e a de Thorndike, em crianças de 7 a 12 anos não-iniciadas em natação.

Pela teoria de Thorndike, a média foi de 6,7 com um desvio de 5,50, e pela teoria de tentativa-e-erro foi também de 6,7 com um desvio padrão de 2,10, apresentando-se uma correlação de 0,96 entre os testes, e, a nível de .005, resultado final $T = 2,02$. Os resultados dos testes indicaram que não houve diferença significativa entre as duas teorias.

ABSTRACT

We tried to establish in this work, a comparison on between the trial-and-error theory and that of Thorndike, in children from 7 to 12 years old still not initiated in swimming. By Thorndike theory the mean rate was 6,7 with a standard deviation of 5.50; by the trial-and-error theory the mean rate was 6.7 with a standard deviation of 2,10, presenting a correlation of 0,96 between the tests. At a level of .005 the result was $T = 2,02$. The results of the tests showed that there was no difference between trial-and-error theory and Thorndike's.

INTRODUÇÃO

As técnicas de ensino da natação têm sido destacadas na literatura contemporânea. Os autores sugerem meios organizados e sistemáticos de adquirir conhecimentos científicos, nas formas mais eficientes e produtivas.

Tem-se tentado analisar as pesquisas e aplicar as teorias, para a obtenção de melhores resultados.

Embora se esteja primeiramente preocupado com a eficiência das pesquisas, há necessidade de aplicar todos os recursos de maneira sistemática, para uma instrução mais eficiente.

* Parte da dissertação de Especialização intitulada "O Ensino e a Aprendizagem dos Conhecimentos Práticos da Natação".

Muitos livros que vêm sendo publicados, normalmente na área da psicologia educacional, proporcionam um bom conhecimento para aqueles que desejam utilizar modelos de sistemas para o ensino.

Independentemente da área de interesse, cada professor procura métodos de melhorar sua eficiência.

O conhecimento dos aprendizes e de suas características individuais, bem como das diversas técnicas de ensino, contribuem para o objetivo ideal: um professor mais eficiente.

Não existe só um meio de ensinar. Alguns métodos de ensino são melhores que outros, e a eficiência de um método pode depender muito do professor e da tarefa proposta, assim como do aluno.

Dirigir todos os professores para um único procedimento seria errôneo (certamente nós não devemos exigir que todos os golpeadores de beisebol se coloquem e se inclinem exatamente da mesma maneira).

Os princípios gerais não deveriam ser violados, mas há uma variação individual.

Uma comparação entre técnicas de ensino indica que algumas são mais eficazes que outras para um determinado aprendiz.

Segundo Counsilman (1980), a seqüência da iniciação no estilo "crawl" é: adaptação ao meio líquido; respiração; propulsão de pernas; propulsão de braços.

A leitura de trabalhos sobre ensino-aprendizagem de natação infantil, área de sua atuação profissional, despertou na autora desta pesquisa o desejo de um melhor conhecimento sobre o assunto.

Devido à necessidade de saber como funcionam a teoria de estímulo-resposta de Thorndike e a de tentativa-e-erro no campo experimental da aprendizagem de natação para crianças não-iniciadas, realizou-se esta pesquisa, procurando-se verificar qual delas é a mais eficiente.

METODOLOGIA

Esta pesquisa caracteriza-se por ser um estudo experimental. Iniciou-se com um teste para a formação dos grupos. O teste teve como objetivo homogeneizar as turmas e consistiu no seguinte: as crianças escolhidas pela amostra andavam no sentido da largura da piscina, tentando colocar a cabeça na água e flutuar na posição decúbito ventral.

No início do primeiro semestre de 1982, abriram-se inscrições no Centro Esportivo "Otávio Cezário Pereira Júnior", em Maringá, para a formação de novas turmas de crianças para a aprendizagem de natação. Formaram-se dois grupos com crianças de ambos os sexos, na faixa etária compreendida entre 7 e 12 anos.

A pesquisa foi iniciada no dia 2 de janeiro e terminou no dia 9 de abril. Cada grupo, inicialmente composto de 25 crianças, chegou no final com 20.

As aulas foram ministradas às terças, quartas, quintas e sextas-feiras, no horário das 8h às 8h50min para o grupo 1 e das 9h às 9h50min para o grupo 2.

O experimento foi realizado em piscina, com auxílio de materiais próprios, tais como pranchas e raias, havendo participação efetiva da autora, através do uso de sistemas de visualização prática, pois empregou fotografias, diagramas e demonstração prática das técnicas em questão, bem como através de verbalização.

Ao executar a tarefa, procurou-se passar por todas as fases da aprendizagem da natação por crianças não-iniciadas.

Segundo Counsilman (1980), a seqüência da iniciação no estilo "crawl" é: adaptação ao meio líquido; respiração; propulsão de pernas; propulsão de braços.

As teorias utilizadas nesta pesquisa foram a de Thorndike e a de tentativa-e-erro.

Na teoria de tentativa-e-erro é necessária a visualização prática, proporcionada pela exposição de fotografias e diagramas, bem como a demonstração prática da técnica. Somou-se a isso a verbalização, cuja importância é fundamental na compreensão de uma palavra, conceito ou frase.

Esta teoria caracteriza-se, sobretudo, por não levar a um ensino de padrões rígidos, permitindo à criança aprender a mecânica do movimento com pequena ajuda do professor.

No que concerne à teoria de Thorndike, o principal recurso é a descrição das práticas conhecidas e aplicação desses conhecimentos pelo aluno.

Edward L. Thorndike notou que a aprendizagem era algo específico no sentido de só se verificar transferência de conhecimentos quando os elementos da tarefa aprendizagem eram idênticos aos que estavam sendo ensinados (Apud MATENIVK, 1976).

Os testes finais foram aplicados após 20 aulas com cada um dos dois grupos.

Os itens avaliados foram os seguintes:

- a) posição dos corpos;
 - alinhamento o mais horizontal possível, sobre a água;
- b) braços:
 - b.1. - entrada das mãos na água, com uma leve pronação e semiflexão dos cotovelos;
 - b.2. - posição dos cotovelos, mais altos na recuperação;
- c) pernas:
 - c.1. - extensão dos pés;
 - c.2. - batimento das pernas estendidas, com movimentos alternados;
- d) respiração:
 - d.1. - giro da cabeça para o lado, coincidindo com o rolamento do tronco, com inspiração no final da tração;
 - d.2. - expiração feita embaixo da água;

A contagem foi baseada no desempenho dos itens acima, ficando estipulados:

- a) 2 pontos para o item "bom", podendo haver até 4 erros no desempenho total;
- b) 1 ponto para o item "regular", podendo haver até 9 erros no desempenho total;

c) zero ponto para o item "ruim", podendo haver até 10 erros no desempenho total.

O desempenho da criança foi considerado "bom" quando atingiu mais de 9 pontos; "regular", quando alcançou de 5 a 9 pontos; "ruim", quando foi inferior a 5 pontos.

TABELA 1

Pontos atribuídos às crianças submetidas à aprendizagem pela teoria de tentativa-e-erro.

PONTOS	CRIANÇAS	%
10 a 14	03	15
05 a 09	13	65
00 a 04	04	20
TOTAL	20	100

TABELA 2

Pontos atribuídos às crianças submetidas à aprendizagem pela teoria de Thorndike.

PONTOS	CRIANÇAS	%
10 a 14	05	25
05 a 09	09	45
00 a 04	06	30
TOTAL	20	100

TABELA 3

Pontos atribuídos às crianças submetidas à aprendizagem pela teoria de tentativa-e-erro e de Thorndike.

TEORIA	PONTOS	%
Tentativa-e-erro	117	48,55
Thorndike	124	51,45
Total	241	100

TABELA 4

Comparação dos resultados.

THORNDIKE	TENTATIVA-E-ERRO
x = 6.7	x = 6.7
Dp = 5.50	Dp = 2.10

$$XY = 0.96$$

$$T = 2.02$$

CONCLUSÃO

Tentou-se verificar, na prática da natação, a eficácia de duas teorias de aprendizagem: a de Thorndike e a de tentativa-e-erro.

Há necessidade de enfatizar alguns aspectos quanto aos testes aplicados.

Sabe-se que a conclusão não deve ser considerada definitiva, visto que somente muitos testes podem tornar mais significativo um paradigma. Tentou-se, porém, contribuir, através de um experimento, para a escolha de técnicas de aprendizagem.

Partiu-se do princípio de que há muitas técnicas para o ensino da natação para crianças de 7 a 12 anos.

Pela teoria de Thorndike, a média foi de 6.7, com um desvio-padrão de 5.50; pela teoria de tentativa-e-erro, a média de 6.7, com um desvio-padrão de 2.10. Houve, portanto, uma correlação de 0.96.

O teste de significância a nível de .005 apresentou o resultado de 2.02.

Pelos resultados dos testes, pode-se concluir que não há diferença significativa entre as duas técnicas aplicadas na experiência, porém o desvio-padrão

ficativa entre as duas técnicas aplicadas na experiência, porém o desvio-padrão mostra que a turma em que foi aplicada a teoria de tentativa-e-erro foi mais homogênea, pois o desvio apresentado foi de 2.10, contra 5.50 da outra teoria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COUNSILMAN, J. E. **Ciência e técnica para preparação de nadadores**. Rio de Janeiro, Livro Íbero-Americano, 1980.
- GOOD, J. W. & HALT, K. P. **Método em pesquisa social**. 2. ed. São Paulo, Nacional, 1968.
- MARX, M. H. & HILLIX, A. W. **Sistema e teorias em psicologia**. 3. ed. São Paulo, Cultrix, 1978.
- MATENIVK, R. G. **Information processing in motor skills**. Wisconsin, University of Waterloo, 1976.
- RODRIGUES, A. **A pesquisa experimental em psicologia e educação**. 2. ed. Petrópolis, Vozes, 1976.
- SINGER, R. N. **Motor Learning and human performance**. Florida, State University, 1975.

AÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS DA
Stevia rebaudiana **SOBRE A**
GLICÓLISE EM RETICULÓCITOS
E ERITRÓCITOS

FUMIE S. KEMMELMEIER, NAIR S. YAMAMOTO, EMY L. ISHII,
ANA M. KELMER BRACHT E ADELAR BRACHT

Laboratório de Metabolismo Hepático
Departamento de Farmácia e Bioquímica
Universidade Estadual de Maringá
Caixa Postal 331 – 87100 – Maringá – Paraná

RESUMO

O efeito do steviosídeo, do steviolbiosídeo, do steviol e do isosteviol (produtos naturais da *Stevia rebaudiana*) sobre a glicólise em células eritróides (reticulócitos e eritrócitos) foi investigado. A glicólise de eritrócitos é fortemente inibida por isosteviol e steviol, e fracamente inibida por steviosídeo e steviolbiosídeo. A glicólise em reticulócitos é ativada por baixas concentrações de isosteviol e steviol (0,05 a 0,2 mM), porém inibida por concentrações acima de 0,5 mM. Isosteviol e steviol provocam acentuada hemólise quando presentes em concentrações acima de 3 mM. O steviosídeo não tem ação hemolisante, mesmo quando presente em concentrações iguais a 5 mM. O steviosídeo não permeia a membrana celular dos eritrócitos. A causa da ativação da glicólise é interpretada como sendo a inibição da fosforilação. A inibição da glicólise, por outro lado, pode ser causada por uma inibição do transporte de glucose para o interior da célula, ou pela inibição específica de uma ou mais enzimas da via glicolítica.

ABSTRACT

The effect of stevioside, steviolbioside, steviol and isosteviol (natural products of *Stevia rebaudiana*) on glycolysis in erythroid cells (reticulocytes and erythrocytes) was investigated. Glycolysis in erythrocytes is strongly inhibited by isosteviol and steviol and weakly inhibited by stevioside and steviolbioside. Glycolysis in reticulocytes is increased by isosteviol and steviol when they are present in low concentrations (0.05 to 0.2 mM), but inhibited when the compounds are present at higher concentrations (above 0.5 mM). Isosteviol and steviol produce haemolysis when

present in concentrations above 3 mM. Stevioside does not produce haemolysis, even at very high concentrations (5 mM). Stevioside does not permeate the cell membrane of erythrocytes. Activation of glycolysis in reticulocytes is probably caused by the inhibition of oxidative phosphorylation. Inhibition of glycolysis, on the other hand, may be caused either by inhibition of glucose transport to the interior of cell membrane or by a specific inhibition of one or more enzymes of the glycolytic pathway.

INTRODUÇÃO

Reticulócitos e eritrócitos perfazem sistemas muito úteis para o pesquisador voltado para a ação de drogas e produtos naturais sobre as vias metabólicas básicas. Se, por um lado, os eritrócitos são células simples, desprovidas de mitocôndrias, de núcleos e de uma série de sistemas enzimáticos, os reticulócitos, mesmo tendo forma, tamanho e origem semelhantes, são, metabolicamente, muito mais complexos. Os eritrócitos são células que dependem da glicólise para sobreviver. Eles não possuem mais cadeia respiratória nem ciclo de Krebs, enquanto que os reticulócitos conservam ainda mitocôndrias e, portanto, a cadeia respiratória e as enzimas do ciclo de Krebs. Em consequência disso, os reticulócitos também possuem efeito Pasteur, isto é, o consumo de glucose e a produção de ácido L-lático podem ser ativados por inibidores da cadeia respiratória ou por condições de anaerobiose (Ghosh e Slovirer, 1972), a exemplo do que ocorre com todas as células que dispõem de mitocôndrias no espaço intracelular.

A comparação entre eritrócitos e reticulócitos é muito útil quando se estão investigando drogas ou produtos naturais que possuem comprovada ação sobre mitocôndrias isoladas. Este é justamente o caso dos produtos naturais da *Stevia rebaudiana*. Está bem comprovado que o steviosídeo e seus derivados (steviol, isosteviol, steviolbiosídeo) afetam de diversas maneiras a síntese de ATP em mitocôndrias (Vignais *et al.*, 1966; Kelmer Bracht *et al.*, 1983). Além de inibirem o transporte de ADP/ATP através da membrana mitocondrial — o que faz com que haja uma inibição da fosforilação do ADP citosólico —, eles também inibem a NADH oxidase, a L-glutamato desidrogenase, a succinato-desidrogenase, além de exercerem certo efeito desacoplante, semelhante ao do 2,4-dinitrofenol (Vignais *et al.*, 1966; Kelmer Bracht *et al.*, 1983). A seqüência geral de potência dos diversos produtos naturais da *Stevia rebaudiana* é encabeçada pelo steviol e pelo isosteviol, vindo a seguir o steviolbiosídeo e, por último, o steviosídeo. O steviosídeo, que é o principal princípio adoçante da *Stevia rebaudiana*, é um inibidor bem fraco das funções mitocondriais, e, a rigor, o seu único efeito é aquele de inibir o transporte de ADP/ATP.

É um fato bem estabelecido que a inibição da síntese de ATP na cadeia respiratória de células completas provoca aumento na atividade glicolítica (Ghosh e Slovirer 1972). Em vista disso, é de se esperar que os produtos natu-

rais da *Stevia rebaudiana* tenham também a capacidade de ativar o consumo de glucose em células que possuam mitocôndrias. Por outro lado, em células desprovidas de mitocôndrias, nenhuma ativação na glicólise é de se esperar por parte do steviol e seus derivados.

Com base neste raciocínio, foram feitas várias experiências nas quais o consumo de glucose e a produção de L-lactato foram medidos, tanto com eritrócitos como com reticulócitos. Os resultados poderão fornecer muitos dados úteis sobre o mecanismo de ação dos produtos naturais da *Stevia rebaudiana*. Particularmente interessante é a possibilidade de se fazerem experiências com eritrócitos humanos. Não se deve esquecer que os eritrócitos são o único tipo de célula humana que pode ser obtido sem dificuldades e em grandes quantidades para estudos de metabolismo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção de reticulócitos de coelho

A liberação de reticulócitos em coelhos foi provocada pela injeção subcutânea de solução de fenilhidrazina (a 2,5%), neutralizada segundo o esquema de Rich (1967). O sangue foi coletado por punção cardíaca e aproveitado para a realização de experimentos quando mais de 90% das células vermelhas eram reticulócitos. Após a coleta, o sangue foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas três vezes por centrifugação a 3000 rpm em meio resfriado a 4°C e contendo NaCl 0,15 M (tampão fosfato 20 mM, pH 7,4). Após cada lavagem, a camada superior, formada por leucócitos e plaquetas, foi aspirada. Após a lavagem, as células foram incubadas por 30 minutos a 37°C em solução de Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,6). Após o término da incubação, as células foram novamente lavadas por 3 vezes com solução de Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,6) e suspensas nesse mesmo meio, para a realização dos experimentos.

Obtenção de eritrócitos humanos e de coelho

O sangue humano foi obtido por punção da veia mediana. O sangue de coelho foi coletado por punção cardíaca. O anticoagulante utilizado foi a heparina. O procedimento de isolamento dos eritrócitos, tanto para o sangue humano como para o sangue de coelho, foi idêntico ao utilizado para o isolamento dos reticulócitos.

Sistema de incubação

Às suspensões de eritrócitos ou reticulócitos foram adicionados isosteviol, steviol, steviolbiosídeo, steviosídeo ou antimicina A, de acordo com o protocolo experimental, sendo o pH ajustado para 7,6. A seguir, incubou-se a suspensão por 5 minutos a 37°C, sob atmosfera carbogênica (CO₂:O₂ ∴ 5-95%) e com agitação em banho Dubnoff. Após estes 5 minutos de pré-incubação, adicionou-se glucose, para uma concentração final em torno de 2 mM.

Alíquotas foram retiradas em tempos previamente determinados e desproteinizadas com 2 volumes de HClO_4 a 3,5% e resfriado a 4°C . Após centrifugação, alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para as dosagens de L-lactato e glucose.

Para a determinação dos volumes de distribuição do steviosídeo e da água triciada, eritrócitos humanos foram incubados com hematócrito elevado (60%) em tampão Krebs/Henseleit-fosfato (fosfato 16 mM, pH 7,4; cloreto de cálcio 0,3 mM). Em diferentes incubações, adicionou-se steviosídeo (concentração média 0,4 mM), água triciada e $[^{14}\text{C}]$ sacarose. Amostras foram coletadas em tempos predeterminados, e os eritrócitos precipitados por centrifugação. O sobrenadante foi então desproteinado por igual volume de ácido perclórico a 0,3%, e utilizado para a dosagem de steviosídeo e para as medidas da radioatividade.

Analítica

A glucose foi determinada através do método da o-toluidina, de acordo com Dubowski (1962). O L-lactato foi dosado enzimaticamente com L-lactato desidrogenase e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), essencialmente conforme foi descrito por Gutmann *et al.*, 1974). A hemoglobina foi dosada pelo método da cianometahemoglobina (van Kampen *et al.*, 1961). A radioatividade foi medida em cintilador líquido (Beckman, LS 6800); o líquido de cintilação continha 800 ml de tolueno, 400 ml de etanol, 5 g de 2,5-difeniloxazol e 200 mg de 2,2'-p-fenileno-bis (5-feniloxazol) (POPOP).

O steviosídeo foi dosado pelo método de dosagem de açúcares (fenol sulfúrico) descrito por Dubois *et al.* (1956). A curva-padrão foi feita com soluções de steviosídeo de concentração conhecida.

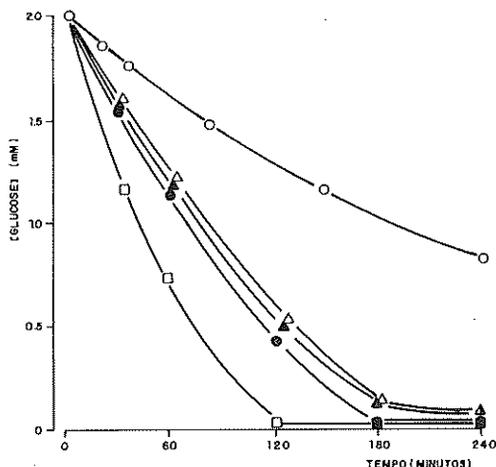


Figura 1. Efeito da antimicina A (10 $\mu\text{g/ml}$), isosteviol 1 mM, steviobiosídeo 1 mM e steviosídeo 1 mM sobre o consumo de glucose em eritrócitos de coelho. Eritrócitos de coelho foram incubados em tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4), conforme descrito em Materiais e Métodos. O hematócrito era igual a 20%. Amostras foram coletadas e desproteinizadas e a glucose dosada pelo método da o-toluidina. Símbolos: controle, \bullet ; isosteviol (1 mM), \circ ; steviobiosídeo (1 mM), \blacktriangle ; steviosídeo (1 mM), \triangle ; antimicina A (10 $\mu\text{g/ml}$), \square .

RESULTADOS

Efeito sobre a glicólise em reticulócitos de coelho

A figura 1 mostra os resultados de uma experiência na qual o consumo de glucose de reticulócitos em suspensão foi seguido durante 4 horas. Além da incubação-controle, foram feitas mais quatro incubações que continham antimicina A (10 $\mu\text{g/ml}$), isosteviol, steviolbiosídeo e steviosídeo, estes últimos numa concentração igual a 1 mM. Na incubação-controle, a glucose do meio esgotou-se aos 180 minutos de incubação. Já na presença de antimicina A (10 $\mu\text{g/ml}$), o consumo de glucose esteve bem acelerado, tendo ela sido esgotada entre os 60 e 120 minutos de incubação. Fica, pois, evidente que o sistema é passível de ativação por um agente que iniba a cadeia respiratória, como é o caso da antimicina A (Ghosh e Sloviter, 1972).

O isosteviol 1 mM, por outro lado, inibe consideravelmente o consumo de glucose. Na experiência da figura 1, o grau de inibição é de aproximadamente 65%. Steviosídeo e steviolbiosídeo, no entanto, têm um efeito bem pouco pronunciado.

No tocante à produção de L-lactato, conforme mostra a figura 2, os resultados são um pouco contraditórios. A antimicina A ativa consideravelmente a liberação de L-lactato, o que é coerente com o aumento no consumo de glucose. No caso do steviosídeo e do steviolbiosídeo, por outro lado, há um pequeno efeito inibidor sobre a produção de L-lactato, conseqüência possivelmente da também pequena inibição do consumo de glucose. Já o isosteviol, ao contrário do que se observou na figura 1, não inibe, nas condições do experimento, a produção de L-lactato. Na realidade, há até uma pequena ativação. Este fato por si só sugere que o efeito do isosteviol pode ser bem complexo.

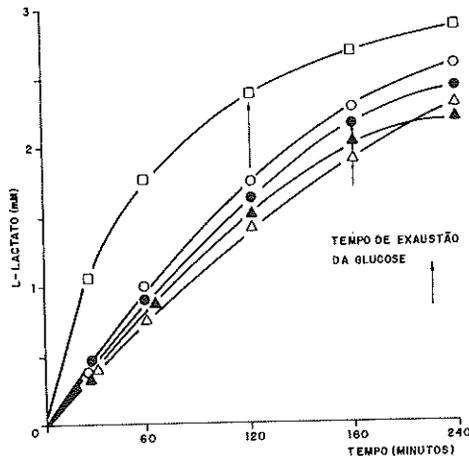


Figura 2. Efeito da antimicina A (10 $\mu\text{g/ml}$), isosteviol 1 mM, steviolbiosídeo 1 mM e steviosídeo 1 mM sobre a produção de L-lactato em reticulócitos de coelho. Medidas de produção de L-lactato correspondentes à experiência mostrada na figura 1. O tempo de exaustão da glucose do meio de incubação está indicado por setas. Símbolos: controle, ●, isosteviol (1 mM), ○, steviolbiosídeo (1 mM), △, steviosídeo (1 mM), □, antimicina A (10 $\mu\text{g/ml}$).

O efeito inibidor do isosteviol 1 mM sobre o consumo de glucose em reticulócitos não é o esperado, já que, como inibidor da cadeia respiratória, ele deveria, a exemplo da antimicina A, ativar a glicólise. A fim de esclarecer isto, realizaram-se outras experiências, nas quais uma série de concentrações foram investigadas. A figura 3 mostra os resultados de uma experiência na qual a concentração de isosteviol variou entre 0,05 e 2,0 mM. A produção de L-lactato e o consumo de glucose foram avaliados durante 2 horas, e os valores obtidos foram representados contra a concentração de isosteviol. Vê-se na figura 3 que, com isosteviol 1 mM, há uma inibição do consumo de glucose, conforme foi visto na figura 1. Esta inibição é acentuada (75% em relação ao controle). Sobre a produção de L-lactato, no entanto, o efeito é bem reduzido. Com isosteviol 2 mM, a inibição acentua-se, tanto em relação ao consumo de glucose como à produção de L-lactato. Concentrações baixas de isosteviol, por outro lado, provocam uma ativação no consumo de glucose, bem como na produção de L-lactato. Os resultados da figura 3 sugerem fortemente a existência de ao menos dois efeitos. A ativação pode ser causada pela inibição da cadeia respiratória, a exemplo do que sucede com a antimicina A.

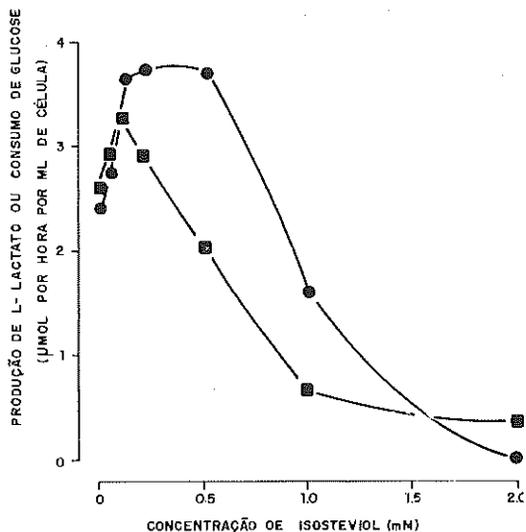


Figura 3. Efeito do isosteviol sobre a glicólise em reticulócitos de coelho: dependência da concentração. Reticulócitos de coelho foram incubados em tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4), conforme descrito em Materiais e Métodos. O hematócrito foi igual a 21% e a concentração inicial de glucose 2 mM. O consumo de glucose e a produção de L-lactato foram avaliados e expressos em μmol por hora por ml do espaço intracelular. Glucose: \blacksquare ; L-lactato: \bullet .

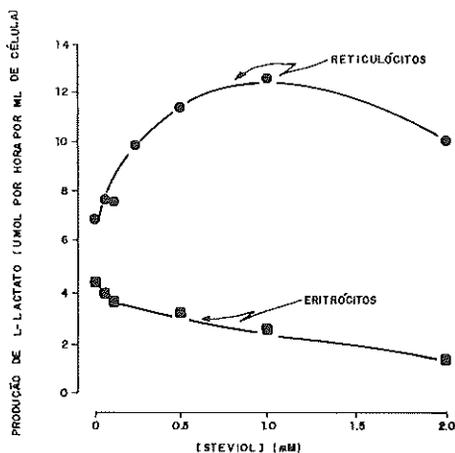


Figura 4. Efeito do steviol sobre a glicólise em reticulócitos e eritrócitos de coelho: dependência da concentração. Reticulócitos e eritrócitos de coelho foram incubados em tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4), conforme descrito em Materiais e Métodos. O hematócrito foi aproximadamente 20% em todas as incubações. A produção de L-lactato foi medida por método enzimático (ver Materiais e Métodos), expressa em μmol produzidos por hora por ml do espaço intracelular e representada contra a concentração de steviol.

A ativação máxima produzida pelo isosteviol no tocante à produção de L-lactato é de 58%. Em relação ao consumo de glucose ela é bem menor: apenas 26%. A queda é bastante abrupta quando se aumenta a concentração, o que sugere um forte efeito inibidor sobreposto à ativação. Um quadro um pouco diferente é obtido quando se utiliza o análogo estrutural do isosteviol, o steviol. Este composto é a aglucona natural do steviosídeo. Foi feita uma experiência na qual se variou a concentração do steviol entre 0,05 e 2,0 mM, a exemplo do que já fora feito com o isosteviol. Os resultados estão na figura 4. Aí se nota que a produção de L-lactato, é ativada em 80% com steviol 1 mM. Apenas com steviol 2 mM há um decréscimo. Consistentemente, também o consumo de glucose é ativado (não mostrado na figura 4), o máximo de ativação ocorrendo com steviol 0,5 mM.

Efeito sobre a glicólise em eritrócitos de coelho e em eritrócitos humanos

Experiências de todo semelhantes àquelas descritas no item anterior foram realizadas com eritrócitos humanos e de coelho. A figura 5 mostra os resultados de uma experiência na qual eritrócitos de coelho foram incubados na presença de isosteviol 1 mM, steviosídeo 1 mM e steviolbiosídeo 1 mM. O consumo de glucose foi acompanhado durante 5 horas. Pode-se ver que o isosteviol 1 mM inibe o consumo de glucose. Nas condições do experimento, o grau de inibição é de 45%. Steviosídeo e steviolbiosídeo 1 mM, por outro lado, têm efeito bem pouco pronunciado, pois o grau de inibição não ultrapassa os 20%.

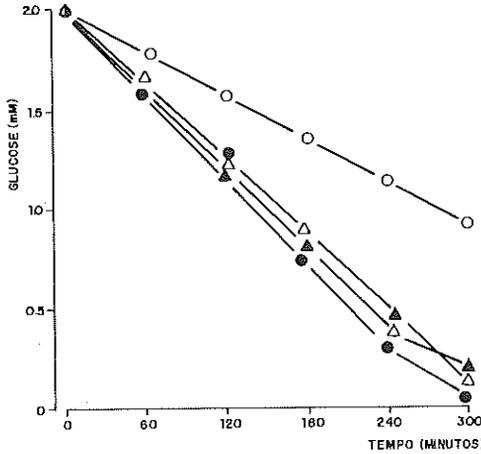


Figura 5. Efeito do isosteviol 1 mM, steviolbiosídeo 1 mM e do steviosídeo 1 mM sobre o consumo de glicose em eritrócitos de coelho. Eritrócitos de coelho foram incubados em tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4), conforme descrito em Materiais e Métodos. O hematócrito foi igual a 20%. Amostras foram coletadas e desproteinizadas e a glicose dosada pelo método da o-toluidina. Símbolos: controle, ○; isosteviol 1 mM, ●; steviolbiosídeo 1 mM, △; steviosídeo 1 mM, △.

As medidas de produção de L-lactato da experiência acima descrita encontram-se na figura 6. Os resultados são consistentes com os dados de consumo de glicose. O isosteviol 1 mM produz 45% de inibição. No caso do steviolbiosídeo e do steviosídeo 1 mM, a inibição sobre a produção de L-lactato é um pouco mais pronunciada, ultrapassando a barreira dos 20%. Deve-se destacar que, até ao esgotamento da glicose do meio de incubação, tanto a produção de L-lactato como o consumo de glicose são função linear do tempo de incubação.

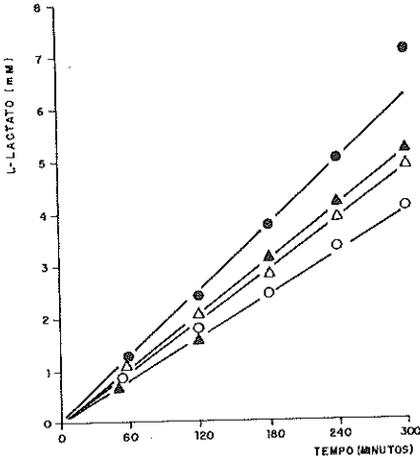


Figura 6. Efeito do isosteviol 1 mM, steviolbiosídeo 1 mM e steviosídeo 1 mM sobre a produção de L-lactato em reticulócitos de coelho. Medidas de produção de L-lactato correspondentes à experiência mostrada na figura 5. Símbolos: controle, ○; isosteviol, ●; steviolbiosídeo, △; steviosídeo, △.

Experiências idênticas às descritas para eritrócitos de coelho foram realizadas também com eritrócitos humanos. Os resultados são plenamente comparáveis. O isosteviol 1 mM tem maior efeito inibidor, tanto sobre o consumo de glicose como sobre a produção de L-lactato. O grau de inibição é comparável àquele observado em eritrócitos de coelho. O efeito do steviosídeo e do steviolbiosídeo, por outro lado, também é bem pouco pronunciado em eritrócitos humanos.

Similarmente ao que fora feito com reticulócitos, curvas de concentração também foram realizadas com eritrócitos, utilizando-se isosteviol e steviol. Conforme mostra a figura 4, o steviol exerce um único efeito sobre a glicólise de eritrócitos: entre 0,05 e 2,0 mM, há apenas inibição, não se observando a ativação que ocorre com reticulócitos. Experiências similares realizadas com isosteviol revelaram que também este composto não produz ativação sobre a glicólise de eritrócitos.

Ação hemolisante dos produtos naturais da *Stevia Rebaudiana*

O efeito inibidor sobre a glicólise, tanto em eritrócitos como em reticulócitos, poderia dever-se à ação hemolisante. Com a hemólise há a liberação de enzimas e cofatores para o meio de incubação, o que também provoca uma diluição desses agentes. Com isto, a atividade glicolítica tende a decair. Por isto, a hemólise poderia ser a causa da inibição, embora não possa ser considerada a causa da ativação observada em reticulócitos.

Para responder a esta questão, a hemólise provocada pelos produtos naturais da *Stevia rebaudiana* foi sistematicamente investigada. Uma parte dos resultados está representada na figura 7, em que se representou a quantidade de hemoglobina liberada após duas horas de incubação. O sistema tinha um hematócrito inicial igual a 20%. Essa figura mostra que o steviol e o isosteviol possuem ação hemolisante. O isosteviol 5 mM, após duas horas de incubação, produz 70 % de hemólise. O steviol 5 mM produz menos da metade deste valor após duas horas de incubação. A dependência da hemólise da concentração, no entanto, é parabólica e acentua-se muito em concentrações acima de 2 mM. Até 2 mM o efeito é muito pouco pronunciado (menos de 3,5% de hemólise). Como os efeitos sobre a glicólise, tanto em reticulócitos como também em eritrócitos, foram observados em concentrações até 2 mM, é improvável que a ação hemolisante seja a causa do efeito inibidor.

Deve-se destacar ainda, no tocante à figura 7, que o steviosídeo não possui qualquer ação hemolisante. Mesmo concentrações iguais a 5 mM são completamente inócuas.

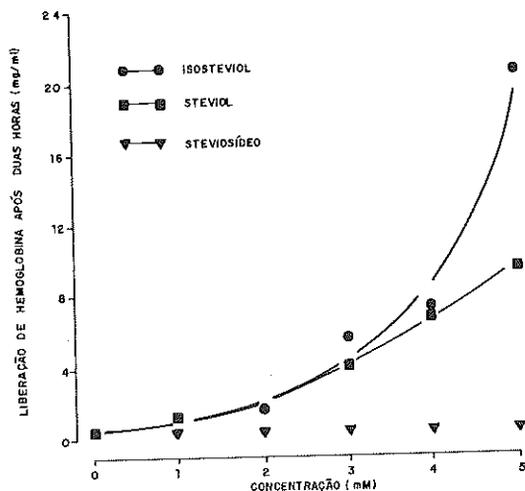


Figura 7. Ação hemolisante do steviol, isosteviol e do steviosídeo sobre eritrócitos humanos. Eritrócitos humanos foram incubados (hematócrito inicial: 20%) em tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4), conforme descrito em Materiais e Métodos, na presença de concentrações variáveis de isosteviol, steviol e steviosídeo. A hemólise foi avaliada após 120 minutos de incubação e representada contra a concentração de cada composto. Símbolos: isosteviol, ○; steviol, □; steviosídeo, ▼.

O volume de distribuição do steviosídeo numa suspensão de eritrócitos

A ativação da glicólise observada com steviol e isosteviol em reticulócitos, juntamente com a ação hemolisante destes compostos, reforça a suposição de que eles permeiam a membrana celular. Isto tem apoio também em dados obtidos em outros sistemas celulares, tais como túbulos renais (Yamamoto *et al.*, 1984) e fígado perfundido isoladamente (Ishii e Bracht, 1984). Nestes sistemas, isosteviol e steviol inibem a gluconeogênese e a respiração. Principalmente este último fenômeno exige acesso às mitocôndrias, o que somente é possível permeando a membrana celular. O steviosídeo, porém, não afeta a gluconeogênese e a respiração em túbulos renais e no fígado perfundido (Yamamoto *et al.*, 1984; Ishii e Bracht, 1984), o que leva a crer que o composto talvez tenha dificuldade em permear a membrana celular. No caso dos eritrócitos, a suposição é reforçada pela ausência de efeito hemolisante.

Estudos de permeação de substâncias em membranas biológicas requerem marcação com isótopos radioativos. Não há, porém, steviosídeo ou steviol marcado disponível no mercado. O steviosídeo, porém, pode ser facilmente dosado por métodos que detectam resíduos glicídicos. Embora o método esteja sujeito a certas interferências, numa experiência bem controlada pode-se ter razoável grau de confiança nas medidas feitas.

Por isto planejou-se uma experiência destinada à avaliação do volume de distribuição do steviosídeo numa suspensão de eritrócitos humanos. O steviosídeo foi dosado pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois, 1956), substraindo-se brancos adequados. Como referências foram utilizadas [^{14}C] sacarose e água triciada

(^3H) H_2O). A sacarose permeia a membrana celular com extrema lentidão (Bracht *et al.*, 1980), podendo ser encarada como um indicador para o espaço extracelular. A água triçada, por outro lado, é um indicador para o espaço aquoso total, já que a sua distribuição entre o meio externo e o meio intracelular é instantânea. O hematócrito das suspensões foi bem alto: em torno de 60%. Desta forma, o volume intracelular é significativo em comparação com o volume extracelular.

A figura 8 mostra os resultados de uma experiência típica. Os volumes de distribuição do steviosídeo e da água triçada foram expressos em relação ao volume da sacarose. Salta à vista, na figura 8, que os volumes de distribuição do steviosídeo e da água triçada diferem acentuadamente. O do steviosídeo é, inclusive, um tanto menor que o ocupado pela sacarose. Já o volume de distribuição da água triçada é bem maior que o da sacarose, o que é lógico. Por outro lado, ao longo de duas horas de incubação, tanto o volume da água triçada como o do steviosídeo não mostram qualquer variação. Isto é esperado no caso da água triçada, já que a sua distribuição entre os espaços intra e extracelular é quase que instantânea. No caso do steviosídeo, no entanto, a observação é um indicativo bastante forte de que, mesmo no prazo de duas horas, não há permeação significativa da membrana celular. Se houvesse permeação, deveria haver um aumento gradativo no volume de distribuição, em direção ao da água triçada, o que não ocorre, nem mesmo havendo qualquer indicação neste sentido. É possível, portanto, que o steviosídeo não permeie a membrana celular.

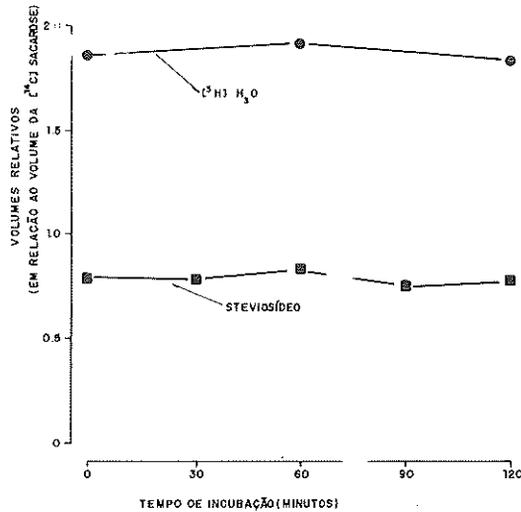


Figura 8. Volumes de distribuição do steviosídeo e da água triçada em relação ao volume da [^{14}C] sacarose em eritrócitos humanos. Eritrócitos humanos foram suspensos em tampão Krebs/Henseleit-fosfato (pH 7,4); fosfato 16 mM; cloreto de cálcio 0,3 mM) com um hematócrito de 60%. Os volumes relativos do steviosídeo e da água triçada foram calculados com dados obtidos conforme descrito em Materiais e Métodos.

DISCUSSÃO

O efeito ativador sobre a glicólise em reticulócitos

O efeito ativador da glicólise em reticulócitos é esperado com base na ação inibidora que os produtos naturais da *Stevia rebaudiana* exercem sobre a fosforilação oxidativa. A melhor evidência de que este efeito tem realmente origem mitocondrial está no fato de não haver ativação da glicólise em eritrócitos, os quais não possuem mitocôndrias. Por outro lado, uma ativação semelhante na glicólise foi observada também no fígado perfundido isoladamente (Ishii e Bracht, 1984). No fígado, inclusive, a ativação da glicólise é acompanhada por uma inibição no consumo de oxigênio, havendo boa correlação entre ambos os fenômenos. Como a glicólise de reticulócitos é comprovadamente ativada por inibidores da respiração mitocondrial (fig. 1), é altamente provável que os resultados deste trabalho, no tocante à ativação da glicólise, possam ser interpretados desta maneira.

Há indicadores também de que em reticulócitos a cadeia respiratória é realmente afetada. Na experiência mostrada nas figuras 1 e 2 nota-se acentuado efeito inibidor sobre o consumo de glucose por parte do isosteviol 1 mM. A produção de L-lactato, porém, não é inibida naquela experiência, sendo inclusive um pouco ativada. Como o L-lactato liberado pela célula representa, na realidade, piruvato não oxidado pelo ciclo de Krebs e pela cadeia respiratória (já que a L-lactato desidrogenase está próxima ao equilíbrio), é justo esperar uma maior liberação de L-lactato quando houver inibição daquelas vias. Por isto, mesmo com uma menor quantidade de glucose sendo transformada, pode haver uma liberação de L-lactato maior ou igual ao controle, desde que não haja passagem de unidades de três carbonos (na forma de piruvato) para o ciclo de Krebs.

A ação inibidora sobre a glicólise em eritrócitos e em reticulócitos quando os compostos estão presentes em altas concentrações

A forma das curvas de concentração obtidas com reticulócitos fala nitidamente a favor de dois efeitos. Isto se confirma quando se verifica que em eritrócitos há apenas um efeito, isto é, uma inibição da glicólise. Se a causa da ativação parece clara, a causa da inibição ainda requer dados experimentais adicionais.

A priori podem-se imaginar três causas para a inibição da glicólise em eritrócitos: a) hemólise, isto é, destruição das células; b) inibição de uma ou mais enzimas da via glicolítica; c) inibição do transporte de glucose através da membrana plasmática. A primeira possibilidade, a hemólise, é improvável, já que uma avaliação (fig. 7) mostrou que ela é insignificante mesmo em concentrações que provocam considerável inibição. Por isto mesmo, a sua contribuição para o efeito inibidor total deve ser bem pequena.

A possibilidade de uma inibição de enzimas da via glicolítica não pode ser excluída, já que nem todas as enzimas desta via, até agora, foram testadas quanto à sua sensibilidade aos produtos naturais da *Stevia rebaudiana*. Apenas a hexoquinase (Kelmer Bracht, 1981), a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (dados

não mostrados) e a L-lactato desidrogenase (dados não mostrados) foram testadas, sendo que nenhum efeito foi notado. Talvez, no entanto, o principal fator a contribuir para a inibição da glicólise seja a terceira possibilidade aventada no parágrafo anterior, isto é, a inibição do transporte de glucose. Ishii e Bracht (1984) verificaram em fígado perfundido isoladamente que o isosteviol inibe fortemente o transporte de glucose. Foi verificado também que este efeito é compartilhado pelo steviosídeo, embora este composto seja muito menos potente.

No fígado perfundido isoladamente, a inibição do transporte de glucose tem uma série de conseqüências metabólicas. Uma delas, inclusive, é a inibição da glicólise a partir de glucose exógena, quando o isosteviol é infundido em concentrações superiores a 0,2 mM. Foi exatamente isso o que se observou em reticulócitos (fig. 3). Esta semelhança de efeitos sobre a glicólise em reticulócitos e células hepáticas é, seguramente, altamente significativa.

Deve-se acrescentar que uma inibição no transporte de glucose não requer que o composto tenha acesso ao interior da célula. Na realidade, a inibição de transporte é um típico efeito a nível da membrana plasmática, o qual pode ser exercido também do lado de fora. Neste sentido, chama a atenção o fato de que, em todos os experimentos realizados, tanto o steviosídeo como o steviolbiosídeo exercem um pequeno efeito inibidor. Este efeito pode dever-se à uma inibição do transporte de glucose.

Com os dados disponíveis fica, pois, claro que a inibição do transporte de glucose poderia explicar o efeito negativo sobre a glicólise, tanto em eritrócitos, como em reticulócitos. Isto não quer dizer, no entanto, que não haja algum efeito sobre alguma enzima da via glicolítica, o que poderia ser um segundo sítio de ação. Uma resposta definitiva depende de medidas específicas a serem feitas com cada uma das enzimas da glicólise.

A permeabilidade da membrana plasmática aos produtos naturais da *Stevia rebaudiana*

Apenas o volume de distribuição do steviosídeo pôde ser medido, e os resultados indicam que este não permeia a membrana celular com velocidade mensurável. Medidas de transporte de steviol e isosteviol esbarram nas dificuldades de dosagem destas substâncias. Estas dificuldades perdurarão enquanto não se dispuser de isosteviol ou steviol marcado com isótopo radioativo.

É muito provável, no entanto, que ambas as formas da aglucona (isosteviol e steviol) tenham acesso ao interior da célula. Há inúmeros dados que atestam isto, como a inibição da gluconeogênese em túbulos renais (Yamamoto *et al.*, 1984), a inibição da respiração e outros efeitos em fígado perfundido isoladamente (Ishii e Bracht, 1984), a ativação da glicólise em reticulócitos observada neste trabalho, e a excreção do steviol no líquido biliar (Wingard *et al.*, 1980). Por outro lado, o fato de o steviosídeo não permear ou permear muito lentamente a membrana plasmática explica a ausência de efeito deste composto sobre muitos parâmetros que o steviol afeta. É o caso, por exemplo, da ausência de inibição sobre a gluconeogênese e a respiração em túbulos renais (Yamamoto *et al.*, 1984) e sobre a respiração no fígado

perfundido quando nenhum substrato exógeno é infundido (Ishii e Bracht, 1984). Isto ocorre porque o efeito do steviosídeo (e também do steviolbiosídeo) sobre mitocôndrias é semelhante ao do steviol e do isosteviol, sendo de se esperar também uma semelhança de efeitos em células intatas. As discrepâncias ficam amplamente esclarecidas, no entanto, caso se admita que o steviosídeo, na célula intata, não tenha acesso às mitocôndrias. Os dados obtidos até agora indicam fortemente que esta interpretação é correta.

BIBLIOGRAFIA

- BRACHT, A., SCHWAB, A. J. e SCHOLZ, R. Untersuchung von Flussgeschwindigkeiten in der isolierten perfundierten Rattenleber durch Pulsmarkierung mit radioaktiven Substraten und mathematischer Analyse der Auswaschkinetiken. **Z. Physiol. Chem** **361**: 57-377, 1980.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, S. K., REBERS, P. A. e SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry** **28** (6): 250-256, 1956.
- DUBOWSKI, K. M. An o-Toluidine Method for Body-Fluid Glucose Determination. **Clin. Chem.** **8**: 215-235, 1962.
- GHOSH, A. K. e SLOVITER, H. A. Glycolysis and the Pasteur Effect in Rat Reticulocytes. **J. Biol. Chem.** **248**: 3035-3040, 1973.
- GUTMAN, I., e WAHLEFELD, A. W. L (+)- Lactate Determination with Lactate Dehydrogenase and NAD. In: Bergmeyer, H. U. (ed.), **Methods of Enzymatic Analysis**, New York, Academic Press, 1974, vol. 3, p. 1464-1468.
- ISHII, E. L. e BRACHT, A. *Stevia rebaudiana* Natural Products and Liver Metabolism. I. Effect of Steviol and Stevioside on Glycolysis and Gluconeogenesis in Perfused Rat Liver. **Arq. Biol. Technol.** **27** (2): 170, 1984.
- KELMER BRACHT, A. M. Efeito de Produtos da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni sobre Mitocôndrias de Fígado de Rato. Tese de Mestrado, Curitiba, 1981.
- KELMER BRACHT, A. M., ALVAREZ, M. e BRACHT, A. Effect of Stevioside and its Derivatives on Rat Liver Mitochondria. Proceedings of the 18th Congress of the Sociedade Brasileira de Fisiologia. **Braz. J. of Med. and Biol. Res.** **16**(5-6): 521, 1983.
- RICH, A. Preparation of Polysomes from Mammalian Reticulocytes, Lymph Nodes and Cell Grown in Tissue Culture. In: Colowick, S. P. e Kaplan, N. O. (ed.), **Methods in Enzymology**, New York, Academic Press, 1967.

- VAN KAMPEN, E. J. e ZIJLSTRA, W.G. Standardization of Hemoglobiometry II. The Hemoglobincyanide Method. **Clin. Chim. Acta** 6:538-544, 1961.
- VIGNAIS, P. V., DUEE, E. D., VIGNAIS, P. M. e HUET, J. Effects of Atractyligenin and its Structural Analogues on Oxidative Phosphorylation and on the Translocation of Adenine Nucleotide in Mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta** 118: 465-483, 1966.
- WINGARD Jr., R. E., BROWN, J. P., ENDERLIN, F. E., DALE, J. A., HAL E, R. L. e SEITA, C. T. Intestinal Degradation and Absorption of the Glycosidic Sweeteners Stevioside and Rebaudioside A. **Experientia** 36:519-520, 1980.
- YAMAMOTO, N. S., KELMER BRACHT, A. M., ISHII, E. L. KEMMELMEIER, F. S. ALVAREZ, M. e BRACHT, A. Effect of Steviol and its Structural Analogues on Glucose Production and Oxygen Uptake in Rat Renal Tubules. **Experientia** (no prelo, 1984).

EFEITO DE PRODUTOS NATURAIS DA *Stevia rebaudiana* SOBRE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS

A. M. KELMER BRACHT, M. ALVAREZ E A. BRACHT

Laboratório de Metabolismo Hepático
Departamento de Farmácia e Bioquímica
Universidade Estadual de Maringá – 87100 – Maringá – PR

RESUMO

O efeito de diversos produtos naturais extraídos das folhas da *Stevia rebaudiana* sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato foi investigado. Os compostos utilizados foram steviosídeo (um adoçante não-calórico), steviolbiosídeo, isosteviol e steviol. Extratos aquosos totais das folhas da planta também foram investigados. Os produtos naturais da *Stevia rebaudiana* inibem a fosforilação oxidativa, a atividade ATP-ásica ativada pelo 2,4-dinitrofenol, a atividade NADH-oxidase, a atividade succinato-oxidase, a succinato desidrogenase e a L-glutamato desidrogenase. A razão ADP/O foi diminuída. A respiração dependente de substrato (estado II) foi aumentada em baixas concentrações (até 0.5 mM) e inibida em concentrações altas (1 mM ou mais). Em mitocôndrias desacopladas, a inibição da respiração foi o único efeito observado. A ejeção ativa de prótons induzida pelo succinato e o "swelling" induzido por diversos substratos e pelo ATP foram inibidos. Dos compostos investigados, o princípio doce steviosídeo foi o menos ativo. Foi concluído que, em adição aos seus efeitos inibitórios, os produtos naturais da *Stevia rebaudiana* podem agir também como desacoplantes da fosforilação oxidativa. As possíveis conseqüências fisiológicas da ingestão do steviosídeo e dos extratos aquosos da *Stevia rebaudiana* são discutidos.

SUMMARY

The effect of several natural products extracted from the leaves of *Stevia rebaudiana* on rat liver mitochondria was investigated. The compounds used were stevioside (a non-caloric sweetener), steviolbioside, isosteviol and steviol. Total aqueous extracts of the leaves were also investigated. *Stevia rebaudiana* natural products inhibited oxidative phosphorylation, 2,4-dinitrophenol stimulated ATP-ase activity, NADH-oxidase activity, succinate-oxidase activity

succinate dehydrogenase and L-glutamate dehydrogenase. The ADP/O-ratio was decreased. Substrate respiration (state II respiration) was increased at low concentrations (up to 0.5 mM) and inhibited at higher concentrations (1 mM or more). In uncoupled mitochondria, inhibition of substrate respiration was the only effect observed. Net proton ejection induced by succinate and swelling induced by several substrates was inhibited. Among the compounds investigated, the sweet principle stevioside was the less active. It was concluded that in addition to its inhibitory effects, *Stevia rebaudiana* natural products may also act as uncouplers of oxidative phosphorylation. The possible physiological consequences of the ingestion of stevioside and *Stevia rebaudiana* aqueous extracts are discussed.

INTRODUÇÃO

A *Stevia rebaudiana* é um arbusto do Brasil e do Paraguai, pertencente à família das compostas (Bridel e Lavieille, 1931). As folhas desta planta contêm grandes quantidades (5% do peso seco) de steviosídeo, um adoçante 300 vezes mais doce que a sacarose (Bridel e Lavieille, 1931). Este adoçante está atualmente assumindo grande significado no Brasil e no Japão, como um novo adoçante não-calórico. O steviosídeo é um glicosídeo formado por três moléculas de glucose, e o steviol é um álcool carboxílico diterpênico (fig. 1; Bridel e Lavieille, 1931; Wood *et al.*, 1955; Mosettig e Nes, 1955). Além do steviosídeo, as folhas da *Stevia rebaudiana* contêm ainda diversos derivados, tais como o rebaudiosídeo A (2% do peso seco), rebaudiosídeo B, steviolbiosídeo, steviol (fig. 1), diversos dos quais são também doces (Kohda *et al.*, 1976). Em consequência do seu alto teor em glicosídeos doces, as folhas da *Stevia rebaudiana* têm acentuado sabor doce.

Ao lado das propriedades organolépticas, a planta também é conhecida por seus efeitos fisiológicos e terapêuticos. Foi descrito que os extratos aquosos da *Stevia rebaudiana* são capazes de diminuir a glicemia (Miquel, 1966), e também que eles têm propriedades cardiotônicas (Schmeling, 1977) e anticoncepcionais (Planas e Kué, 1968). Maior atenção foi dedicada pelos pesquisadores ao efeito hipoglicemiante. A regulação dos níveis de glucose sanguínea em pacientes diabéticos foi descrita por Miquel (1966). O mesmo efeito foi observado em experimentos realizados com coelhos aloxanizados (von Schmeling *et al.*, 1977). Foi comunicado também que a administração de extratos das folhas da *Stevia rebaudiana* a pacientes normais altera significativamente a tolerância à glucose (Alvarez *et al.*, 1981). Estes efeitos foram observados apenas com o extrato aquoso total das folhas. O steviosídeo, principal princípio doce, não possui efeito hipoglicemiante.

A ação hipoglicêmica pode ser uma indicação de alterações no metabolismo celular. O próprio steviosídeo, que não tem efeito sobre o nível de açúcar sanguíneo, não parece ser completamente inerte. De fato, como foi mostrado por Vignais *et al.*, 1966), o steviosídeo e o steviol inibem o transporte de ADP/ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Como o uso do steviosídeo e das folhas da *Stevia rebaudiana* (na forma de infusões aquosas), no Brasil e no Japão, aumenta continuamente, investigações precisas e detalhadas sobre a sua ação são indispensáveis. Com este propósito, a *Stevia rebaudiana* foi introduzida em nosso laboratório. Experiências preliminares realizadas com mitocôndrias isoladas de fígado de rato e células intatas mostraram que o efeito dos produtos naturais da *Stevia rebaudiana* não é restrito à inibição do transporte de ADP/ATP. Como um conhecimento prévio do efeito sobre mitocôndrias isoladas pode ser importante para a interpretação de experimentos subseqüentes com células intatas e organismos, decidiu-se realizar primeiramente um estudo sistemático com quatro compostos purificados e o extrato aquoso total das folhas. Os compostos investigados foram o steviosídeo, o steviolbiosídeo, o steviol e o isosteviol (fig. 1). O steviosídeo e o steviolbiosídeo são representativos dos dois tipos principais de glicosídeos que ocorrem nas folhas da *Stevia rebaudiana*, enquanto que o steviol e o isosteviol são as duas formas principais da aglucona livre (Kohda *et al.*, 1976). Os resultados devem fornecer informações sobre o mecanismo de ação dos produtos naturais da *Stevia rebaudiana* e ajudar na interpretação de experimentos subseqüentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Enzimas e coenzimas (ADP, ATP, NAD⁺, NADH, NADP⁺, e NADPH), antimicina A, rotenona, oligomicina, atractilato de sódio, 2,4-dinitrofenol e carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil hidrazona (FCCP) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. Os demais reagentes foram adquiridos da Merck, da Carlo Erba e da Reagen.

Steviosídeo cristalino foi purificado a partir de folhas secas da *Stevia rebaudiana*, conforme descrito anteriormente (Alvarez *et al.*, 1981). O steviolbiosídeo foi obtido por hidrólise básica, e o isosteviol por hidrólise ácida do steviosídeo, essencialmente conforme descrito por Kohda *et al.* (1976). O steviol foi obtido por hidrólise enzimática do steviosídeo com pectinase (poli(1,4- α -D-galacturonídeo) – glicano-hidrolase; EC 3.2.1.15), conforme descrito por Mosettig e Nes (1955).

O extrato aquoso total das folhas da *Stevia rebaudiana* foi preparado por extração com água quente. Folhas secas foram suspensas em 1000 ml de água quente (100°C – 0,1 g por ml). Após 30 minutos, a suspensão foi filtrada através de várias camadas de gaze, e o filtrado foi usado nos experimentos.

Steviol, isosteviol e steviolbiosídeo foram adicionados às incubações, ou como soluções alcalinas (pH 8-9), ou como soluções alcoólicas. Controles adequados foram feitos para excluir efeitos inespecíficos do solvente. O steviosídeo foi dissolvido diretamente no meio de incubação.

Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato:

Para medidas de consumo de oxigênio e da atividade ATP-ásica, as mitocôndrias foram isoladas de acordo com Voss *et al*, 1961), utilizando-se meio de extração com manitol e sacarose. Medidas de *swelling* e efluxo de prótons, por outro lado, foram feitas com mitocôndrias isoladas de acordo com a técnica descrita por Packer *et al*, 1966), utilizando-se meio à base de sacarose.

Rompimento das mitocôndrias por congelamento-descongelamento e extração das enzimas solúveis

Mitocôndrias intatas, isoladas de acordo com Voss *et al*, 1961) e suspensas em meio de extração (30 mg de proteína por ml), foram congeladas a -10°C por 24 horas, descongeladas à temperatura ambiente e mantidas a $0-4^{\circ}\text{C}$ para o uso. Esta preparação foi usada para o ensaio das atividades enzimáticas ligadas à membrana. Para o ensaio de enzimas solúveis, da matriz mitocondrial, as membranas rompidas foram eliminadas por centrifugação a 30.000 g por 60 minutos. O sobrenadante (fração solúvel) foi usado como fonte de enzima para os ensaios.

Consumo de oxigênio e determinação das razões ADP/O

O consumo de oxigênio foi medido polarograficamente, conforme descrito por Voss *et al*, 1963), usando-se o seguinte meio de incubação: fosfato, 5 mM; tris-(hidroximetil) aminometano (Tris-HCl), 20 mM (pH 7,4); etilenodiaminotetraacetato dissódico (EDTA), 0,2 mM; cloreto de potássio, 10 mM; e manitol 0,25 M. As razões P/O foram calculadas como razões ADP/O, segundo Chance e Williams, 1955).

Entumescimento ("swelling") mitocondrial

O "*swelling*" dependente do fluxo de elétrons e da hidrólise do ATP foi seguido espectrofotometricamente a 575 nm, conforme descrito por Packer *et al*, 1966). O meio de reação continha: sacarose, 100 mM; Tris-HCl, 10 mM (pH 7,4); EDTA dissódico, 0,3 mM. Acetato de sódio (20 mM) foi adicionado como anion co-permeante.

Medidas da ejeção ativa de prótons

A ejeção de prótons dependente da respiração foi medida com eletrodo de vidro, usando-se succinato (8 mM) como doador de elétrons (Villalobo e Lehninger, 1979). O meio de incubação continha: cloreto de potássio, 0,15 M; Tris-HCl, 1 mM (pH 7,4); e rotenona, $7\ \mu\text{M}$. Calibração foi efetuada pela adição de quantidades conhecidas de HCl.

Atividade ATP-ásica

A atividade ATP-ásica foi medida seguindo-se a liberação de fosfato (Vignais *et al*, 1966) ou a liberação estequiométrica de prótons com um eletrodo de vidro (Mitchell e Moyle, 1968). Quando a liberação de fosfato foi medida, as mi-

tocôndrias (2 mg de proteína por ml) foram incubadas em meio de reação que continha cloreto de potássio (0,15 M), Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), 2,4-dinitrofenol (0,1 mM) e ATP (5 mM). A temperatura de incubação foi igual a 25°C. Após 5 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de uma solução de ácido perclórico fria (3 %), e o fosfato foi medido conforme descrito por Lowry e Lopez (1946). A liberação estequiométrica de prótons foi medida em meio de reação que continha cloreto de potássio (0,15 M), Tris-HCl (1 mM, pH 7,4), 2,4-dinitrofenol (0,1 mM) e ATP (0,28 mM).

Ensaio polarográfico das atividades enzimáticas

NADH-oxidase, succinato-oxidase e citocromo c-oxidase foram dosadas polarograficamente (Singer, 1974). O meio de ensaio continha: Tris-HCl, 20 mM (pH 7,4); cloreto de potássio, 10 mM; e 0,5 mg de proteína mitocondrial por ml (mitocôndrias rompidas por congelamento). No caso da NADH - e succinato-oxidase, a reação foi iniciada pela adição de NADH (1 mM) e succinato (8 mM), respectivamente. Para o ensaio da citocromo c-oxidase, a mistura de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) e de ácido ascórbico (0,3 e 2 mM, respectivamente) foi usada para reduzir o citocromo c endógeno na presença de antimicina A (5 µg/ml) (Mustafa *et al.*, 1968).

Ensaio espectrofotométrico de enzimas ligadas à membrana

Dados cinéticos da inibição da NADH-oxidase foram obtidos espectrofotometricamente a 340 nm, usando-se tampão Tris-HCl (20 mM; pH 7,4), a 25°C. A concentração de proteína esteve entre 20 e 100 µg/ml, e a concentração de NADH foi igual a 0,15 mM, exceto quando sistematicamente variada. NADH-desidrogenase (EC 1.6.99.3) e succinato-desidrogenase (EC 1.3.99.1) foram medidas a 420 nm, usando ferricianeto como aceptor de elétrons, de acordo com Singer (1974). A atividade da NADH citocromo c-reductase foi seguida a 550 nm (redução de ferrici-tocromo c), segundo Hatefi e Rieske (1974).

Ensaio de enzimas solúveis

A L-malato desidrogenase mitocondrial (L-malato: NAD oxido-redutase; EC 1.1.1.37), a isocitrato desidrogenase NADP⁺ específica (threo-D₅-isocitrato: NADP oxido-redutase, descarboxilante; EC 1.1.1.42), a L-glutamato desidrogenase (de fígado de rato ou de fígado bovino; L-glutamato NAD(P) óxido-redutase, deaminadora; EC 1.4.1.3) e a fumarase (L-malato hidrolíase; EC 4.2.1.2) foram ensaiadas conforme descrito por Bergmeyer *et al.* (1974). A isocitrato desidrogenase NAD⁺-dependente (threo-D₅-isocitrato: NAD oxido-redutase, descarboxilante; EC 1.1.1.42) de mitocôndrias de fígado de rato foi dosada de acordo com Plaut (1974). Hexoquinase de levedura (ATP: D-hexose 6-fosfotransferase; EC 2.7.1.1) foi medida potenciometricamente com eletrodo de vidro. O meio de incubação continha: Tris-HCl, 1 mM (pH 7,4); ATP, 0,3 mM; MgCl₂, 5 mM; e glucose, 7 mM.

Tratamento dos dados

Cada ponto experimental é a média de ao menos três medidas indepen-

dentos. As concentrações para 50% de inibição (valores de I_{50}) foram avaliadas por interpolação. Constantes de inibição (K_i) foram obtidas por ajuste da equação de Michaelis-Menten aos dados experimentais, conforme descrito por Wilkinson (1961).

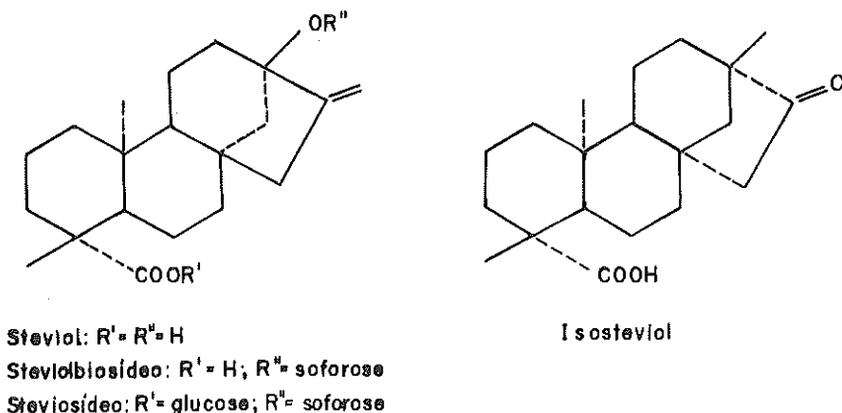


Figura 1 . Fórmulas estruturais do steviol, do steviolbiosídeo, do steviosídeo e do isosteviol (Kohda et al., 1976).

RESULTADOS

Efeito sobre a fosforilação acoplada à oxidação do L-glutamato

O efeito do steviosídeo, do steviolbiosídeo, do isosteviol e do steviol sobre a respiração acoplada à fosforilação do ADP e sobre as razões ADP/O está mostrado na Tabela I. As velocidades da respiração acoplada (consumo de oxigênio após a adição de ADP menos consumo de oxigênio antes da adição de ADP, sensível à oligomicina e ao atractilosídeo) são inibidas pelos quatro compostos, e as razões ADP/O são diminuídas. Dos quatro compostos, o steviosídeo é o que apresenta menor efeito. Altas concentrações de steviosídeo são requeridas (5 mM) para uma inibição total da ativação da respiração pelo ADP, enquanto que um efeito comparável já ocorre com steviolbiosídeo 0,6 mM e steviol ou isosteviol 0,45 mM. O efeito sobre as razões ADP/O é mais evidente com o steviol e o isosteviol. O valor-controle de 2,6 é reduzido para valores ao redor de 1,0 por isosteviol e steviol presentes numa concentração igual a 0,23 mM.

Efeito sobre a respiração dependente de substrato

Em adição à respiração acoplada, a respiração dependente unicamente de substrato também é afetada. A natureza (ativação ou inibição) e extensão do efeito dependem não apenas da concentração do inibidor, mas também das condições de incubação e do estado metabólico das mitocôndrias. O efeito mais pronunciado foi observado com o isosteviol. A figura 2 ilustra resultados típicos obtidos com este composto. As mitocôndrias foram pré-incubadas (2-3 minutos) na presença de con-

TABELA I

Efeito do steviosídeo, do steviolbiosídeo, do isosteviol e do steviol sobre a fosforilação oxidativa acoplada à oxidação de L-glutamato em mitocôndrias de fígado de rato. Mitocôndrias (0,5 a 1,0 mg de proteína por ml) foram incubadas em meio de reação descrito em "Materiais e Métodos". A concentração de L-glutamato foi igual a 8 mM. O consumo de oxigênio foi registrado graficamente. ADP (200 nmol por ml) foi adicionado em tempos adequados. A velocidade da respiração refere-se à diferença entre o consumo de oxigênio após a adição de ADP e antes da adição de ADP.

Exp. nº	Inibidores	Concentração (mM)	Velocidade da respiração (nmol por minuto por mg. de proteína)	Razão ADP/O
1	Nenhum Steviosídeo	-	50±4	2,5±0,3
		0,6	47±2	2,5±0,2
		1,2	33±3	2,3±0,3
		5,0	0	-
2	Nenhum Steviolbiosídeo	-	38±2	2,7±0,3
		0,15	25±4	2,2±0,3
		0,3	13±1	2,1±0,2
		0,6	0	-
3	Nenhum Isosteviol	-	59±3	2,6±0,2
		0,1	25±2	1,6±0,2
		0,23	16±2	1,2±0,2
		0,45	0	-
4	Nenhum Steviol	-	66±6	2,6±0,3
		0,1	24±3	1,7±0,3
		0,23	11±1	1,0±0,2
		0,45	0	-

concentrações variáveis de isosteviol, na presença ou ausência de desacoplante (2,4-dinitrofenol 0,1 mM). A respiração foi iniciada pela adição de um substrato (L-glutamato ou succinato), sendo que os valores de velocidade inicial computados foram representados contra as concentrações de isosteviol. Na presença de desacoplante, o consumo de oxigênio é inibido pelo isosteviol. Foi observada 50% de inibição com isosteviol 0,5 mM, quando succinato foi o substrato. Quando L-glutamato foi o substrato, 50% de inibição ocorreu com isosteviol 0,4 mM. Sem desacoplante no meio de incubação, no entanto, uma ativação do consumo de oxigênio ocorre em concentrações baixas (0,25 mM). Somente em concentrações maiores (1 mM), uma inibição em relação ao controle pôde ser observada. Na presença de altas concentrações de isosteviol, as velocidades de respiração com e sem desacoplante são praticamente as mesmas. Um experimento similar àquele mostrado na figura 2 foi realizado com ascorbato mais TMPD como doador de elétrons, na presença de antimicina A. Nenhuma inibição foi verificada com isosteviol, ao menos até a concentração de 1 mM. Na ausência de desacoplante, no entanto, uma pequena ativação foi encontrada (no máximo 20%).

Experimentos similares àqueles mostrados na figura 2 foram realizados com steviolbiosídeo (até concentração de 1 mM), steviosídeo (até concentração de 2 mM) e steviol (até 1 mM). Qualitativamente os resultados foram comparáveis àqueles obtidos com o isosteviol. Uma ativação da respiração na ausência de desacoplante

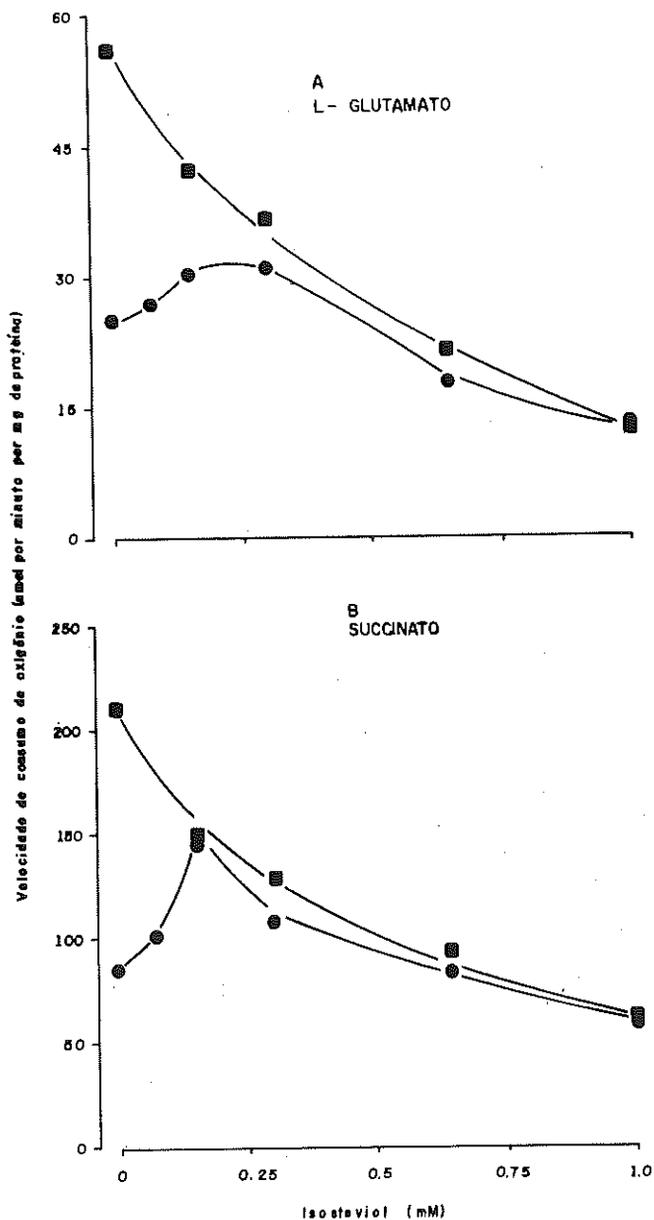


Figura 2. Efeito do isosteviol sobre a respiração dependente de substrato. Mitocôndrias (0,5 mg de proteína por ml) foram incubadas a 25°C em meio de reação (Voss et al., 1961), na presença (■) e na ausência de 2,4-dinitrofenol 0,1 mM (●). O consumo de oxigênio foi seguido polarograficamente. As velocidades iniciais de consumo de oxigênio foram expressas em nmol de O₂ por minuto por mg de proteína e representadas contra a concentração de isosteviol. A: L-glutamato 8 mM como substrato; B: succinato 8 mM.

te, similar àquela observada com o isosteviol, foi verificada com o steviol. A ativação máxima (45% em relação ao controle) ocorre com o steviol 0,5 mM. O efeito foi praticamente o mesmo com succinato ou com L-glutamato como substratos. O steviolbiosídeo, por outro lado, ativa a respiração dependente de succinato (no máximo 40% de ativação com o steviolbiosídeo 0,15 mM), mas não houve ativação quando L-glutamato era o substrato. O steviosídeo, finalmente, em concentrações até 5 mM, é incapaz de aumentar o consumo de oxigênio. Nas concentrações mais altas utilizadas, todos os compostos inibem a respiração dependente de substrato. Com L-glutamato como doador de elétrons, conforme se pode verificar na tabela III, a eficiência dos compostos como inibidores decresce ao longo da série isosteviol > steviolbiosídeo > steviol > steviosídeo.

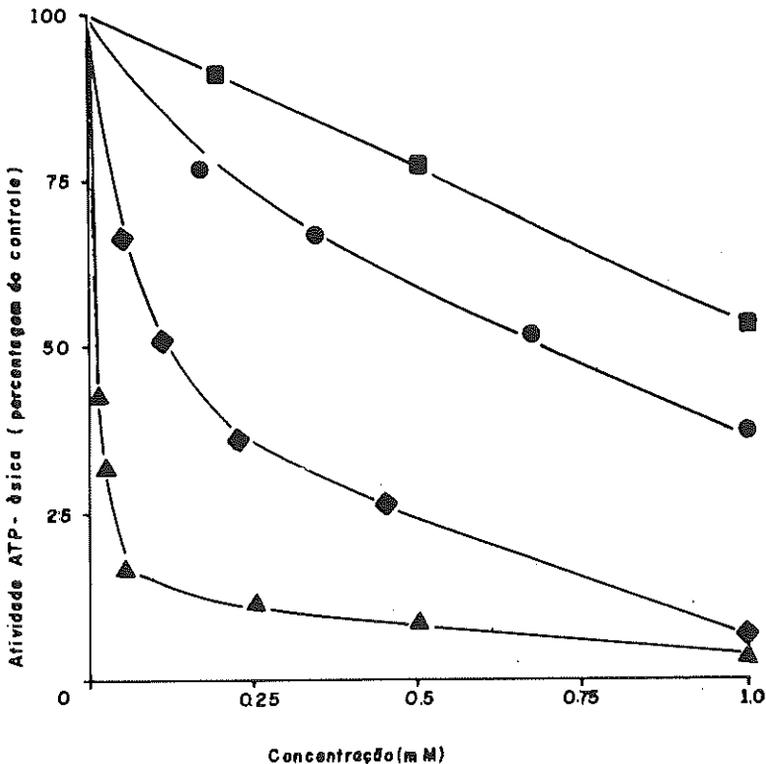


Figura 3. Efeito do isosteviol, do steviol, do steviolbiosídeo e do steviosídeo sobre a ATP-ase estimulada por 2,4-dinitrofenol de mitocôndrias intatas de fígado de rato. Mitocôndrias (0,2 mg de proteína por ml) foram incubadas em meio de reação que continha KCl 0,15 M, Tris-HCl 1 mM e 2,4-dinitrofenol 0,1 mM. A temperatura da incubação foi igual a 25°C, e o pH inicial foi de 7,4. A reação foi iniciada pela adição de uma solução neutralizada de ATP (concentração final igual a 0,3 mM). A liberação estequiométrica de prótons foi seguida com o eletrodo de vidro. As velocidades medidas na presença de inibidores foram expressas como percentagem do controle correspondente. Steviol: ▲; isosteviol: ◆; steviolbiosídeo: ●; steviosídeo: ■.

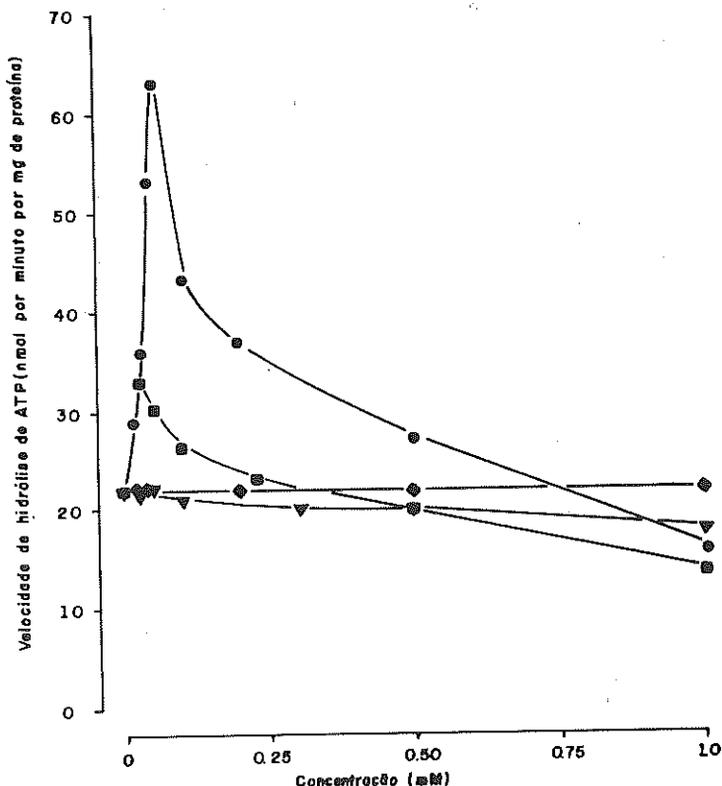


Figura 4. Efeito do isosteviol, do steviol, do steviolbiosídeo e do steviosídeo sobre a hidrólise de ATP em mitocôndrias intatas de fígado de rato. As mitocôndrias foram incubadas a 25°C em meio de reação que continha cloreto de potássio (0,15 M), Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) e ATP (5 mM). A concentração de proteína foi igual a 2 mg/ml. Após 10 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de solução resfriada de ácido perclórico, e o fosfato liberado foi medido conforme é descrito por Lowry e Lopez (1946). As velocidades de liberação de fosfato (expressas em nmol por minuto por mg de proteína) foram representadas contra a concentração de cada composto. Isosteviol: ●; steviol: ■; steviolbiosídeo: ◆; steviosídeo: ▼.

Efeito sobre a atividade ATP-Ásica

A figura 3 mostra os resultados de uma investigação sistemática do efeito do isosteviol, do steviol, do steviolbiosídeo e do steviosídeo sobre a ATP-ase estimulada por 2,4-dinitrofenol, em mitocôndrias de fígado de rato. Todos os compostos inibem a hidrólise de ATP. As concentrações de steviol, isosteviol, steviolbiosídeo e steviosídeo que produzem 50% de inibição são 0,02, 0,1, 0,6 e 1,2 mM, respectivamente. Os resultados da figura 3 foram obtidos medindo-se a liberação estequiométrica de prótons, que segue a hidrólise de ATP (Mitchel e Moyle, 1968). Medidas de liberação de fosfato, no entanto, revelaram efeito praticamente idêntico. Resultados idênticos foram também obtidos com ambos os métodos quando atractilósídeo foi o inibidor. 50% de inibição da ATP-ase es-

timulada pelo 2,4-dinitrofenol foi encontrada com atractilósídeo $1 \mu\text{M}$, resultado que também foi comunicado por (Mitchell e Moyle, 1968).

Um quadro diferente resulta de uma investigação da hidrólise de ATP na ausência de desacoplante. Os resultados de uma investigação deste tipo estão mostrados na figura 4. Como pode ser visto, a ATP-ase sensível à oligomicina (e ao atractilósídeo) é ativada pelo steviol e pelo isosteviol, quando estes compostos estão presentes em baixas concentrações. Com o isosteviol, o efeito é mais pronunciado, e uma ativação máxima ocorre a uma concentração de $0,06 \text{ mM}$. O efeito do steviol é bem menor, mas reprodutível. Ativação máxima ocorre a $0,03 \text{ mM}$. Não foi encontrada ativação com o steviolbiosídeo até uma concentração de 1 mM , e com o steviosídeo até uma concentração de 5 mM . O tipo de curva mostrado na figura 4 (ativação seguida de inibição) sugere, ao menos no caso do isosteviol e do steviol, que a inibição da fosforilação oxidativa não pode ser atribuída unicamente a uma inibição do transporte de adenina nucleotídeos (Vignais *et al.*, 1966).

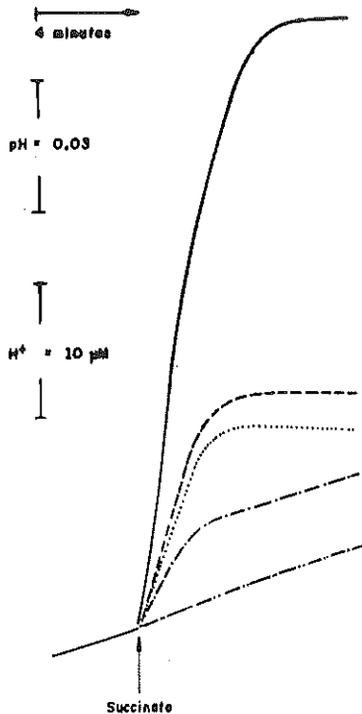


Figura 5. Efeito do isosteviol sobre a ejeção ativa de prótons induzida pelo succinato. Mitocôndrias de fígado de rato ($0,9 \text{ mg}$ de proteína por ml) foram incubadas a 25°C em meio de reação que continha $\text{KCl } 0,15 \text{ M}$, $\text{Tris-HCl } 1 \text{ mM}$ e $\text{rotenona } 7 \mu\text{M}$, na ausência e na presença de inibidores. O pH inicial foi igual a $7,4$. A ejeção de prótons foi iniciada pela adição de succinato 8 mM e registrada potenciométricamente. Controle: —; isosteviol $0,13 \text{ mM}$;; isosteviol $0,2 \text{ mM}$: — — —; isosteviol $0,4 \text{ mM}$: — · — · —; antimicina A ($3 \mu\text{g/ml}$): — — — — —.

Efeito sobre a ejeção ativa de prótons dependente do fluxo de elétrons:

A fim de obter informações sobre o mecanismo de ação dos produtos naturais da *Stevia rebaudiana*, o efeito sobre o efluxo líquido de prótons induzido pelo succinato em mitocôndrias de fígado de rato foi investigado. Mitocôndrias foram isoladas em meio que continha sacarose (0,33 M) e incubadas em solução de KCL (0,15 M), tamponada com Tris 1 μ M, a qual continha também rotenona 7 μ M. A concentração de prótons foi monitorada potenciométricamente. Um experimento típico está mostrado na figura 5. A adição de succinato 8 mM induz uma significativa acidificação do meio de incubação. São ejetados 50 ng-íons por mg de proteína até que o estado de constância seja atingido. A pré-incubação com antimicina A previne o efluxo de prótons, indicação de que ele depende do transporte de elétrons. A pré-incubação com isosteviol, por outro lado, também previne o efluxo líquido de prótons. O efeito já é pronunciado com isosteviol 0,13 mM (70% de inibição). A esta concentração, o isosteviol ativa o consumo de oxigênio na ausência de desacoplante (fig. 2B). Com isosteviol 0,4 mM, o efluxo líquido de prótons está 90% inibido. Mesmo a esta concentração, a respiração não está inibida pelo isosteviol (fig. 2B). O efeito do isosteviol não pode ser atribuído a alterações na capacidade tamponante do meio de incubação, conforme foi mostrado por experiências-controle.

Experiências similares foram também feitas com steviolbiosídeo e steviosídeo. Foram investigadas concentrações que ou aumentam ou não exercem efeito sobre a respiração dependente de substrato. O efeito de ambos os compostos é menos pronunciado. Um decréscimo de 25% no efluxo líquido de prótons, por exemplo, foi achado com steviolbiosídeo 0,15 mM. Deve-se lembrar que steviolbiosídeo 0,15 mM ativa ao máximo o consumo de oxigênio com succinato como substrato. Foi observada 50% de inibição com steviolbiosídeo 0,4 mM. No caso do steviosídeo, por outro lado, somente concentrações acima de 1 mM exercem algum efeito sobre o efluxo líquido de prótons.

Efeito sobre o *swelling* mitocondrial

O estudo do efeito dos inibidores sobre o *swelling* mitocondrial com frequência proporciona informação útil acerca do seu mecanismo de ação. O trabalho osmótico, em mitocôndrias, depende da energia gerada pelo transporte de elétrons ou pela hidrólise do ATP (Mustafa *et al.*, 1966). Analisando os resultados descritos até agora, pode-se esperar um pronunciado efeito do isosteviol e de seus derivados. Como o isosteviol tem efeito mais pronunciado, uma investigação mais detalhada foi feita com este composto. A figura 6 mostra os resultados de uma experiência deste tipo. As variações no volume mitocondrial foram medidas conforme descrito por (Mustafa *et al.*, 1968), usando-se acetato como ânion co-permeante, sem a adição de ionóforos. Conforme é mostrado na figura 6, um decréscimo na absorvância ocorre após a adição de succinato. Este decréscimo é sensível à antimicina A e ao 2,4-dinitrofenol. O isosteviol afeta fortemente o "*swelling*" induzido por succinato. 50% de inibição ocorre com concentrações entre

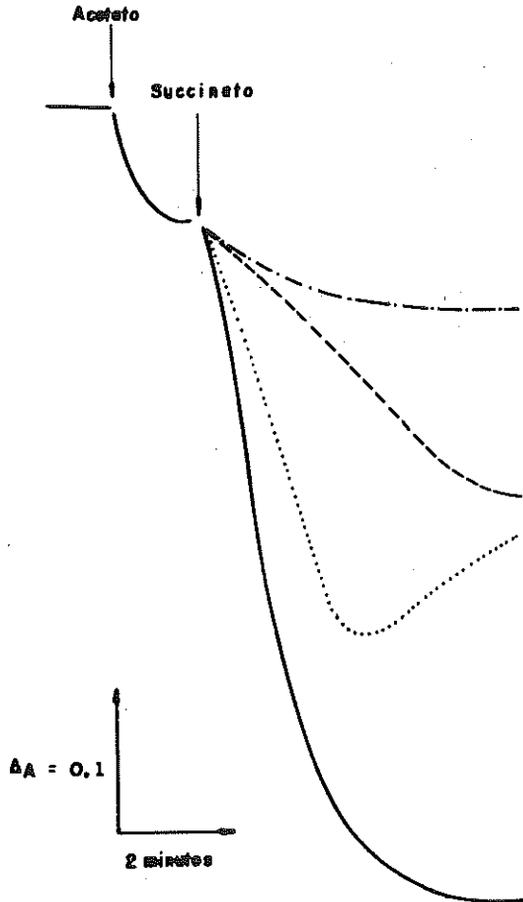


Figura 6. Efeito do isosteviol sobre o *swelling* mitocondrial causado por succinato. Mitocôndrias de fígado de rato (0,6 mg de proteína por ml) foram incubadas a 25°C em meio que continha sacarose 0,1 M, EDTA 0,3 mM e Tris-HCl 10 mM (pH 7,3), na ausência (controle) e presença de várias concentrações de isosteviol. Acetato de sódio 20 mM e succinato 8 mM foram adicionados, conforme registrado. Controle: —; isosteviol 0,2 mM: . . . ; isosteviol 0,4 mM: - - - -; isosteviol 0,8 mM: - · - · - ·.

0,13 e 0,2 mM. Com 0,4 mM, o *swelling* é reduzido a 10% do controle, aproximadamente. Deve-se notar que os resultados constantes na figura 6 são consistentes com as medidas de efluxo de prótons mostradas na figura 5.

O *swelling* dependente de L-glutamato (sensível à rotenona), o *swelling* dependente do TMPD-ascorbato (na presença de antimicina A, sensível ao cianeto) e o *swelling* dependente do ATP (sensível à oligomicina) foram também investigados. O efeito do isosteviol, do steviol, do steviolbiosídeo e do

steviosídeo encontra-se resumido na tabela III. Conforme se pode deduzir das concentrações que produzem 50% de inibição, o isosteviol é o inibidor mais potente, seguido do steviol e do steviolbiosídeo. O steviosídeo, princípio doce, é pouco ativo e, a rigor, somente a concentração que produz 50% de inibição sobre o *swelling* dependente de ATP pode ser medida. Isto se deve à baixa solubilidade do steviosídeo. Acima de 2 mM, a precipitação do steviosídeo torna medidas de *swelling* praticamente impossíveis.

TABELA II

Efeito do steviol (0,5 mM), do isosteviol (0,5 mM), do steviolbiosídeo (0,5 mM) e do steviosídeo (1 mM) sobre atividades enzimáticas. Métodos de incubação e sistemas foram descritos em "Materiais e Métodos". A fonte de enzima foram mitocôndrias de fígado de rato, exceto quando expressamente indicado.

Activity	Inibição (%)			
	Isosteviol (0,5 mM)	Steviol (0,5 mM)	Steviolbiosídeo (0,5 mM)	Steviosídeo (1 mM)
ATP-ase estimulada por DNP	80	92	45	50
NADH-oxidase	85	45	40	0
Succinato-oxidase	24	42	11	8
Succinato desidrogenase	24	46	10	10
NADH citocromo c-redutase (1)	82	-	50	0
L-glutamato desidrogenase (NADH)(2) ..	80	46	60	0
L-glutamato desidrogenase (NADPH)(2) ..	75	-	60	0
Citocromo c-oxidase				
Hexoquinase (3)				
Fumarase				
Isocitrato desidrogenase (NAD ⁺)	0	0	0	0
Isocitrato desidrogenase (NADP ⁺)				
L-malato desidrogenase				
NADH-desidrogenase				

(1) Sensível à rotenona

(2) Enzima de fígado de rato ou fígado bovino

(3) Enzima de levedura

Efeito sobre atividades enzimáticas:

O efeito do steviol, do isosteviol, do steviolbiosídeo e do steviosídeo sobre diversas atividades enzimáticas encontra-se resumido na tabela II. Ao lado da ATP-ase mitocondrial (já discutida linhas atrás), há um razoável número de atividades enzimáticas que são inibidas pelos compostos em estudo. A NADH-oxidase é fortemente afetada pelo isosteviol; o steviol e o steviolbiosídeo também são ativos, mas o steviosídeo não tem ação inibidora, ao menos em concentrações até 5 mM. A NADH-desidrogenase (ferricianeto-redutase) não é inibida. Um estudo cinético realizado com isosteviol e steviolbiosídeo (fig. 7) mostra que a inibição é linear (completa) e não-competitiva. As constantes de inibição, avaliadas através de um ajuste de mínimos-quadrados (Wilkinson, 1961), são iguais a 0,1 e 0,6 mM, respectivamente.

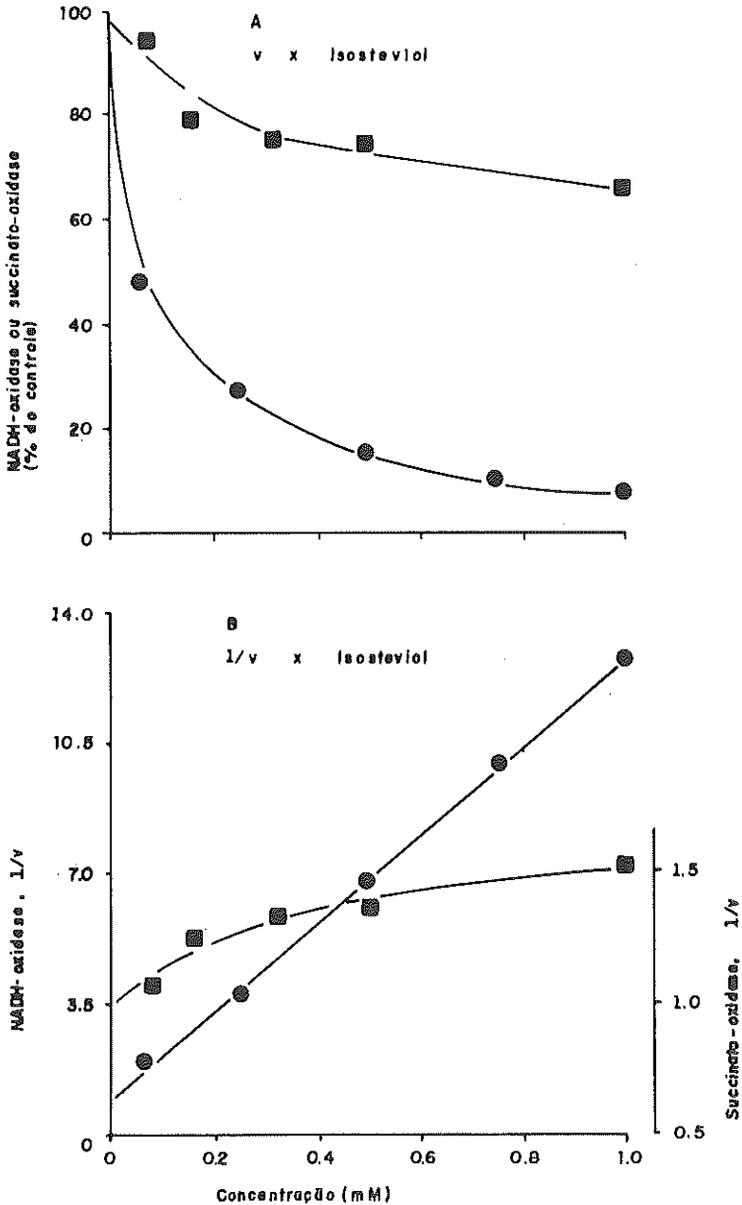


Figura 7. Inibição da NADH-oxidase e da succinato-oxidase pelo isosteviol: dependência da concentração. Mitocôndrias rompidas por congelamento foram incubadas em Tris-HCl (20 mM; pH 7,4), a 25°C. A NADH-oxidase (●) foi medida espectrofotometricamente a 340 nm, com 100 µg de proteína por ml do meio de incubação. A concentração inicial de NADH foi igual a 0,1 mM. A succinato-oxidase (■) foi ensaiada polarograficamente com 0,5 mg de proteína por ml e com uma concentração inicial de succinato igual a 8 mM. A: velocidade de reação (expressa como porcentagem do controle) versus concentração de isosteviol; B: recíproca da velocidade de reação versus concentração de isosteviol.

A atividade de succinato-oxidase, por outro lado, é mais fracamente inibida pelo isosteviol, sendo o steviol o inibidor mais potente. O steviolbiosídeo e o steviosídeo são inibidores fracos da succinato-oxidase. A succinato desidrogenase (ferricianeto redutase) também é afetada. Os graus de inibição são os mesmos que aqueles medidos para a succinato oxidase. Esta observação sugere fortemente que o sítio de ação sobre a succinato-oxidase é a porção flavoproteína (succinato desidrogenase). Além disto, em contraste com a cinética da NADH-oxidase, a inibição da succinato-oxidase é hiperbólica (fig. 7).

Das enzimas solúveis investigadas, uma inibição foi encontrada apenas com a L-glutamato desidrogenase. O isosteviol é o inibidor mais potente, seguido pelo steviol e pelo steviolbiosídeo. O steviosídeo não inibe a enzima. Deve-se notar que o efeito é praticamente o mesmo com ambas as coenzimas, NADH e NADPH. Além disto, nenhuma diferença entre as enzimas de fígado de rato e de fígado de boi foi detectada.

Nenhum efeito foi verificado sobre a citocromo c-oxidase, hexoquinase, fumarase, isocitrato desidrogenases (NAD⁺ – e NADP⁺ – dependente) e L-malato desidrogenase. Estes resultados negativos, no entanto, proporcionam ótimos controles para a exclusão de efeitos inespecíficos ou artifícios de técnica. Isto é particularmente verdadeiro para a hexoquinase, a qual foi ensaiada potenciometricamente. Os resultados negativos obtidos mostram que os compostos investigados neste trabalho não alteram significativamente a capacidade tamponante do meio de incubação tamponado a pH 7,4 com Tris 1 mM.

TABELA III

Concentrações de isosteviol, steviol, steviolbiosídeo e steviosídeo que causam 50% de inibição sobre uma série de parâmetros (valores de I₅₀). Métodos e sistemas de incubação foram descritos em "Materiais e Métodos".

Parâmetro	Valores de I ₅₀ (mM)			
	Isosteviol	Steviol	Steviolbiosídeo	Steviosídeo
Respiração acoplada (Estado III)	0,07	0,05	0,25	2,5
Respiração desacoplada (com L-glutamato como substrato)	0,4	0,9	0,6	2,0
ATP-ase estimulada por DNP	0,1	0,02	0,6	1,2
Atividade NADH-oxidase	0,1	0,6	0,6	5,0
L-glutamato desidrogenase	0,15	0,55	0,6	5,0
Swelling dependente de ATP	0,1	0,1	1,0	2,0
Swelling dependente de L-glutamato	0,06	0,13	0,3	2,0
Swelling dependente de succinato	0,1	0,2	0,4	2,0
Swelling dependente de TMPD-ascorbato (na presença de antimicina A)	0,05	0,1	0,8	2,0
Efluxo de prótons induzido por succinato	0,1	-	0,4	2,0

Efeito do extrato aquoso total das folhas da *Stevia rebaudiana* sobre alguns parâmetros selecionados:

O extrato aquoso total das folhas da *Stevia rebaudiana* tem uma composição complexa. Steviosídeo e rebaudiosídeo perfazem 5 e 2%, respectivamente, do peso da folha seca (Kohda *et al.*, 1976). Todos os outros derivados perfazem individualmente 0,05% ou menos do peso seco das folhas (Kohda *et al.*, 1976; Sakamoto *et al.*, 1975; Kobayashi *et al.*, 1977; Sakamoto *et al.*, 1977; Sakamoto *et al.*, 1977). Muitos outros compostos existem ainda nos extratos totais, e deve-se tomar cuidado ao investigar a sua ação. Estes extratos aquosos são usados por grande número de pessoas, no entanto, e algum conhecimento acerca de sua ação é altamente desejável. Levando em conta os efeitos observados com o steviosídeo e derivados, três parâmetros foram selecionados neste trabalho. São eles: a atividade ATP-ásica, a atividade NADH-oxidase e a L-glutamato desidrogenase. Como era esperado, encontrou-se inibição sobre as três atividades enzimáticas. Foi encontrada 50% de inibição da ATP-ase, NADH-oxidase e L-glutamato desidrogenase, com uma concentração final de steviosídeo igual a 0,2, 0,007 e 0,004 mM, respectivamente. É evidente que o steviosídeo, o principal princípio doce, contribui muito pouco para o efeito do extrato total. Mais provavelmente, todos os derivados do steviosídeo contribuem de alguma forma. A possibilidade, no entanto, de que outros compostos, não pertencentes ao grupo do steviosídeo, estejam contribuindo também não pode ser excluída com os dados disponíveis até o presente.

DISCUSSÃO

Os resultados descritos neste artigo sobre o efeito dos produtos naturais da *Stevia rebaudiana* em mitocôndrias de fígado de rato forneceram informações muito úteis para experiências subseqüentes, principalmente no que tange ao efeito metabólico em sistemas de células intatas. A observação original de Vignais *et al.* (1966) sobre o efeito inibitório do steviol e do steviosídeo sobre a fosforilação foi confirmada neste trabalho. Conforme foi mostrado pelos citados autores, o efeito pode ser atribuído a uma inibição do transporte de ADP/ATP para a matriz mitocondrial e vice-versa. O presente estudo igualmente confirma o efeito do steviol sobre a NADH-oxidase, o qual foi também originalmente demonstrado por Vignais *et al.* (1966). Conforme é mostrado pelas nossas experiências, os efeitos sobre a fosforilação e sobre a NADH-oxidase podem ser estendidos ao steviolbiosídeo e ao isosteviol. Além disto, nosso trabalho revelou alguns aspectos novos da ação dos produtos naturais da *Stevia rebaudiana* sobre mitocôndrias de fígado de rato. Evidências foram trazidas à luz, por exemplo, em favor de um efeito desacoplante, e um pronunciado efeito sobre a L-glutamato desidrogenase foi encontrado.

Uma característica interessante do efeito do steviol e do isosteviol é o aumento na velocidade de oxidação de substratos que ocorre na ausência de desacoplante e quando aqueles compostos estão presentes em baixas concentrações. Neste sentido, eles se comportam como ácidos graxos de cadeia longa. Conforme foi mostrado por Vásquez-Colón *et al.* (1966), ácidos graxos de cadeia longa também aceleram a respiração na ausência de ADP, quando presentes em baixas concentrações. É bem conhecido o fato de que desacoplantes ativam o consumo de oxigênio (Hanstein, 1976). No presente caso, no entanto, a interpretação é mais complexa, já que os mesmos compostos também inibem o consumo de oxigênio quando presentes em altas concentrações e quando um desacoplante como o 2,4-dinitrofenol (ou FCCP) está presente no meio de incubação. Não obstante, uma série de observações sugere fortemente que o steviol e o isosteviol (e em menor extensão o steviolbiosídeo e o steviosídeo) realmente agem como desacoplantes. O primeiro argumento é o decréscimo na razão ADP/O, observado quando o steviol e o isosteviol estão presentes no meio de incubação. Para o steviol, aliás, o mesmo efeito havia sido observado por Vignais *et al.* (1966). O segundo argumento baseia-se na comparação dos efeitos sobre o consumo de oxigênio e o efluxo de prótons induzido por succinato. Enquanto que o consumo de oxigênio é ativado, o efluxo de prótons é inibido, combinação de eventos comumente encontrada com desacoplantes (Villalobo *et al.*, 1979; Mitchell e Moyle, 1967; Papa, 1976). É, portanto, possível que o isosteviol e seus análogos atuem como protonóforos, como é o caso também dos desacoplantes clássicos (Hanstein, 1976). Um argumento similar é fornecido pelo efeito sobre o *swelling* mitocondrial. O entumescimento causado pelo transporte de elétrons ou pela hidrólise de ATP, na presença de acetato como ânion co-permeante, depende da ejeção ativa de prótons. Os prótons são carreados de volta à matriz mitocondrial pelas moléculas não-dissociadas do ácido acético (Mustafa, 1966). O efeito de desacoplantes sobre o *swelling* depende das condições de incubação e do tipo de *swelling*. Em concentrações bem baixas, os desacoplantes podem aumentar o *swelling* (Hanstein, 1976; Gooch, 1974). Em concentrações maiores, no entanto, desacoplantes como 2,4-dinitrofenol e FCCP inibem o *swelling*, assim como as oscilações controladas (Gooch e Packer, 1974). Em nossos experimentos, a inibição foi o único efeito observado com o isosteviol e seus análogos. No caso do *swelling* dependente de TMPD-ascorbato, por exemplo, já o isosteviol 15 μ M produz considerável efeito. Deve-se recordar que, no caso do *swelling* dependente do fluxo de elétrons, a inibição já ocorre em concentrações que não têm efeito sobre a respiração ou que ativam o consumo de oxigênio. O *swelling* dependente de ATP, por outro lado, é 50% inibido por isosteviol 0,1 mM, concentração na qual a hidrólise de ATP é ativada, e não inibida. A mais simples explicação para tal combinação de efeitos é a suposição de que, em baixas concentrações, o isosteviol e seus análogos inibem o "swelling" mitocondrial graças ao seu efeito desacoplante. Deve-se salientar que o efeito é inespecífico. Ele ocorre não apenas com L-glutamato como substrato, como também com succinato, e mesmo quando o *swelling* depende da oxidação do ascorbato pela citocromo c-oxidase. Significativamente, mesmo altas concentrações

de isosteviol não inibem a oxidação de ascorbato.

A dependência da oxidação de substrato na ausência de desacoplante da concentração do isosteviol e derivados (fig. 2) pode ser a resultante de dois efeitos: desacoplamento (o que, em princípio, tende a aumentar a velocidade do consumo de oxigênio) e inibição direta do transporte de elétrons (que tende a diminuir a velocidade de oxidação dos substratos). O mesmo aplica-se à hidrólise de ATP na ausência de um desacoplante clássico (fig. 4): o desacoplamento tende a aumentar a velocidade de hidrólise de ATP, mas a inibição do transporte de ATP (Vignais *et al.*, 1966) exerce uma influência negativa. Quando a cadeia respiratória já está acoplada por 2,4-dinitrofenol, por exemplo, não há ativação na oxidação ou na hidrólise de ATP, já que neste caso o sistema enzimático já está operando com sua capacidade máxima ou quase máxima. Consistentemente com a inibição da oxidação de L-glutamato e succinato em mitocôndrias desacopladas, uma inibição da NADH-oxidase e da succinato-oxidase também foi encontrada em mitocôndrias rompidas por congelamento (tabelas II e III). Os efeitos sobre ambas as atividades são possivelmente independentes. Os dados disponíveis são consistentes com dois sítios independentes de ação: o primeiro, entre a NADH-desidrogenase e a coenzima Q; o segundo, entre a succinato desidrogenase e a coenzima Q. Há vários argumentos a favor desta suposição. Um sítio de ação comum sobre ambas as atividades enzimáticas (entre a coenzima Q e a citocromo c-oxidase) resultaria em graus de inibição idênticos ou ao menos próximos. Este é, inclusive, o caso do steviol (tabela II), mas com o isosteviol e o steviolbiosídeo há uma grande diferença nos graus de inibição sobre ambas as atividades. O tipo de inibição (linear completa no caso da NADH-oxidase, e hiperbólica no caso da succinato-oxidase) é outro argumento em favor da existência de dois mecanismos independentes.

A possibilidade alternativa de dois sítios independentes de ação (o primeiro entre a NADH-desidrogenase e a coenzima Q, e o segundo entre a coenzima Q e a citocromo c-oxidase), por outro lado, levaria a um tipo mais complexo de inibição sobre a NADH-oxidase (inibição parabólica ou algum tipo mais complexo (Plowman, 1972). Esta última possibilidade também é improvável em virtude da observação de que a succinato-desidrogenase é afetada em grau idêntico ao da succinato-oxidase. Esta observação sugere fortemente que o sítio de ação da succinato-oxidase é a própria flavoproteína do sistema. Vignais *et al.* (1966) não acharam inibição da succinato-oxidase por parte do steviol. Eles usaram partículas mitocondriais obtidas por tratamento com digitonina como fonte de enzima. A discrepância pode ser o resultado dos diferentes graus de integridade estrutural de partículas de digitonina e mitocôndrias rompidas por congelamento-descongelamento. Além do mais, o efeito sobre a succinato-oxidase é consistente com o efeito observado sobre a oxidação do succinato em mitocôndrias intatas (fig. 2B). A atividade NADH-oxidase, por outro lado, é sensível ao steviol, mesmo aquela de partículas de digitonina (Vignais *et al.*, 1966). Esta observação reforça a suposição de que o efeito sobre a NADH-oxidase e o efeito sobre a succinato-oxidase possuem mecanismos independentes.

O uso de análogos estruturais com atividade biológica frequentemente permite tirar conclusões sobre os grupos moleculares envolvidos. No caso do steviosídeo e seus derivados, o grupo carboxila livre parece ter papel importante. Esse grupo parece ser pré-requisito para uma inibição da NADH-oxidase e da L-glutamato desidrogenase. Possivelmente ele tem algum papel também na inibição da fosforilação e na inibição da atividade ATP-ásica, já que o steviosídeo é menos ativo como inibidor. Uma comparação dos resultados da inibição do swelling (Tabela III), da ejeção de prótons (Tabela III), da ativação da hidrólise do ATP (fig. 4), da ativação da respiração dependente de substrato e do decréscimo na razão ADP/O (Tabela I) revela que a habilidade dos compostos em desacoplar a fosforilação oxidativa obedece à seqüência isosteviol > steviol > steviolbiosídeo > steviosídeo. O princípio doce steviosídeo é praticamente inativo como desacoplante. Isto pode estar relacionado com os fatos de que ele não tem uma carboxila livre e de que sua lipofilia é reduzida. Conforme pode ser deduzido de dados constantes na literatura, a lipofilia relativa dos compostos obedece à seqüência isosteviol \cong steviol > steviolbiosídeo > steviosídeo (Wood *et al.*, 1955; Mosettig e Nes, 1955; Kohda *et al.*, 1976; Alvarez *et al.*, 1981; Tanaka, 1980).

Foi demonstrado que extratos totais das folhas da *Stevia rebaudiana*, tais como aqueles normalmente ingeridos por humanos, afetam diversas funções mitocondriais, as mesmas funções que também são afetadas pelos produtos naturais contidos nas folhas da planta. A questão que surge agora é se a ação dos produtos da *Stevia rebaudiana*, sobre mitocôndrias explica alguns dos efeitos fisiológicos que têm sido descritos por diversos autores (Miguel, 1966; von Schmeling, 1967; Planas e Kué, 1968; von Schmeling *et al.*, 1977). Uma resposta definitiva certamente requerá maior evidência experimental, a ser obtida com sistemas de células intatas e organismos inteiros. Uma inibição da fosforilação oxidativa, no entanto, geralmente tem conseqüências importantes para o metabolismo celular. É bem conhecido o fato de que a inibição da síntese de ATP nas mitocôndrias gera um aumento na velocidade da glicólise e um decréscimo no ritmo da gluconeogênese. Recentemente foi demonstrado que os produtos naturais da *Stevia rebaudiana* são capazes de inibir a gluconeogênese em túbulos renais isolados (Yanamoto *et al.*, 1984). Em organismos inteiros isto pode levar à hipoglicemia (Gordon e Hartog, 1972), mas se este é realmente o mecanismo responsável pela ação hipoglicêmica da *Stevia rebaudiana* é questão a ser confirmada. O metabolismo do nitrogênio, por outro lado, também pode ser afetado pelo efeito inibitório sobre a L-glutamato desidrogenase, a qual tem papel-chave na produção de uréia.

O steviosídeo pode ser considerado como um inibidor fraco da fosforilação oxidativa. Como doses bem reduzidas são normalmente ingeridas, por causa do seu alto poder adoçante, é duvidoso se os níveis alcançados no organismo são suficientes para uma inibição significativa da fosforilação. Neste sentido, a atenção deverá ser dirigida bem mais para a possibilidade de uma hidrólise do steviosídeo a steviol ou isosteviol, seja no trato digestivo, seja na circulação. Esta possibilidade foi demonstrada no rato (Wingard *et al.*, 1980) e deveria merecer atenção, já que o ste-

viol e o isosteviol são inibidores muito mais potentes das funções mitocondriais que o steviosídeo. Uma resposta a esta questão e a muitas outras relacionadas é indispensável para o continuado uso do steviosídeo como adoçante não-calórico. O mesmo pode ser dito a respeito do uso das infusões aquosas das folhas da *Stevia rebaudiana*.

BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ, M., BAZZOTE, R. B., GODOY, G. L., CURY, R. e BOTION, L. M. Efeito do extrato aquoso da *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre parâmetros bioquímicos de pessoas adultas normais. Comunicação à X Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica. **Arq. Biol. Tecnol.** 24(1): 178, 1981.
- ALVAREZ, M., BRACHT, A. e ISHII, E. L. Extração do steviosídeo e outros componentes das folhas da *Stevia rebaudiana*. Comunicação prévia à X Reunião Anual da SBBq. **Arq. Biol. Tecnol.** 24(1): 179, 1981.
- BERGMEYER, H. V., GAWEHN, K. e GRASSL, M. Enzymes as biochemical reagents. In: Bergmeyer, H. V. (ed.), **Methods of enzymatic analysis**, New York, Academic Press, 1974, vol. 1, p. 425-522.
- BRIDEL, M. e LAVIEILLE, R. Sur le principe sucré des feúdes de kaá-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bertoni). **Compt. Rend. Acad. Sci.** 192:1123-1125, 1931.
- BRIDEL, M. e LAVIEILLE, R. Le principe à saveur sucrée du kaá-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bertoni). **Bull. Soc. Chim. Biol.** 13:636-655, 1931.
- CHANCE, B. e WILLIAMS, G. R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. **Nature** 175:1120-1121, 1955.
- GOOCH, V. D. e PACKER, L. Oscillatory systems in mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta** 346: 245-260, 1974.
- GORDON, E. E. e de HARTOG, M. Gluconeogenesis in renal cortical tubules; effect of phenformin. **Diabetes** 22(1): 50-57, 1973.
- HANSTEIN, W. G. Uncoupling of oxidative phosphorylation. **Biochim. Biophys. Acta** 456:129-148, 1976.
- HATEFI, M. G. e RIESKE, J. S. The preparation and properties of DNP-cytochrome c-reductase (complex I-III) of the respiratory chain. In: Colowick, S. P. e Kaplan, N. O. (ed.) - **Methods of Enzymology**, 1974, vol. X.
- KOBAYASHI, M., HORIKAWA, S., DEGRANDI, I. H., UENO, J., MITSUHASHI, H. Dulcosides A and B, new diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. **Phytochemistry** 16:1405-1408, 1977.
- KOHDA, H., KASAI, R., YAMASAKI, K., MURAKAMI, K. e TANAKA, O. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. **Phytochemistry**, 15:981-983, 1976.

- LOWRY, O. H. e LOPEZ, J. A. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. **J. Biol. Chem.** **162(1,3)**: 421-428, 1946.
- MIQUEL, O. Un nuevo hipoglicemiante oral (comunicación previa). **Rev. Med. Paraguaya** **7**: 200, 1966.
- MITCHELL, P. e MOYLE, J. Respiration driven proton translocation in rat liver mitochondria. **Biochem. J.** **105**: 1147-1162, 1967.
- MITCHELL, P. e MOYLE, J. Proton translocation coupled to ATP hydrolysis in rat liver mitochondria. **Eur. J. Biochem.** **4**: 530-539, 1968.
- MOSETTIG, E. e NES, W. R. Stevioside II. The structure of the aglucon. **J. Org. Chem.** **20**: 884-899, 1955.
- MUSTAFA, M. G., UTSUMI, K. e PACKER, L. Damped oscillatory control of mitochondrial respiration and volume. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** **24**: 381 - 385, 1966.
- MUSTAFA, M. G., GOWGER, M. L., LABBE, R. F. e KING, T. E. General nature of "Wurster's Blue shunts" in the respiratory chain. **J. Biol. Chem.** **243(8)**: 1908-1918, 1968.
- PACKER, L., UTSUMI, K. e MUSTAFA, M. G. Oscillatory states of mitochondria I - Electron and energy transfer pathways. **Arch. Biochem. Biophys.** **117**: 381-393, 1966.
- PAPA, S. Proton translocation reactions in the respiratory chains. **Biochim. Biophys. Acta** **456**: 39-84, 1976.
- PLOWMAN, K. M. **Enzyme kinetics**. New York, McGraw-Hill, 1972.
- PLANAS, G. M. e KUÉ, J. Contraceptive properties of *Stevia rebaudiana*. **Science** **162**: 1007, 1968.
- PLAUT, G. W. E. Isocitrate dehydrogenase (DPN-specific) from bovine heart. In: Colowick, S. P. e Kaplan, N. O. (ed.), **Methods of enzymology**, New York, Academic Press, 1974. vol. 2, p.650-656.
- SAKAMOTO, I., KOHDA, H., MURAKAMI, K. e TANAKA, O. Quantitative analysis of stevioside. **Yarugaku Zasshi** **95(12)**: 1507-1510, 1975.
- SAKAMOTO, I., YAMASAKI, K. e TANAKA, O. Application of CNMR spectroscopy to chemistry of natural glycosides: rebaudioside C a new sweet diterpene glycoside of *Stevia rebaudiana*. **Chem. Pharm. Bull.** **25(4)**: 844-846, 1977.
- SAKAMOTO, I., YAMASAKI, K. e TANAKA, O. Application of CNMR spectroscopy to chemistry of plant glycosides: rebaudiosides D and E, new sweet diterpene-glycosides of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Chem. Pharm. Bull.** **25(12)**: 2437-2439, 1977.
- SCHMELING, G.A. von, CARVALHO, F.N. e de ESPINOZA, A.D. *Stevia rebaudiana* Bertoni. Avaliação do efeito hipoglicemiante em coelhos aloxanizados. **Ciência e Cultura** **22(5)**: 599-601, 1977.

- SCHMELING, G. A. von. Caá-ehê. Edulcorante natural não calórico. **Boi. San. S. Lucas S. Paulo XCIV(5): 67-68**, 1967.
- SINGER, T. P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α -glycerophosphate dehydrogenases. In: Glick, D. (ed.) — **Methods of Biochemical Analysis**. New York, John Wiley & Sons, 1974, vol. 22, p. 123-175.
- TANAKA, O. Chemistry of *Stevia rebaudiana*, Bertoni. **Proc. Int. Symp. Natural Products Research**, p. 111-119, 1980.
- VÁSQUEZ-COLÓN, L., ZIEGLER, F. D. e ELLIOTT, W. B. On the mechanism of fatty acid inhibition of mitochondrial metabolism. **Biochem. 5(4): 1134-1139**, 1966.
- VIGNAIS, P. V., DUEE, E. D., VIGNAIS, P. M. e HUET, J. Effects of atractyligenin and its structural analogues on oxidative phosphorylation and on the translocation of adenine nucleotides in mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta 118:465-483**, 1966.
- VILLALOBO, A. e LEHNINGER, A. L. The proton stoichiometry of electron transport in Ehrlich ascites tumor mitochondria. **J. Biol. Chem. 254(11): 4352-4358**, 1979.
- VOSS, D. O., COWLES, J. C. e BACILA, M. A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. **Anal. Biochem. 6:211-222**, 1963.
- VOSS, D. O., CAMPELLO, A. P. e BACILA, M. The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Comm. 4:48-51**, 1961.
- WILKINSON, G. N. Statistical stimations in enzyme kinetics. **Biochem. J. 80: 324-332**, 1961.
- WINGARD, R. E., BROWN, J. P., ENDERLIN, F. E., DALE, J. A., HALE, R. L. e SEITA, C. T. Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. **Experientia 36: 519-520**, 1980.
- WOOD, H. B., ALLERTON, R., DIEHL, H. W. e FLETCHER, H. C. STEVIOSIDE, I. The structure of the glucose moieties. **J. Org. Chem 20:875-883**, 1955.
- YAMAMOTO, N. S., KELMER BRACHT, A. M., ISHII, E. L., KEMMELMEIER, F. S., ALVAREZ, M. e BRACHT, A. Effect of steviol and its structural analogues on glucose production and oxygen uptake in isolated cortical tubules. **Experientia (no prelo)**, 1984.

**DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA
DO STEVIOSÍDEO E SEUS
DERIVADOS COM O
SUCO DIGESTIVO DE
*Megalobulimus paranaguensis***

**MARIA DE LOURDES L. FERRARESI,
A. M. KELMER BRACHT E ADELAR BRACHT**

Laboratório de Metabolismo Hepático
Departamento de Farmácia e Bioquímica
Universidade Estadual de Maringá
Caixa Postal 331 – 87100 – Maringá – PR

RESUMO

O presente trabalho descreve os resultados de um estudo sobre a hidrólise enzimática do steviosídeo e do steviolbiosídeo – produtos naturais da *Stevia rebaudiana* – pelo suco digestivo do caramujo marinho *Megalobulimus paranaguensis*. Os dados foram obtidos medindo-se espectrofotometricamente a glucose liberada e os açúcares totais, fazendo-se uma análise cromatográfica dos produtos formados. Os resultados revelaram alguns aspectos do mecanismo de ação desta preparação. O suco digestivo do *M. paranaguensis* age de forma diferente de outras preparações descritas anteriormente, como é o caso da pectinase, da hesperidina-se e do suco digestivo do molusco *Helix pomatia*. Estas preparações hidrolizam tanto o steviosídeo como o steviolbiosídeo a steviol e glucose livre. O suco digestivo do *M. paranaguensis* libera apenas um mol de glucose por mol de steviosídeo ou de steviolbiosídeo. Os estudos indicam que o complexo enzimático deste suco digestivo provavelmente hidrolisa com velocidade apreciável apenas a ligação $\beta(1\rightarrow2)$ do radical soforosil. Neste sentido, o seu mecanismo de ação aproxima-se daquele da takadiastase, preparação descrita recentemente.

ABSTRACT

The present article reports on the enzymatic hydrolysis of stevioside and steviolbioside – natural products of *Stevia rebaudiana* – by the gastric juice of the marine

snail *Megalobulimus paranaguensis*. The data were obtained by spectrophotometric measurement of the released glucose and of total sugars, and so a chromatographic analysis of the resulting products was made. The results revealed some aspects of the acting mechanism of the preparation. The gastric juice of *M. paranaguensis* acts differently from other preparations described above such as pectinase, hesperidinase and the gastric juice of *Helix pomatia*. These preparations hydrolyse, not only the stevioside as well as the steviolbioside, the steviol and free glucose. The gastric juice of *M. paranaguensis* releases one mol of glucose per mol of stevioside or steviolbioside. The data obtained suggest that only the β (1 \rightarrow 2) - linkage of the sophorosyl moiety probably is hydrolysed with an appreciable rate by the enzymic complex of this digestive juice. In this sense, the mechanism of action of the gastric juice of *M. paranaguensis* resembles that of takadiastase, another preparation recently described.

INTRODUÇÃO

Sabe-se há bastante tempo que o suco digestivo do caracol *Helix pomatia* tem ação hidrolizante sobre o steviosídeo (Bridel e Lavielle, 1931). Foi graças a esta preparação enzimática que Bridel e Lavielle (1931) puderam demonstrar que o steviosídeo possuía três moléculas de glucose em sua estrutura, além da aglucona, por eles denominada steviol. Posteriormente, foram descritas mais duas preparações, as quais têm ação hidrolizante total sobre o steviosídeo e alguns de seus derivados. Uma delas é uma preparação impura de pectinase, extraída de *Aspergillus niger* (Tanaka, 1980). Uma das muitas atividades da preparação tem a propriedade de hidrolisar todas as ligações existentes na molécula do steviosídeo. Muito utilizada, também, é a hesperidinase (Kohda et al., 1976; Mosettig e Nes, 1955), de ação semelhante às anteriores.

Uma ação mais específica e seletiva em relação às diversas ligações da molécula de steviosídeo possui a mistura de enzimas digestivas conhecida pelo nome de takadiastase (Sankyo Co. Ltd.; Tanaka, 1980). Segundo Tanaka (1980), esta preparação hidrolisa seletivamente a ligação β (1 \rightarrow 2) do radical soforosil do steviosídeo (fig. 9).

Este trabalho relata uma série de experiências realizadas com uma nova preparação enzimática, a qual também tem ação seletiva no que tange à hidrólise do steviosídeo. Trata-se do suco digestivo do caranujo marinho *Megalobulimus paranaguensis* (Fontana et al., 1976), preparação rica em enzimas hidrolíticas. Como se verá, a ação desta preparação sobre o steviosídeo e seus derivados possibilitará a obtenção de derivados normalmente não encontrados nas folhas da *Stevia rebaudiana*. Tais derivados poderão ser úteis em estudos bioquímico-farmacológicos ou como hormônios de crescimento em vegetais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

O steviosídeo cristalizado foi cedido pelo Dr. Mauro Alvarez. O steviolbiosídeo foi obtido por hidrólise alcalina do steviosídeo, segundo o método descrito por Wood et al. (1955). O suco digestivo do caramujo *Megalobulimus paranaguensis* foi cedido pelo Dr. José Fontana, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

As enzimas hexoquinase (E.C. 2.7.1.1.), glucose 6-fosfato desidrogenase (E.C. 1.1.1.49) e pectinase (E.C. 3.2.1.15) e as coenzimas 5' -trifosfato (ATP) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP+) utilizadas eram produtos da Sigma Co. Os demais reagentes eram produtos da Merck, da Carlo Erba e da Reagen.

Dosagem de proteína

Determinou-se a concentração de proteína do suco digestivo do *Megalobulimus paranaguensis* de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951), utilizando-se como padrão soro-albumina bovina. A concentração de proteína encontrada no material biológico foi igual a 12,9%

Incubação do suco digestivo do *Megalobulimus paranaguensis* com steviosídeo, steviolbiosídeo e glucosil steviol

O meio de incubação continha tampão fosfato 0,1 M (pH 5,7) e steviosídeo 1 mM, steviolbiosídeo 1 mM ou glucosil steviol 1 mM, conforme o caso. Ao meio foram adicionados 0,5 mg/ml de suco digestivo do *Megalobulimus paranaguensis*, e a mistura foi incubada em câmara ambiental a 30°C, sob agitação constante. Em intervalos de tempo pré-determinados, foram retiradas alíquotas para análise.

Adição de pectinase ao meio de incubação

No caso das incubações com steviosídeo e steviolbiosídeo, a pectinase foi adicionada em geral 30 horas após a adição do suco digestivo. Em torno de 2,8 unidades/ml foram adicionadas. Para a incubação com glucosil steviol, 1,4 unidades/ml foram adicionadas 6 horas após a adição do suco digestivo.

Determinação da concentração de glucose

Alíquotas obtidas do meio de incubação tiveram o nível de glucose determinado por métodos espectrofotométricos. Glucose livre foi dosada pelo método de Dubowski (1962). O meio de reação continha: 0,5 ml de amostra e 1,0 ml de o-toluidina 6% em ácido acético glacial. Após fervura por 10 minutos, determinou-se a concentração de glucose a 625 nm, comparando-se com padrão apropriado.

Açúcares totais (no caso, glucose total) foram dosados pelo método do fenol sulfúrico (1956). O meio continha: 0,1 ml de amostra, 0,9 ml de tampão

FIGURA 01

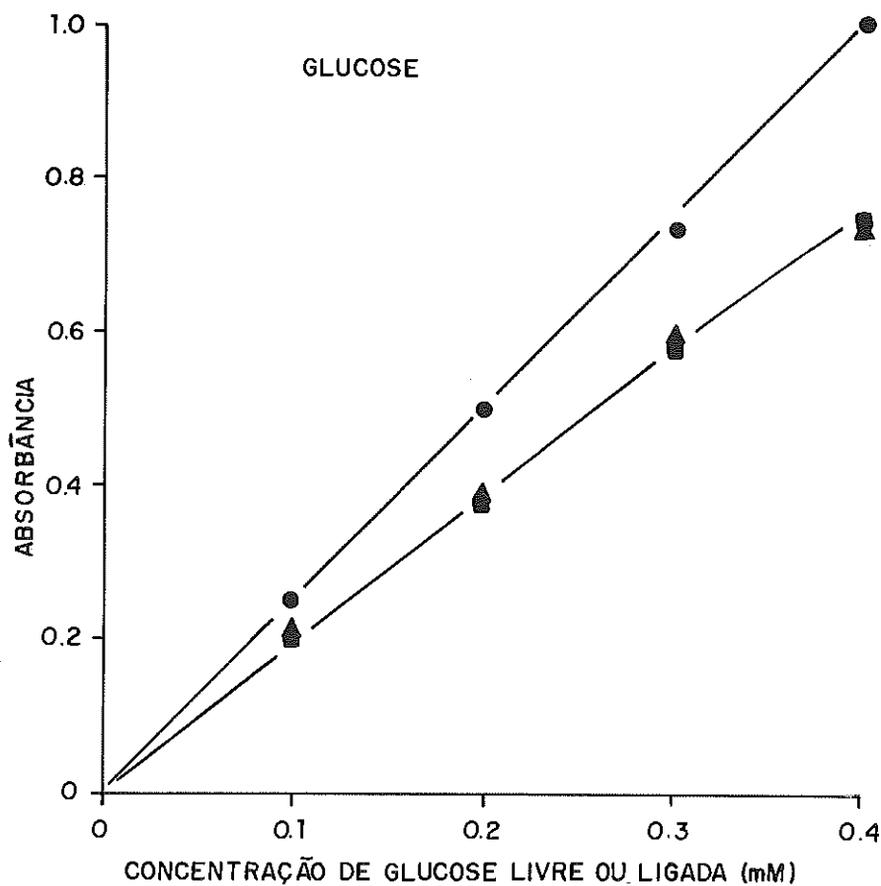


Figura 1. Curvas de calibração da glucose, do steviosídeo e do steviolbiosídeo com o método do fenol sulfúrico. Detalhes do procedimento experimental estão descritos em "Materiais e Métodos". A absorbância medida está representada em todos os casos contra a concentração final de glucose livre ou ligada ao steviosídeo ou ao steviolbiosídeo. Glucose livre: ●; steviosídeo: ■; steviolbiosídeo: ▲.

fosfato 0,1 M (pH 5,7), 0,5 ml de fenol 5% e 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. As leituras foram efetuadas a 490 nm e comparadas com padrão adequado. Para as dosagens de glucose efetuadas após a adição de pectinase, as alíquotas foram diluídas 100 vezes (0,01 ml da amostra e 0,99 ml de tampão fosfato).

A concentração de glucose livre foi determinada também por método enzimático, medindo-se a redução do NADP⁺ a NADPH a 340 nm (Bergmeyer *et al.*, 1974). A amostra foi inicialmente desproteinizada com ácido perclórico 0,6 N, com posterior centrifugação. Ao sobrenadante adicionaram-se 2 volumes de tampão trietanolamina 0,5 M (pH 7,5) que continha: MgSO₄ 1 mM, ATP 1 mM, NADP⁺ 0,4 mM, hexoquinase (1,44 unidades por ml) e glucose 6-fosfato desidrogenase (1,3 unidades/ml). Após duas horas de reação (à temperatura ambiente) foi efetuada a leitura em espectrofotômetro, contra um branco que continha tampão trietanolamina. O coeficiente de extinção (ϵ) para o NADPH a 340 nm é $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A concentração de glucose (C) foi calculada segundo a fórmula $C = A/\epsilon \cdot l$, onde A é a absorvância, e l o caminho ótico.

Análises cromatográficas

Alíquotas obtidas durante os períodos de incubação foram aplicadas em placas de sílica-gel ativadas (Merck). Estas alíquotas eram submetidas inicialmente a um processo de concentração por redução do volume (em torno de cinco vezes) através de aquecimento. As alíquotas obtidas após a adição da pectinase passavam por processo de extração etérea e de redução a vácuo do volume (em torno de dez vezes), para serem aplicadas em quantidades de 50 μl . Comparam-se os resultados com os padrões de steviosídeo, steviol e steviolbiosídeo. O solvente utilizado foi a mistura isobutanol:metanol:água (8:1:1). Após a corrida em cuba cromatográfica saturada com a fase móvel, a placa foi secada à temperatura ambiente e revelada com solução de ácido sulfúrico a 5% em metanol; finalmente, foi aquecida em estufa a 100°C, até o aparecimento de manchas de coloração negra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O acompanhamento da glucose total (livre ou ligada) no meio de incubação

A liberação de glucose é a indicação mais evidente de uma ação enzimática sobre o steviosídeo ou steviolbiosídeo. O acompanhamento desta ação pode ser feito por qualquer dos vários métodos de dosagem de glucose livre (ver item seguinte). Não menos interessante, porém, é a dosagem dos resíduos de glucose que ainda permanecem ligados às estruturas originais. Não há nenhum método que dose apenas resíduos ligados. Há, porém, métodos que dosam indistintamente resíduos ligados e livres. Um destes métodos é o do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).

A figura 1 mostra curvas de calibração obtidas com o método do fenol-sulfúrico. Na confecção das curvas foram utilizados glucose livre, steviosídeo e steviolbiosídeo. Em todos os casos, a absorvância medida a 490 nm foi representada contra a concentração final de glucose, não importando se livre ou ligada ao steviosídeo ou ao steviolbiosídeo. Como se nota, a glucose ligada ao steviosídeo ou ao steviolbiosídeo produz cor menos intensa que a glucose livre. Também a linearidade

parece ser melhor com a glicose livre do que com a ligada aos glicosídeos. As ligações nas moléculas do steviosídeo e do steviolbiosídeo parecem, pois, afetar de alguma maneira o pleno desenvolvimento da cor.

A conseqüência desta observação é a impossibilidade de se acompanhar quantitativamente com precisão a variação da concentração total de glicose (livre + ligada) do meio de incubação. Isto ocorre porque, caso haja liberação de glicose, dever-se-á esperar também uma variação na absorbância, já que a glicose liberada absorverá mais intensamente. Como se percebe também facilmente, numa mistura desconhecida de glicose livre e ligada, a possibilidade de se ter uma curva de calibração adequada inexistente. Por isto, os dados obtidos neste trabalho sobre a concentração total de glicose no meio de reação devem ser encarados muito mais pelo seu aspecto qualitativo.

A liberação de glicose do steviosídeo pelo suco digestivo do *Megalobulimus paranauguensis*

A figura 2 mostra resultados da ação do suco digestivo do *Megalobulimus paranauguensis* sobre o steviosídeo, principal princípio adoçante da *Stevia rebaudiana*. Está representada a quantidade de glicose liberada, avaliada através de dois métodos: o método da o-toluidina (Dubowski, 1962) e um método enzimático (Bergmeyer *et al.*, 1974). Na figura 2, a quantidade de glicose liberada está expressa como percentagem da quantidade total de glicose ligada presente no meio de incubação antes da adição do suco digestivo.

Verifica-se que até 5 horas após a adição do suco digestivo houve um aumento progressivo na concentração de glicose livre, como resultado da degradação do steviosídeo. Deve-se salientar, desde já, que ambos os métodos de dosagem revelaram praticamente a mesma quantidade de glicose liberada. A diferença é bem pequena e pode ser atribuída a erro experimental. Assim sendo, qualquer um dos métodos poderá ser utilizado para o acompanhamento da liberação de glicose. Deve-se salientar, ainda, que a alta especificidade do método enzimático é uma indicação segura de que o açúcar liberado é realmente glicose, e não outra hexose qualquer. Este detalhe é importante, já que o método de o-toluidina dosa indistintamente qualquer nexose, principalmente aldo-hexoses (Dubowski, 1962).

É bem evidente que, após curta fase estacionária, a concentração de glicose no meio de incubação passa a cair novamente. Na experiência da figura 2, após 25 horas de incubação, apenas uma percentagem mínima (aproximadamente 3,0%) de glicose livre ainda permanece. Esta observação é plenamente reprodutível, tendo ocorrido em todas as incubações realizadas neste trabalho. A sua interpretação é difícil, podendo dever-se tanto a uma ação bacteriana como a uma ação enzimática, já que o suco digestivo é uma mistura complexa que encerra grande número de enzimas.

A queda posterior da concentração de glicose torna difícil o estabelecimento de uma relação estequiométrica. É verdade que a degradação da glicose liberada parece ser um fenômeno inicialmente bem mais lento do que o processo de liberação. Se realmente nas primeiras horas da incubação a liberação for bem mais

FIGURA 02

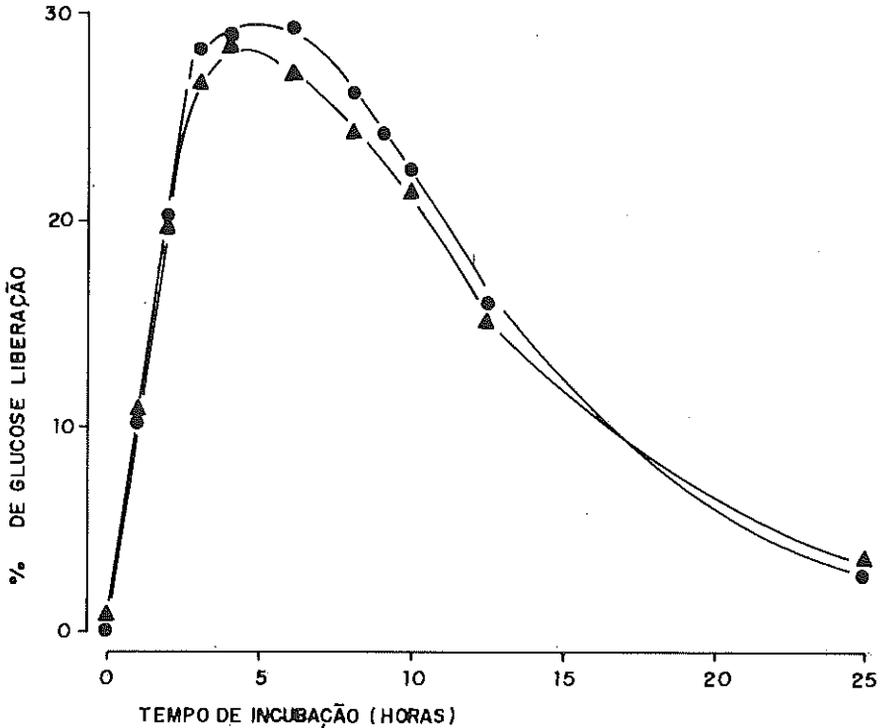


Figura 2. Ação do suco digestivo sobre o steviosídeo: comparação dos métodos de detecção de glicose livre. O meio de incubação continha (0,5 mg/ml) do suco digestivo, steviosídeo 1 mM e tampão fosfato 0,1 M (pH 5,7). A liberação de glicose foi acompanhada colorimetricamente pelo método da o-toluidina (●) ou através de dosagem com hexoquinase mais glicose 6-fosfato desidrogenase (▲). A quantidade de glicose liberada está expressa como porcentagem de glicose ligada presente no meio de incubação antes da adição do suco digestivo. Maiores detalhes experimentais podem ser obtidos em "Materiais e Métodos"

rápida do que a degradação, os dados da figura 2 podem ser interpretados no sentido de que o suco digestivo não é capaz de liberar todas as moléculas de glucose do steviosídeo. Os dados indicariam que apenas um mol de glucose por mol de steviosídeo é liberado, o que perfariam 33% da glucose total inicialmente existente no meio de incubação. Como se vê na figura 2, o valor máximo medido aproxima-se da marca de 30%.

Ação do suco digestivo do *Megalobulimus paranaguensis* e da pectinase sobre o steviosídeo

A experiência da figura 3 foi planejada com a finalidade de se obterem maiores informações sobre o mecanismo de ação do suco digestivo do *Megalobulimus paranaguensis*. Ao contrário do que foi mostrado na figura 2, na experiência ora em discussão acompanhou-se não apenas a concentração de glucose livre, mas também a concentração de glucose total. A glucose livre foi dosada pelo método da orto-toluidina, já que este propicia resultados praticamente idênticos aos obtidos praticamente idênticos aos obtidos com o método enzimático, sendo, além do mais, experimentalmente mais simples. A glucose total foi dosada pelo método do fenol sulfúrico, já discutido.

A experiência representada na figura 3B, na sua primeira fase, que vai da adição de suco digestivo à adição de pectinase, revela o perfil já mostrado na figura 2: após a liberação de certa quantidade de glucose (32% da quantidade total presente), há novamente um declínio. Após 30 horas, não há mais glucose livre no meio de incubação. A adição de pectinase, no entanto, provoca nova liberação de glucose, a qual é também, a seguir, degradada. A pectinase, como é sabido (Mossig e Nes, 1955), hidrolisa completamente o steviosídeo, e o fato de sua adição causar o aparecimento de mais glucose livre só pode significar que, mesmo após 30 horas de incubação, o suco digestivo do *Megalobulimus paranaguensis* não havia hidrolisado completamente o steviosídeo.

Esta conclusão é corroborada pelos resultados expostos na figura 3A. Ali estão representados os resultados das medidas de glucose total pelo método do fenol-sulfúrico. Nota-se que a absorvância aumenta logo após a adição do suco digestivo. Isto era esperado, em virtude das curvas de calibração representadas na figura 1, as quais mostram que a glucose livre dá cor mais intensa do que a glucose ligada ao steviosídeo. Também de acordo com as medidas de glucose livre, há uma queda na absorvância após 4-5 horas de incubação, o que é evidentemente resultado da degradação da glucose liberada. A queda tende nitidamente a um valor-limite.

É difícil, no entanto, avaliar com precisão a quantidade de glucose ainda ligada, já que não se dispõe de uma curva de calibração que permita essa avaliação. No entanto, os dados disponíveis parecem indicar que a quantidade de glucose ainda ligada ao steviol após 30 horas de incubação situa-se entre 60-70% da quantidade total originalmente presente. Este valor foi obtido regularmente num total de 7 experiências. Isto reforça a conclusão do item 2, isto é, de que o suco digestivo tem capacidade para liberar um mol de glucose por mol de steviosídeo, ou seja, 33% da glucose total.

FIGURA 03

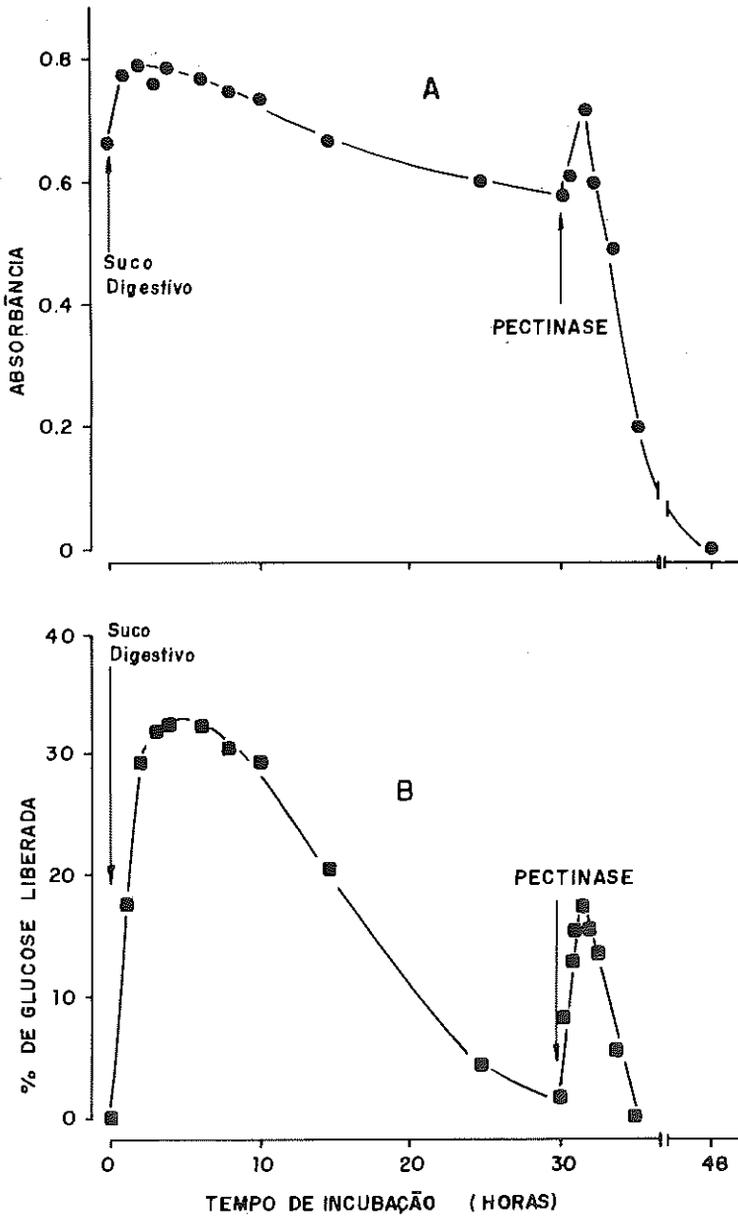


Figura 3. Ação do suco digestivo e da pectinase sobre o steviosídeo. O meio de incubação continha 0,5 mg/ml de suco digestivo, steviosídeo 1 mM e tampão fosfato 0,1 M (pH 5,7). A liberação de glucose foi seguida pelo método da o-toluidina (B), enquanto que a glucose total foi dosada com o método do fenol sulfúrico (A). A adição de suco digestivo e pectinase está indicada pelas setas.

Deve-se comentar ainda, com relação aos dados mostrados na figura 3A, que a intensidade de cor com o fenol-sulfúrico aumenta após a adição de pectinase. Deve-se salientar que a amostra de pectinase contém grande quantidade de substâncias que reagem com o fenol-sulfúrico, a tal ponto que as amostras tiveram que ser diluídas aproximadamente 10 vezes mais que as amostras anteriores. Isto faz com que as medidas sejam bem imprecisas, tornando proibitiva qualquer conclusão mais arrojada. De qualquer forma, é evidente que os açúcares totais tendem a zero 18 horas após a adição de pectinase. Isto demonstra que o sistema de degradação de glucose (bacteriana ou não) continua ativo.

Ação do suco digestivo e da pectinase sobre o steviolbiosídeo

Como pode ser verificado na figura 9, o steviolbiosídeo não apresenta a ligação éster entre a glucose e a carboxila do steviol. Se fosse esta a ligação afetada pelo suco digestivo do *M. paraguayensis*, não deveria haver liberação de glucose a partir do steviolbiosídeo. A figura 4 mostra resultados típicos obtidos quando se incubou steviolbiosídeo, primeiramente com suco digestivo e depois com pectinase. A figura 4B mostra a liberação de glucose, avaliada com o método da o-toluidina. Os resultados são semelhantes aos obtidos com steviosídeo: inicialmente observa-se um aumento da concentração de glucose livre, seguido de uma queda até valores em torno de zero. A diferença reside na percentagem máxima de glucose livre que aparece, a qual se aproxima de 40%, valor nunca atingido com steviosídeo. A adição de pectinase provoca nova liberação de glucose, a exemplo do que sucede com o steviosídeo.

A análise da glucose total com o método do fenol-sulfúrico está mostrada na figura 4A. Os resultados são semelhantes aos obtidos com o steviosídeo. À medida que a glucose é liberada, há um aumento na absorbância. Quando a glucose livre desaparece, a absorbância decresce, atingindo um valor-limite. No caso do steviolbiosídeo, este valor-limite situa-se entre 45 e 55% do total da glucose inicialmente presente. Este valor, sujeito às imponderabilidades discutidas anteriormente, difere daquele observado com steviosídeo. Os valores medidos após a adição de pectinase apresentam o mesmo quadro já discutido em relação ao steviosídeo.

Fica, pois, evidente que o suco digestivo age também sobre o steviolbiosídeo. É, por isto mesmo, improvável que esta preparação enzimática hidrolise a ligação éster do steviosídeo. Isto ocorre porque, ao que tudo indica, de ambos os compostos, o suco digestivo do *M. paraguayensis* hidrolisa preferencialmente uma das ligações, qual seja, a ligação $\beta(1\rightarrow2)$ do radical soforosil. Se assim não fosse, difícil se tornaria explicar os resíduos de glucose que ainda permanecem ligados ao steviolbiosídeo após 30 horas de incubação com o suco digestivo (fig. 4A), os quais são liberados apenas após a adição de pectinase.

Experimentos com o composto isolado do meio de incubação do suco digestivo com o steviolbiosídeo

O produto da hidrólise do steviolbiosídeo com o suco digestivo do *M. paraguayensis* foi extraído com éter. Após precipitação e redissolução, procedeu-

FIGURA 04

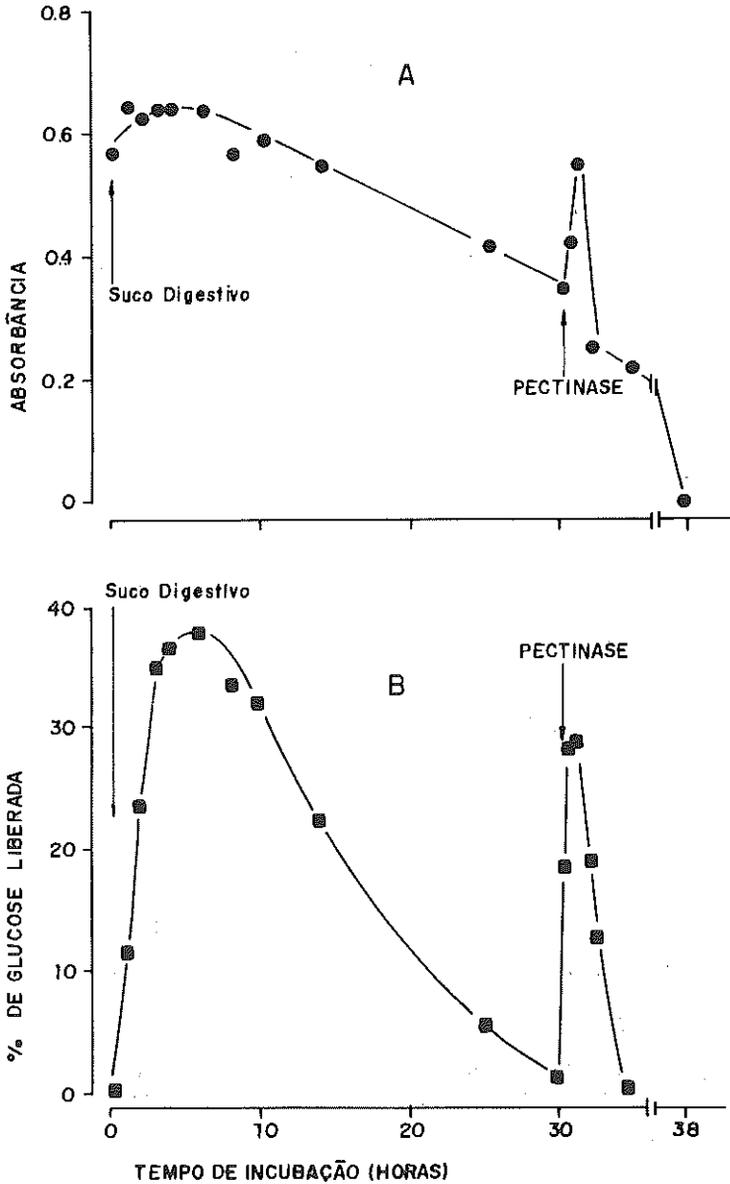


Figura 4. Ação do suco digestivo e da pectinase sobre o steviolbiosídeo. O meio de incubação continha 0,5 mg/ml de suco digestivo, steviolbiosídeo 1 mM e tampão fosfato 0,1 M (pH 5,7). A liberação de glucose foi seguida pelo método da o-toluidina (B), enquanto que a glucose total foi dosada com o método do fenol-sulfúrico (A). A adição de suco digestivo e pectinase está indicada pelas setas.

FIGURA 05

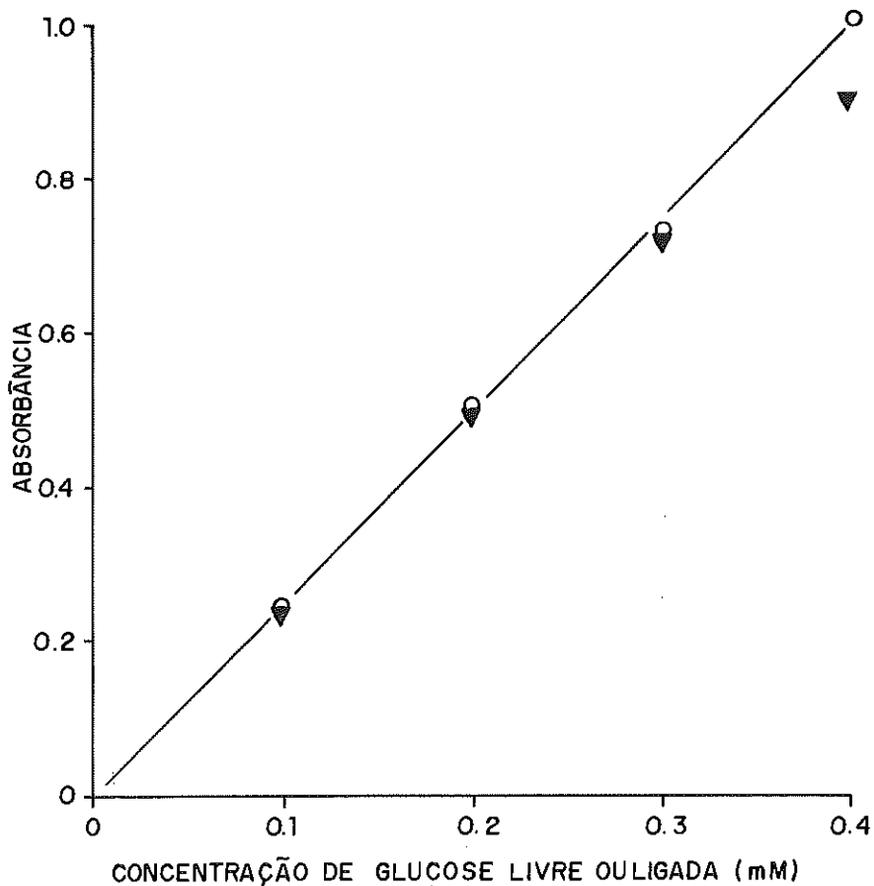


Figura 5. Curva de calibração da glucose e do composto isolado do meio de incubação com steviolbiosídeo com o método do fenol-sulfúrico. A absorbância medida está representada contra a concentração de glucose livre ou ligada. No caso da glucose ligada, tomou-se como base um peso molecular de 480. Glucose livre: ●; glucose ligada (glucosil steviol): ▼.

se a uma hidrólise com HCl a 5% e a 100°C. A hidrólise produziu 1 mol de glucose por 480 gramas, conforme evidenciado pelas medidas de glucose liberada com o método da o-toluidina. O composto possui propriedades ácido-básicas semelhantes às do steviolbiosídeo (é solúvel em meio alcalino), o que evidencia a presença de uma carboxila livre. O peso molecular de 480 corresponde ao de um glicosídeo formado por steviol mais uma molécula de glucose (fig. 9), o 13-O/ β -glucopiranosil steviol (glucosil steviol). A figura 5 mostra uma curva de calibração com o método do fenol sulfúrico. Nesta curva, a intensidade de cor de soluções de glucose é comparada com a intensidade de cor de soluções do composto isolado do meio de incubação do suco digestivo com steviolbiosídeo. A absorvância foi representada contra a concentração final de glucose. No caso do composto isolado, tomou-se como base de cálculo um peso molecular de 480. Observa-se que há coincidência quase total entre ambas as curvas. Estas observações corroboram a suposição de que o suco digestivo do *M. paraguayensis* produz o 13-O/ β -glucopiranosil steviol a partir do steviolbiosídeo.

A hipótese acima pressupõe uma ação muito fraca do suco digestivo sobre o glucosil steviol. A fim de testar a hipótese, fez-se uma incubação do composto isolado com o suco digestivo, essencialmente como havia sido feito com o steviosídeo e o steviolbiosídeo, medindo-se a glucose liberada pelo método da o-toluidina. Os resultados podem ser vistos na figura 6. Como se observa, a liberação de glucose nas primeiras 6 horas é pequena, correspondendo a 8-9% da quantidade total presente no meio de incubação. Deve-se lembrar que, nestas primeiras 6 horas, a glucose liberada nas incubações com steviosídeo e steviolbiosídeo já atingiu seu valor máximo. Na experiência da figura 6, adicionou-se pectinase ao meio de incubação depois de 6 horas de incubação. Como se vê, uma grande quantidade de glucose é liberada rapidamente, o que evidencia elevado percentual ainda ligado. Parece, pois, que o suco digestivo do *M. paraguayensis* tem atuação muito limitada sobre a ligação remanescente. Esta, muito provavelmente, é a ligação glicosídica entre o steviol e a glucose (fig. 9).

Análises cromatográficas dos produtos de hidrólise do steviosídeo e do steviolbiosídeo

Os resultados descritos até o presente momento baseiam-se única e exclusivamente em medidas de glucose liberada ou total. Embora os dados obtidos permitam tirar conclusões, é necessário que elas tenham apoio em algum outro tipo de medida. Pode-se fazer uma análise cromatográfica dos glicosídeos, tanto os originalmente incubados como os novos porventura formados. Para tanto, empregou-se a cromatografia de adsorção. Placas de sílica-gel foram utilizadas, conforme foi descrito em "Materiais e Métodos".

A figura 7 mostra os resultados típicos obtidos quando se cromatografaram alíquotas retiradas do meio de incubação de uma experiência semelhante à mostrada na figura 3. Ao lado de padrões, foram aplicadas amostras retiradas após 6 e 30 horas de incubação com o suco digestivo, amostras retiradas após 1 e 5 horas de ação da pectinase e também o composto isolado do meio de incubação do ste-

FIGURA 06

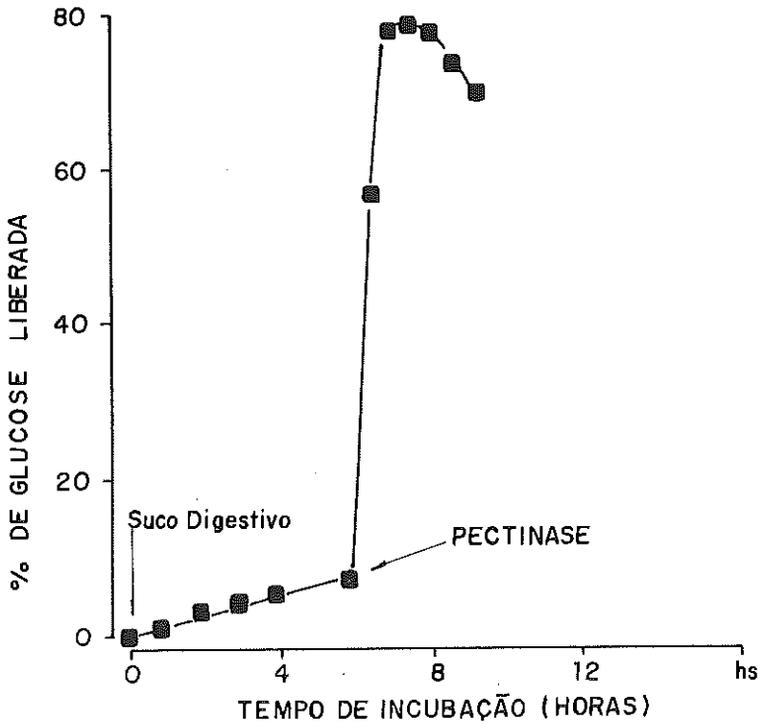


Figura 6. Ação do suco digestivo e da pectinase sobre o composto isolado do meio de incubação com steviolbiosídeo (glucosil steviol). A incubação continha 0,6 mg/ml de suco digestivo, glucosil steviol 1 mM e tampão fosfato 0,1 M (pH 5,7). A liberação de glicose foi seguida pelo método colorimétrico da o-toluidina. A adição de suco digestivo e pectinase está indicada pelas setas.

FIGURA 07

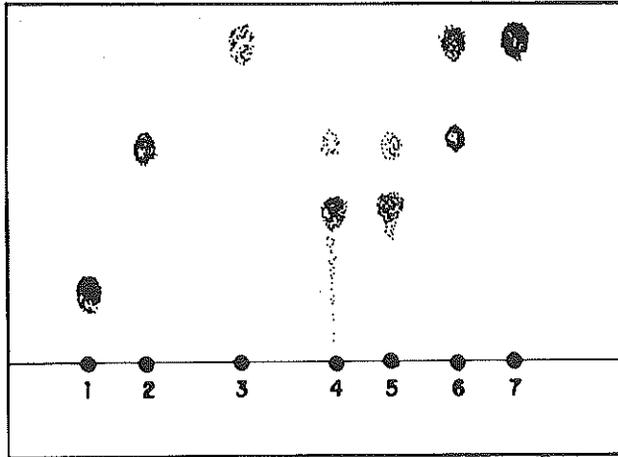


Figura 7. Cromatografia em camada delgada de alíquotas retiradas do meio de incubação do steviosídeo com suco digestivo e pectinase. Os padrões utilizados foram steviosídeo (1), glucosil steviol (produto isolado do meio de incubação do steviolbiosídeo) (2) e steviol (3). Foram cromatografadas alíquotas retiradas após 6 e 30 horas de incubação com o suco digestivo (4 e 5, respectivamente). Extratos etéreos foram obtidos após 1 e 5 horas de ação da pectinase e também cromatografados (6 e 7, respectivamente). O solvente utilizado foi isobutanol: metanol: água (8:1:1). Após a corrida, o cromatograma foi revelado com ácido sulfúrico metanólico a 5 %.

FIGURA 08

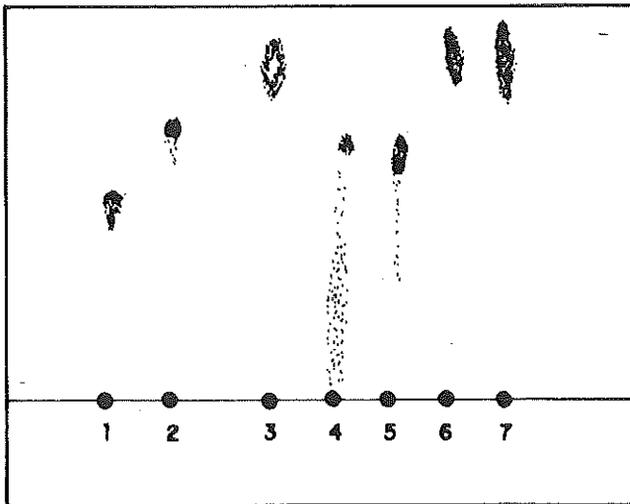


Figura 8. Cromatografia em camada delgada de alíquotas retiradas do meio de incubação do steviolbiosídeo com suco digestivo e pectinase. Os padrões utilizados foram steviolbiosídeo (1), glucosil steviol (2) e steviol (3). Foram cromatografadas alíquotas retiradas após 6 e 30 horas de incubação com o suco digestivo (4 e 5, respectivamente). Extratos etéreos obtidos após 1 e 5 horas de ação da pectinase também foram cromatografados (6 e 7, respectivamente). O solvente utilizado foi isobutanol: metanol: água (8:1:1). Após a corrida, o cromatograma foi revelado com ácido sulfúrico metanólico a 5 %.

violbiosídeo com o suco digestivo (glucosil steviol). Pode-se verificar que, após 6 horas de ação do suco digestivo (amostra 4), já não há mais steviosídeo no meio de incubação. Este tempo é, mais ou menos, igual ao tempo no qual se observou máxima concentração de glucose livre. O cromatograma revela duas manchas, uma muito mais intensa do que a outra. Este quadro pouco se altera até 30 horas de incubação (amostra 5), parecendo, pois, que o suco-digestivo já atingiu praticamente o seu limite de ação após 6 horas de incubação. A mancha principal nas amostras 4 e 5 situa-se numa posição intermediária entre o steviosídeo (amostra 1) e o glucosil steviol (amostra 2). A mancha menos intensa, por outro lado, coincide com a do glucosil steviol. Como se vê, o steviol somente aparece em quantidades detectáveis após a adição de pectinase, quando também desaparecem as outras manchas. Estes resultados confirmam a interpretação dada aos resultados obtidos anteriormente, ou seja, que a ação do suco digestivo sobre o steviosídeo é seletiva, atingindo preferencialmente uma das ligações glicosídicas.

A figura 8 mostra os resultados obtidos quando se cromatografaram alíquotas retiradas do meio de incubação da experiência mostrada na figura 4. O procedimento foi semelhante ao descrito em relação ao steviosídeo, ou seja, foram aplicadas amostras retiradas após 6 e 30 horas de incubação com o suco digestivo e amostras retiradas após 1 e 5 horas de ação da pectinase, ao lado de padrões. Pode-se verificar que, após 6 horas de ação do suco digestivo (amostra 4), já não há mais steviolbiosídeo no meio de incubação.

Conforme se observa na figura 4, este tempo (6 horas) também coincide com o tempo no qual se observou máxima concentração de glucose livre. Pelas manchas desenvolvidas com as amostras 4 e 5 pode-se dizer que, na ação sobre o steviolbiosídeo, o suco digestivo praticamente atingiu seu limite de ação após 6 horas de incubação. As amostras 4 e 5 apresentam manchas que se situam em posição próxima ao composto isolado do meio (glucosil steviol — amostra 2), enquanto que as manchas 6 e 7 (que correspondem aos extratos etéreos obtidos após a adição da pectinase) situam-se numa posição idêntica à do steviol (amostra 3).

Os resultados da figura 8 indicam fortemente que o suco digestivo hidrolisa a ligação β (1 \rightarrow 2) preferencialmente, liberando uma molécula de glucose. Se assim não fosse, deveria aparecer steviol. Este composto, no entanto, somente apareceu em quantidades significativas após a adição de pectinase.

DISCUSSÃO FINAL E CONCLUSÕES

Este trabalho descreve alguns resultados obtidos com uma nova preparação enzimática com capacidade de agir cataliticamente sobre produtos naturais da *Stevia rebaudiana*. O suco digestivo do *Megalobulimus paranaguensis* apresenta, em relação às outras preparações enzimáticas já conhecidas — pectinase, hesperidinase e suco digestivo de *Helix pomatia* —, algumas particularidades. A sua ação é seletiva, isto é, esta preparação não ataca indistintamente todas as ligações do

FIGURA 09

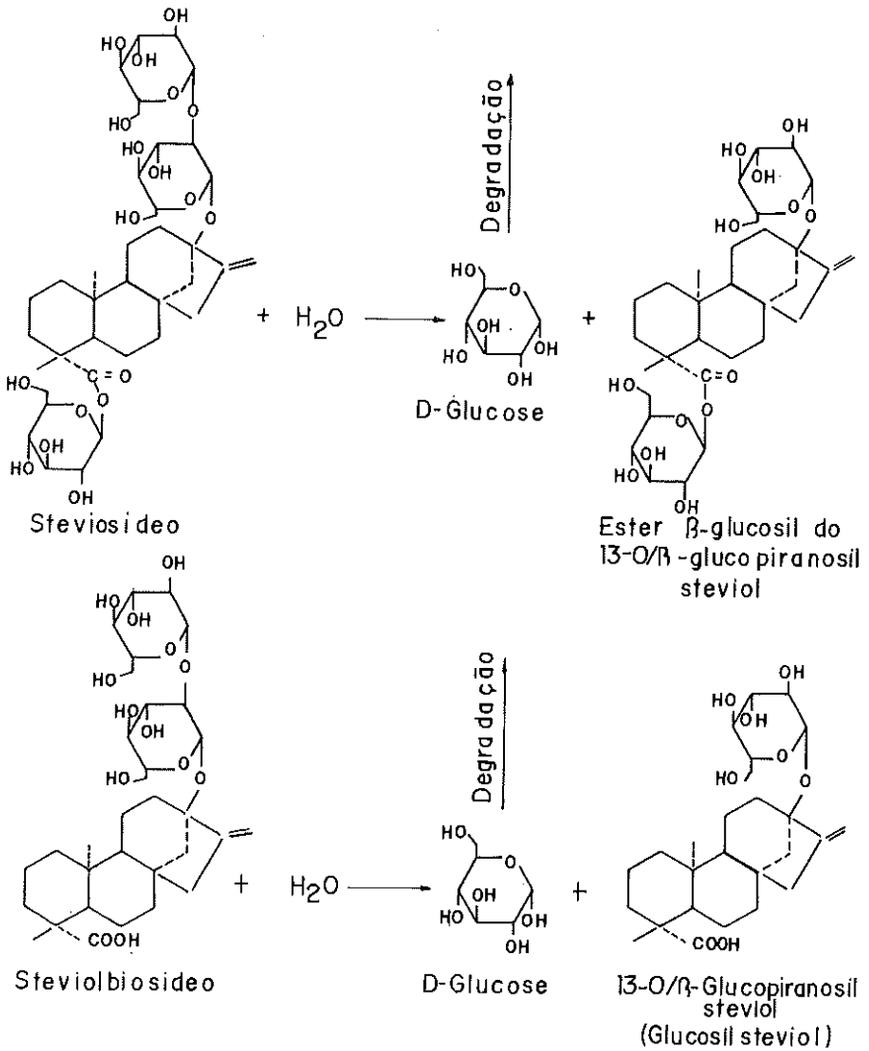


Figura 9. Principal mecanismo de ação do suco digestivo do *Megalobulimus paranaguensis* sobre o steviosídeo e o steviolbiosídeo, com os prováveis principais produtos de hidrólise.

steviosídeo e seus derivados, mas, aparentemente de maneira significativa, apenas uma delas. Neste sentido, este suco digestivo possui ação semelhante à da takadiastase, preparação recentemente descrita e que também age seletivamente sobre o steviosídeo (Tanaka, 1980).

Os dados obtidos indicam que a ligação hidrolisada é a ligação β (1 \rightarrow 2) do radical soforosil. A figura 9 esquematiza esta ação, mostrando os prováveis produtos formados a partir do steviosídeo e do steviolbiosídeo, isto é, o éster β - glucosil do 13-O/ β - glucopiranosil steviol e o 13-O/ β - glucopiranosil steviol, respectivamente. No caso do produto de hidrólise do steviolbiosídeo, o isolamento foi realizado, sendo que as análises realmente confirmam que se trata do 13-O/ β - glucopiranosil steviol (glucosil steviol). Neste sentido, é altamente significativo que o suco digestivo, uma vez incubado com o glucosil steviol, catalisa a hidrólise com velocidade bastante reduzida.

Por outro lado, a ação global do suco digestivo do *M. paranaguensis* é sem dúvida complexa, já que a glucose liberada é posteriormente degradada, fenômeno para o qual não há ainda explicação. Ele pode dever-se tanto à presença de um sistema enzimático com tal capacidade como à ação de bactérias que crescem durante o período de incubação, que é bastante longo. Independentemente de qual seja o mecanismo responsável pela degradação de glucose, pode-se adiantar aqui que não se trata de fermentação L-lática, já que investigações preliminares não revelaram a presença de ácido L-lático no meio de incubação (experiências não mostradas).

O produto da degradação do steviolbiosídeo, glucosil steviol, pode vir a ser útil em estudos bioquímico-farmacológicos, principalmente no que tange ao estabelecimento de relações entre estrutura e ação biológica. Neste sentido, já há alguns dados. Yamamoto et al. (1984) demonstraram que o glucosil steviol inibe a gluconeogênese em túbulos renais de rato. Esta ação é menos potente que aquela do steviol ou do isosteviol, porém bem mais acentuada que a ação do steviosídeo e do steviolbiosídeo, os quais são inócuos. Conclui-se que a remoção de uma molécula de glucose do steviolbiosídeo dá origem a um produto com ação biológica já bem próxima à da aglucona isolada (steviol).

Tem sido descrito também que o glucosil steviol possui atividade hormonal em plantas. Dados de Iwamura e Komai (1981) dão conta de que o glucosil steviol aumenta em até 42,5% o crescimento de plântulas de arroz, quando presente numa concentração de 500 ppm.

BIBLIOGRAFIA

- BERGMAYER, H. V., GAWEHN, K. & GRASSL, M. Enzymes as biochemical reagents. In: Bergmeyer, H. V. (ed.), **Methods of Enzymatic Analysis**, New York, Academic Press, 1974, vol. 3, p.1196-1201.
- BRIDEL, M. & LAVIEILLE, R. Le Principe Sucré du Kaá-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bertoni) II. L'Hydrolyse Diastasique du stevioside. III. Le Stéviol de l'Hydrolyse Diastasique et l'Isosteviol de l'Hydrolyse Acide. **Bull. Chim. Biol.** **13**: 781-796, 1931.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, S. K., REBERS, P. A. & SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry** **28(6)**: 250-256, 1956.
- DUBOWSKI, K. M. An o-toluidine Method for Body Fluid Glucose Determination. **Clinical Chemistry** **8(3)**: 215-235, 1962.
- FONTANA, J. D., FEIJÓ, M. A. C. & DUARTE, J. H. Ação de Algumas Carboidrases do Suco Digestivo de *Megalobulimus paranaguensis*, Piesby & Ihering 1900, Sobre Substratos Definidos. Comunicação à 28ª. Reunião Anual da SBPC, 1976.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Fenol Reagent. **J. Biol. Chem.** **193**: 265-275, 1951.
- IWAMURA, J., & KOMAI, K. Diterpene Glycosides as Plant Growth Regulators. Japan Kokai 83-85, 806 (patente), 1983.
- KOHDA, H., KASAI, R., YAMASAKI, K., MURAKAMI, K. e TANAKA, O. New Sweet Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana*. **Phytochemistry** **15**: 981-983, 1976.
- MOSETTIG, E. & NES, W. R. Stevioside, II. The Structure of the Aglucon. **J. Org. Chem.** **20**:884-899, 1955.
- TANAKA, O. Chemistry of *Stevia rebaudiana* Bertoni, New Source of Natural Sweeteners. **Recent Adv. Nat. Prod. Res.**, p. 111-19, 1979.
- YAMAMOTO, N. S., KELMER BRACHT, A. M., ISHII, E. L., KEMMELMEIER, F. S. ALVAREZ, M. e BRACHT, A. Effect of Steviol and its Structural Analogues on Glucose Production and Oxygen Uptake in Rat Renal Tubules. **Experientia** (no prelo), 1984.

EFEITO DO STEVIOL E DE SEUS ANÁLOGOS ESTRUTURAIS SOBRE A PRODUÇÃO DE GLUCOSE E SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO EM TÚBULOS RENAIIS ISOLADOS

N. S. YAMAMOTO, A. M. KELMER BRACHT,
E. L. ISHII, F. S. KEMMELMEIER, M. ALVAREZ E A. BRACHT
Laboratório de Metabolismo Hepático
Departamento de Farmácia e Bioquímica
Universidade Estadual de Maringá
Caixa Postal 331 - 87100 - Maringá - Paraná

RESUMO

O efeito de diversos produtos naturais* da *Stevia rebaudiana* sobre a produção de glucose (gluconeogênese) e sobre o consumo de oxigênio em túbulos renais isolados de rato foi investigado. O steviol, o isosteviol e o glucosilsteviol inibem a produção de glucose e o consumo de oxigênio. O principal princípio doce da planta, o steviosídeo, bem como o steviolbiosídeo, não têm nenhum efeito sobre a gluconeogênese, assim como também não afetam o consumo de oxigênio.

ABSTRACT

The effect of several natural products of *Stevia rebaudiana* on glucose production and oxygen uptake in rat renal cortical tubules has been investigated. Steviol, isosteviol and glucosylsteviol decreased glucose production and inhibited oxygen uptake. The sweet principle stevioside and steviolbioside, however, were without effect on gluconeogenesis and oxygen uptake.

INTRODUÇÃO

O steviol é a aglucona do steviosídeo (fig. 1), um glicosídeo doce, abundante nas folhas da *Stevia rebaudiana*, arbusto pertencente à família das Compostas (Bridel e Lavieille, 1931). O steviosídeo é 300 vezes mais doce que a sacarose e está agora assumindo grande importância no Japão e no Brasil, principalmente como substituto de adoçantes não-calóricos (von Schmeling, 1967). Extratos aquosos das folhas da *Stevia rebaudiana*, por outro lado, são usados não apenas com finalidades edulcorantes, mas também por causa dos seus efeitos terapêuticos e fisiológicos. Tem sido descrito que os extratos aquosos da planta têm efeito cardiotônico (von Schmeling, 1967), efeito contraceptivo (Planas e Kué,

1968) e propriedades hipoglicemiantes (Miquel, 1966; von Schmeling *et alii*, 1977). Foi demonstrado também que o steviosídeo, o steviol e outros produtos naturais da *Stevia rebaudiana* afetam diversas funções mitocondriais (Kelmer-Bracht, 1982; Vignais *et alii*, 1966). Em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, a fosforilação oxidativa é inibida por um complexo mecanismo de ação que inclui inibição do transporte dos adenina nucleotídeos (ADP e ATP), desacoplamento da respiração, inibição da NADH-oxidase e da L-glutamato desidrogenase, etc. A inibição da fosforilação do ADP em mitocôndrias tem geralmente importantes conseqüências para o organismo íntegro. A questão que surge agora diz respeito à possibilidade de os produtos naturais da *Stevia rebaudiana* afetarem também as funções mitocondriais da célula intata.

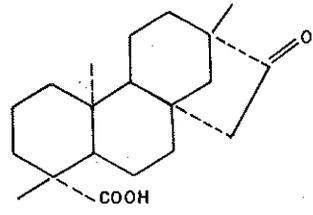
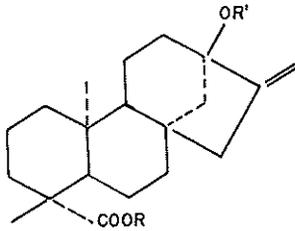
Este artigo apresenta uma contribuição no tocante ao efeito dos produtos naturais da *Stevia rebaudiana* sobre células intatas. Ele descreve o efeito do steviosídeo, do steviol e de outros produtos naturais da *S. rebaudiana* sobre a gluconeogênese, via biossintética estritamente dependente da energia disponível na célula intata. Provavelmente esta seja a primeira comunicação sobre o efeito de produtos da *S. rebaudiana* sobre o metabolismo de células intatas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Túbulos do córtex renal de ratos foram isolados com colagenase (clostridiopeptidase A; EC 3.4.24.3), essencialmente conforme foi descrito por Gordon e Hartog (1972). Ratos albinos machos (Wistar, 180-250 g) foram deixados em jejum por 24 horas antes do isolamento dos túbulos renais. O steviosídeo foi purificado de folhas secas de *Stevia rebaudiana*, conforme foi descrito anteriormente (Alvarez *et alii*, 1981). O steviol foi obtido do steviosídeo por hidrólise enzimática com pectinase (poli [1,4 - α - D-galacturonídeo] - glicano-hidrolase ; EC 3.2.1.15), conforme foi descrito por Mosettig e Nes (1955). O glucosilsteviol, por outro lado, foi obtido por digestão do steviolbiosídeo com o suco gástrico do caramujo marinho *Megalobulimus paranaguensis* (Ferraresi *et alii*, 1983). O isosteviol e o steviolbiosídeo foram preparados a partir do steviosídeo, por hidrólise ácida e por hidrólise básica, respectivamente (Kohda *et alii*, 1976). A glucose foi medida enzimaticamente com hexoquinase (EC 2.7.1.1) e glucose 6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49) (Bergmeyer, 1970). O consumo de oxigênio medido polarograficamente (Voss *et alii*, 1963). A proteína total foi dosada colorimetricamente de acordo com Lowry *et alii* (1951).

RESULTADOS

As fórmulas estruturais dos cinco compostos utilizados neste trabalho são mostradas na figura 1. Como se pode ver, o número de moléculas de glucose ligadas à porção aglucona decresce ao longo da seqüência steviosídeo (3 moléculas de glucose), steviolbiosídeo (2 moléculas de glucose), glucosilsteviol (1 molécula de glucose) e steviol ou isosteviol (sem glucose). Como foi mostrado previamente, a habilidade destes compostos em inibir a fosforilação oxidativa decresce ao



Isosteviol

- Steviol: R = R' = H
 Glucosilsteviol: R = H; R' = glucose
 Steviolbiosídeo: R = H; R' = soforose
 Steviosídeo: R = glucose; R' = soforose

Fórmulas estruturais do steviol, do isosteviol, do glucosilsteviol, do steviolbiosídeo e do steviosídeo.

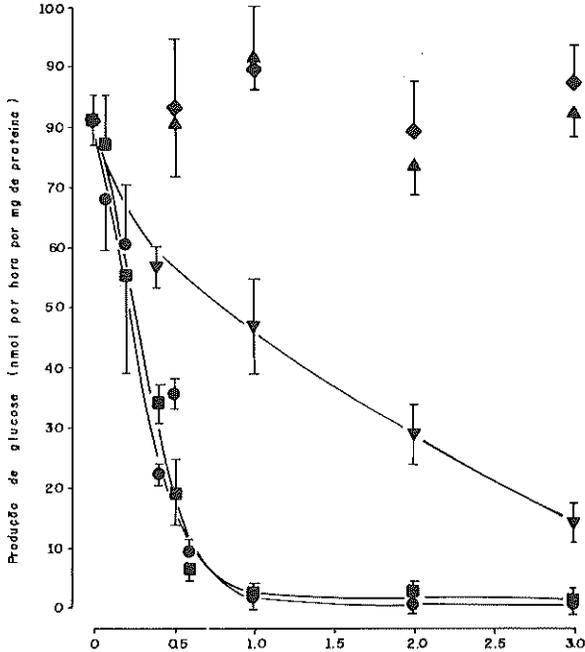


Figura 2 :

Efeito do steviol, do isosteviol, do glucosilsteviol, do steviolbiosídeo e do steviosídeo sobre a produção de glucose em túbulos renais isolados. Túbulos do córtex renal foram isolados de ratos com 24 horas de jejum e incubados (7 a 15 mg proteína por ml) em tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7.4), a 37°C, sob uma atmosfera de oxigênio e dióxido de carbono (95.5%). Após um curto período de pré-incubação (geralmente 5 minutos), foram adicionados os compostos e logo após, L-lactato (10 mM) e piruvato (1 mM). Amostras foram coletadas no tempo zero e após 60 minutos de incubação, desproteinizadas com um volume igual de ácido perclórico (0.5 N) frio, centrifugadas, utilizando-se o sobrenadante para as medidas da glucose produzida. Legenda: isosteviol, ◆◆; steviol, ●●; glucosilsteviol, ■■; steviolbiosídeo, ▼▼; steviosídeo, ▲▲. As barras verticais representam o erro-padrão da média.

longo da mesma série (Vignais *et alii*, 1966; Kelmer-Bracht, 1982).

A figura 2 sumariza os resultados de 38 experiências, nas quais túbulos renais isolados foram incubados em tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7.4), na presença de L-lactato (10 mM) e piruvato (1 mM) e de concentrações variáveis dos compostos mostrados na figura 1. Os resultados obtidos foram representados graficamente contra a concentração de cada composto. O valor-controle médio, para a produção de glucose foi igual a 80 ± 4.3 nmol por hora por mg de proteína. Conforme foi mostrado anteriormente, o teor em glicogênio dos túbulos renais de ratos em jejum é insignificante, sendo as medidas de liberação de glucose uma boa aproximação para a atividade gluconeogénica (Gordon e Hartog, 1972). A figura 2 mostra que o steviol e o isosteviol inibem a produção de glucose. Ocorre 50% de inibição com steviol ou isosteviol 0,3 mM. A uma concentração igual a 1 mM, a inibição é virtualmente completa. Diferenças na estrutura química de ambos os compostos parecem não exercer nenhum papel no efeito inibidor.

Experiências adicionais, nas quais a produção de glucose foi acompanhada durante 90 minutos e medida a intervalos de 15 minutos, revelaram que a inibição é independente do tempo de incubação. A inibição é também independente do precursor gluconeogénico. A gluconeogênese a partir de frutose, glicerol e succinato é igualmente inibida pelo steviol e pelo isosteviol, sendo o grau de inibição comparável ao encontrado quando L-lactato e piruvato foram os precursores gluconeogénicos.

Entre os glicosídeos, o glucosilsteviol também inibe a produção de glucose. Como pode ser verificado na figura 2, 50% de inibição ocorre em concentrações ao redor de 1,2 mM, valor bem maior do que aquele obtido com steviol ou isosteviol. O steviosídeo, bem como o steviolbiosídeo, até uma concentração igual a 3 mM, por outro lado, não afetam significativamente a gluconeogênese.

O consumo de oxigênio foi medido com piruvato 10 mM como substrato exógeno. Uma inibição da respiração foi encontrada com steviol e isosteviol. A concentração que produziu 50% de inibição situava-se em torno de 0,4 mM. Steviosídeo e steviolbiosídeo até uma concentração de 3 mM, por outro lado, não tiveram nenhum efeito sobre o consumo de oxigênio.

DISCUSSÃO

A inibição simultânea da produção de glucose e da respiração pelo steviol, pelo isosteviol e pelo glucosilsteviol é consistente com a ação inibitória destes compostos sobre a fosforilação oxidativa e sobre o transporte de elétrons em mitocôndrias intatas (Kelmer Bracht, 1982; Vignais *et alii*, 1966). Em relação a

isto, estes compostos se comportam como o atractilosídeo, potente inibidor do transporte dos adenina-nucleotídeos e da fosforilação oxidativa em mitocôndrias (Vignais *et alii*, 1966; Liener, 1969). Na célula intata, o atractilosídeo e seus análogos inibem a gluconeogênese e a respiração, efeito observado neste trabalho com o steviol e seus análogos (Stubbs *et alii*, 1978). Deve-se notar que, quimicamente, o steviol e a porção aglucona do atractilosídeo (atractiligenina) diferem apenas em alguns detalhes (Kelmer Bracht, 1982). Isto parece justificar a sua ação similar sobre mitocôndrias e células intatas, embora haja uma diferença básica. Enquanto o atractilosídeo (que é o glicosídeo) é mais ativo do que a atractiligenina (que é a aglucona), o contrário ocorre com o steviosídeo e a sua aglucona. De fato, o steviol (e também o isosteviol) é mais ativo que o steviosídeo e os demais glicosídeos, tanto em mitocôndrias isoladas como em células intatas (Kelmer Bracht, 1982; Vignais *et alii*, 1966). O steviosídeo e o steviolbiosídeo, inclusive, não exercem nenhum efeito sobre o consumo de oxigênio e sobre a gluconeogênese em túbulos renais isolados. Em mitocôndrias isoladas, no entanto, eles são ativos. A fosforilação oxidativa é inibida em 50% por steviosídeo 1 mM e por steviolbiosídeo 0.5 mM. Além do mais, o steviolbiosídeo também inibe a NADH-oxidase, com uma constante de inibição igual a 0.6 mM (Kelmer Bracht, 1982). Estas concentrações estão bem abaixo das maiores usadas neste trabalho (3 mM) e, conseqüentemente, em células intatas, algum efeito seria de se esperar. Pode ser que tanto o steviosídeo como o steviolbiosídeo não permeiem livremente a membrana celular. Esta possibilidade torna-se maior quando se leva em conta que dissacarídeos e glicosídeos em geral — o steviosídeo e o steviolbiosídeo possuem um dissacarídeo em sua estrutura (fig. 1) — freqüentemente são incapazes de permear livremente a membrana celular. A sacarose é o exemplo mais comum (Bracht *et alii*, 1980), mas mesmo o atractilosídeo e o carboxiatractilosídeo, conforme conclusão de Stubbs *et alii* (1978), permeiam a membrana celular com velocidade bem reduzida. Para o momento, no entanto, não há dados acerca do transporte do steviosídeo e compostos afins através da membrana plasmática. Este assunto está, pois, à espera de estudos adicionais.

A principal questão a ser levantada com os resultados descritos neste trabalho diz respeito à ação hipoglicemiante da *Stevia rebaudiana* (Miquel, 1966; von Schmeling, 1977). Em geral, aceita-se que a inibição da gluconeogênese pode levar à hipoglicemia. A fenformina (Gordon e Hartog, 1972), o 3-mercaptopicolinato e outros derivados indólicos e quinolínicos (Snell, 1978) são exemplos de substâncias que inibem a síntese de glucose *in vitro* e que causam hipoglicemia *in vivo*. Sabe-se, também, que o envenenamento por atractilosídeo, cujo mecanismo de ação se assemelha ao do steviol em certos detalhes, pode causar convulsões hipoglicêmicas (Liener, 1969). Em fígado perfundido isoladamente, por outro lado, o steviol (mas não o steviosídeo) também inibe a gluconeogênese e a respiração (Ishii *et alii*, 1984). Esta observação prova que o efeito dos produtos naturais da *Stevia rebaudiana* não é restrito a um único tipo de tecido. É, pois, possível que a inibição da gluconeogênese exerça um papel significativo no mecanismo de ação dos produtos naturais da *Stevia rebaudiana*.

BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ, M., BRACHT, A., ISHII, E. L. Extração do steviosídeo e outros componentes das folhas da *Stevia rebaudiana*. *Arq. Biol. Tecnol.* **24**(1):179, 1981.
- BERGMAYER, H. K. *Methods of Enzymatic Analysis*, New York, Academic Press, 1974.
- BRACHT, A., SCHWAB, A. J. e SCHOLZ, R. Untersuchung von Flussgeschwindigkeiten in der isolierten perfundierten Rattenleber durch Pulsmarkierung mit radioaktiven Substraten. und mathematischer Analyse der Auswaschkinetiken. *Z. Physiol. Chem.* **361**:357-377, 1980.
- BRIDEL, M. e LAVIEILLE, R. Sur le principe sucré des feuilles de kaá-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Compt. Rend. Acad. Sci.* **192**:1123-1125, 1931.
- GORDON, E. E. e HARTOG, M. DE. Gluconeogenesis in renal cortical tubules; effect of phenformin. *Diabetes* **22** (1): 50-57, 1973.
- KELMER BRACHT, A. M. Efeito de produtos naturais da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni sobre mitocôndrias de fígado de rato. Tesè de Mestrado, Curitiba, 1982.
- KOHDA, H., KASAI, R., YAMASAKI, K., MURAKAMI, K. e TANAKA, O. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* **15**: 981-983, 1976.
- LIENER, I. E. *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. New York, Academic Press, 1969.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. e RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275, 1951.
- MIQUEL, O. Un nuevo hipoglicemiente oral (comunicación previa). *Rev. Med. Paraguaya* **7**:200, 1966.

- MOSETTIG, E. e NES, W. R. Stevioside. II. The structure of the aglucon. **J. Org. Chem.** **20**:884-899, 1955.
- PLANAS, G. M. e KUÉ, J. Contraceptive properties of *Stevia rebaudiana* **Science.** **162**:1007, 1968.
- SCHMELING, von G. A. Caá-chê. Edulcorante natural não-calórico. **Bol. San. S. Lucas S. Paulo XCIV(5)**: 67-68, 1967.
- SCHMELING, G. A. Von, CARVALHO, F. N. e de ESPINOZA, A. D. *Stevia rebaudiana* Bertoni. Avaliação do efeito hipoglicemiante em coelhos aloxanizados. **Ciência e Cultura** **22(5)**: 599-601, 1977.
- SNELL, K. Hypoglycaemia caused by indole and quinoline derivatives. **Biochem. Soc. Trans.** **7**:745-749, 1978.
- STUBBS, M., VIGNAIS, P. V. e KREBS, H. A. Is the adenine nucleotide carrier rate-limiting? **Biochem. J.** **172**:333-343, 1978.
- VIGNAIS, P. V., DUEE, E. D., VIGNAIS, P. M. e HUET, J. Effects of atractyligenin and its structural analogues on oxidative phosphorylation and on the translocation of adenine nucleotide in mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta** **118**:465-483 1966.
- VOSS, D. O., COWLES, J. C. e BACILA, M. A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellula and mitochondrial respiration. **Anal. Biochem.** **6**:211-222, 1963.

ESTUDO CINÉTICO DA INIBIÇÃO DA NADH-OXIDASE PELO ISOSTEVIOL E SEUS DERIVADOS

A. M. KELMER BRACHT E A. BRACHT

Laboratório de Metabolismo Hepático

Departamento de Farmácia e Bioquímica

Universidade Estadual de Maringá – Caixa Postal 331 – 87100 – Maringá – PR

RESUMO

Um estudo cinético da inibição da NADH-oxidase pelo isosteviol, pelo steviol, pelo steviolbiosídeo e pelo steviosídeo foi realizado. A inibição causada pelos três primeiros é linear completa. O steviosídeo não inibe a NADH-oxidase até uma concentração igual a 5 mM. A inibição é não-competitiva. A NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento possui dois componentes cinéticos, um de baixo K_M e outro de alto K_M . Ambos os componentes são, no entanto, igualmente afetados pelos produtos naturais da *Stevia rebaudiana*.

ABSTRACT

A kinetic study of the inhibition of NADH-oxidase by isosteviol, steviol, steviolbioside and stevioside was performed. The inhibition caused by steviol, isosteviol and steviolbioside is linear complete and non competitive. Stevioside up to 5 mM is ineffective as an inhibitor. The NADH-oxidase of freeze thawing disrupted mitochondria has two kinetic components, the first one with a low K_M -value and second one with a high K_M -value. Both components are affected to the same extent by *Stevia rebaudiana* natural products.

INTRODUÇÃO

A inibição da NADH-oxidase pelos produtos naturais da *Stevia rebaudiana* foi observada pela primeira vez por Vignais et al. (1966). Esses autores acharam uma inibição sobre esta atividade enzimática por parte do steviol e do seu derivado dihidrosteviol. A inibição da NADH-oxidase é um dos mecanismos pelos quais os produtos naturais da *Stevia rebaudiana* inibem a fosforilação oxidativa, isto é, a síntese de ATP na cadeia respiratória. Na célula intata esta ação tem como consequência uma considerável alteração no potencial redox do sistema $NAD^+ - NADH$, além de inibir a oxidação de diversos metabólitos, como o ácido láctico e o álcool etílico.

Este artigo representa um aprofundamento dos estudos iniciais de Vignais et al. (1966). Ele descreve uma série de experiências sobre a cinética da inibição da NADH-oxidase pelos produtos naturais da *Stevia rebaudiana*. Neste trabalho foram utilizados, além do steviol, os glicosídeos steviolbiosídeo e steviosídeos, bem como a forma alternativa da aglucona, o isosteviol. Como fonte de enzima foram utilizadas mitocôndrias rompidas por congelamento e descongelamento. Espera-se que os resultados tragam alguma contribuição para o esclarecimento do mecanismo de ação dos produtos naturais da *Stevia rebaudiana*. Alternativamente, espera-se também que o trabalho represente alguma contribuição para a caracterização da atividade NADH-oxidase de mitocôndrias de fígado de rato rompidas por congelamento e descongelamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

As mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas de acordo com o método descrito por Voss et al. (1961), usando-se meio de extração que continha manitol (0,2 M), sacarose (0,07 M), TRIS (10 mM) e EDTA (0,2 M). O pH final foi igual a 7,4.

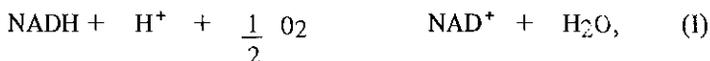
Ratos brancos foram decapitados e seus fígados removidos, lavados em meio de extração a 0-4°C e homogeneizados em homogeneizador de van Potter-Elvehjem. A seguir, a suspensão homogeneizada do tecido foi centrifugada a 3000g por 10 minutos, em centrífuga refrigerada (Janetzki, K 70 D) a 0°C. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado a 10000g por 10 minutos. O novo sobrenadante foi ressuspenso em meio de extração e centrifugado duas vezes a 8000g. As mitocôndrias assim lavadas foram ressuspenso no meio de extração com concentração de 20 a 30 mg de proteína por ml.

Obtenção de mitocôndrias rompidas

Mitocôndrias intatas, obtidas pelo método de Voss et al. (1961), mantidas em meio de extração de sacarose e manitol, foram congeladas a -10°C por mais de 24 horas e posteriormente descongeladas até à temperatura ambiente, e então estocadas para uso a 0°C.

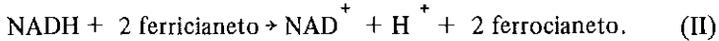
Determinação da NADH-oxidase e da NADH-desidrogenase

A NADH-oxidase,



foi seguida a 340 nm (oxidação do NADH) em meio que continha TRIS 20 mM, pH 7,4, com concentrações de proteína entre 15 e 100 µg por ml. A concentração de NADH foi igual a 0,15 mM (absorbância inicial em torno de 1,0), exceto quando variada sistematicamente.

A NADH-desidrogenase foi medida utilizando-se ferricianeto como acceptor de elétrons (NADH-ferricianeto reductase, EC 1.6.99.3) na presença de antimicina A (10 µg/ml) (Singer, 1974):



A redução do ferricianeto foi acompanhada a 420 nm. O meio de incubação continha ferricianeto 0,5 mM, NADH 0,5 mM, TRIS 20 mM, pH 7,4 e 5 mg/ml de proteína mitocondrial.

Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita utilizando-se o método descrito por Lowry et al. (1951), empregando-se soro-albumina bovina como padrão.

Avaliação gráfica das estimativas preliminares dos parâmetros cinéticos da NADH-oxidase

As estimativas preliminares das constantes cinéticas da NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento foram avaliadas graficamente. Supondo-se que o sistema estudado apresente ao menos dois componentes cinéticos discerníveis, a equação que o descreve será (Plowman, 1972; Cleland, 1967):

$$v = \frac{VA}{K + A} + \frac{V'A}{K' + A} \quad (1)$$

Na equação (1), v é a velocidade de reação e A a concentração de substrato; V e V' são as velocidades máximas do primeiro e do segundo componentes, respectivamente, e K e K' as correspondentes constantes de Michaelis.

Formas alternativas da equação (1) podem ser obtidas. A inversão dos lados leva a:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{\frac{VA}{K + A} + \frac{V'A}{K' + A}} \quad (2)$$

ou seja,

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + (K + K')/A + KK'/A^2}{(V + V') + (VK' + V'K)/A} \quad (3)$$

Uma representação gráfica de $1/v$ versus $1/A$ pode ser vista na figura 1/A (representação gráfica de Lineweaver-Burk) (Plowman, 1972). A linha traçada apresenta uma curvatura próximo ao eixo dos $1/v$. O valor de $1/v$ quando $1/A = 0$, isto é, a intersecção ao eixo dos $1/v$, é igual a $(V + V')^{-1}$. Isto significa que a soma das velocidades máximas pode ser obtida avaliando-se a intersecção ao eixo dos $1/v$ num gráfico do tipo da figura 1A.

Figura 1

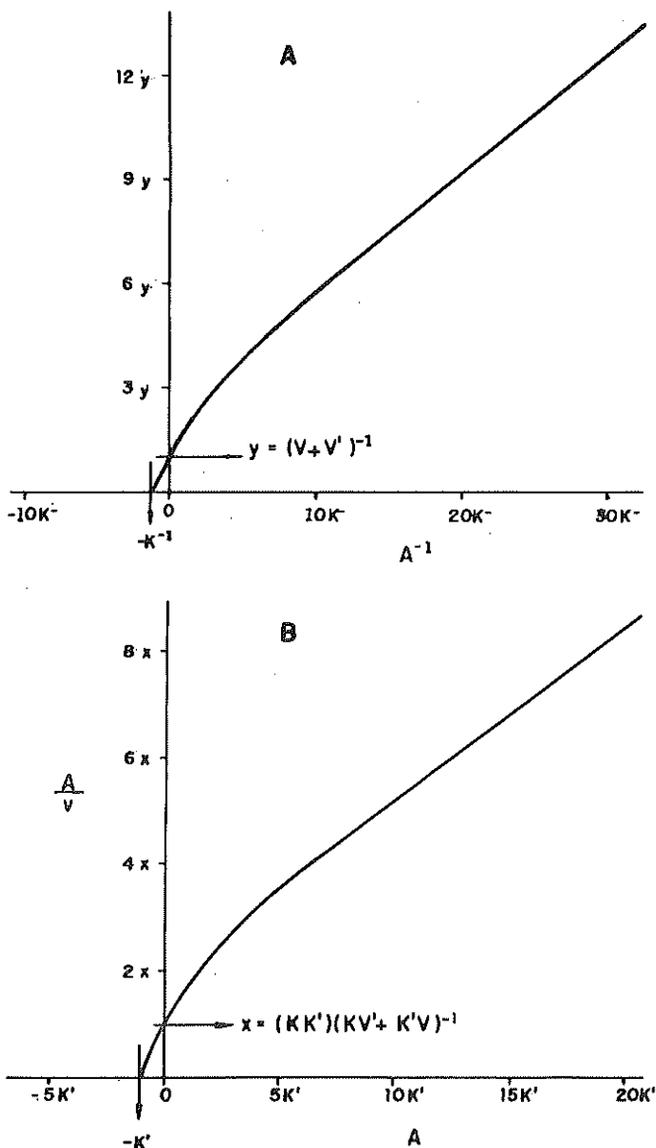


Figura 1. Representação gráfica da equação (1): — A: $1/v$ contra $1/A$; B: A/v contra A —, ilustrando o procedimento gráfico de avaliação das constantes cinéticas K , K' , V e V' . Para maiores detalhes, ver "Materiais e Métodos".

Pode-se demonstrar também que se $K > K'$, a equação (3) reduz-se a:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + K/A}{V + V' + KV'/A} \quad (4)$$

quando $A \gg K'$ (o que ocorrerá próximo ao eixo dos $1/v$). Da equação (4) decorre que, quando $1/v = 0$, $1/A$ será igual a $-1/K$, isto é, o valor de K pode ser obtido extrapolando-se a curva até o eixo dos $1/A$ na figura 1A.

Para a determinação dos valores de V , V' e K' , necessita-se de outra representação gráfica. A divisão da equação (1) por A , seguida de inversão, resulta em:

$$\frac{A}{v} = \frac{1}{\frac{V}{K+A} + \frac{V'}{K'+A}} \quad (5)$$

Uma representação gráfica da equação (5) encontra-se na figura 1B (representação de Hanes). Na equação (5) pode-se verificar que o valor limite de A/v , quando A tende a zero, é igual a $KK'/(KV' + K'V)$, isto é, a intersecção ao eixo dos A/v é complexa função das constantes cinéticas.

Como $K > K'$, a equação (5) reduz-se a:

$$\frac{A}{v} = \frac{KK' + KA}{V'K + K'V + VA} \quad (6)$$

quando $A \gg K$ (isto é, quando $V/K + A \cong V/K$).

Para $A/v = 0$ tem-se então $A = -K'$, quer dizer, a intersecção ao eixo dos A na figura 1B fornece o valor de K' .

V e V' podem ser avaliados medindo-se as intersecções ao eixo dos $1/v$ (fig. 1A) e ao eixo dos A/v (figura 1B) e utilizando-se os valores de K e K' . Se y é a intersecção ao eixo dos $1/v$ e x a intersecção ao eixo dos A/v (fig. 1), teremos:

$$V = \frac{KK' - K(x/y)}{x(K' - K)} \quad (7)$$

e

$$V' = y^{-1} - V. \quad (8)$$

Tratamento estatístico dos dados

O ajuste fino das estimativas preliminares obtidas como está descrito no item anterior foi feito por processo iterativo de ajuste não-linear, essencialmente conforme foi descrito por Cleland (1967).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dependência da concentração dos inibidores

A figura 2 mostra o resultado de experiências, nas quais a velocidade inicial da oxidação do NADH foi medida em função da concentração de isosteviol, steviol, steviolbiosídeo e steviosídeo. Na figura 2A, as velocidades de reação — expressas como percentagem do controle — estão representadas contra a concentração dos inibidores, enquanto que na figura 2B, o inverso das velocidades de reação está representado em função também da concentração dos inibidores. A figura 2A mostra as diferentes sensibilidades da NADH-oxidase aos três compostos. O steviosídeo é inofensivo. O isosteviol é mais potente que o steviolbiosídeo e o steviol, sendo que 50% de inibição já ocorre entre 0,1 e 0,15 mM. Com o steviolbiosídeo e o steviol, uma inibição correspondente só ocorre em concentrações entre 0,6 e 0,7 mM.

Maiores informações fornece a figura 2B. Como se pode verificar, o inverso da velocidade de reação varia linearmente com a concentração dos inibidores. Os dados experimentais descrevem retas quase que perfeitas. Há de se mencionar que o grau de inibição, com isosteviol 1 mM, é de mais de 90%. O fato de a linearidade manter-se até um grau de inibição tão elevado é altamente significativo. Deve-se levar em conta também a heterogeneidade do material — mitocôndrias rompidas por congelamento — e a complexidade do sistema enzimático: trata-se praticamente de toda a cadeia respiratória. A dependência do inverso da velocidade de reação ($1/v$) da concentração dos inibidores ($[I]$) pode, pois, ser descrita pela relação:

$$1/v = C_1 [I] + C_2 \quad (9)$$

Na equação (9), C_1 e C_2 são constantes, funções da concentração dos substratos — NADH e oxigênio, no caso da NADH-oxidase —, das diferentes constantes cinéticas — constante de Michaelis e velocidade máxima — e das constantes de inibição (Plowman, 1972). O ajuste de mínimos quadrados da equação (9) aos dados revelou coeficientes de correlação iguais a 0,99 para ambas as curvas; já o erro-padrão da estimativa (σ), foi igual a $\pm 0,0033$ para a curva correspondente ao isosteviol e igual a $\pm 0,0038$ para a curva do steviolbiosídeo.

Uma inibição linear como a da figura 2B indica sempre que o inibidor possui apenas um sítio de ação (Plowman, 1972; Cleland, 1970). Se o isosteviol e derivados tivessem dois pontos de ação ao longo do caminho NADH-desidrogenase \rightarrow coenzima Q \rightarrow citocromo c-oxidase, a inibição não seria linear e sim parabólica, isto é, a representação de $1/v$ contra $[I]$ resultaria numa parábola.

Um teste adicional foi feito medindo-se a velocidade da reação da NADH-desidrogenase, com ferricianeto como aceptor de elétrons. Nenhum dos quatro compostos testados exerceu qualquer efeito sobre a NADH-desidrogenase. Portanto, o sítio de ação do isosteviol e seus derivados deve estar situado além do sítio ativo da enzima.

Figura 2

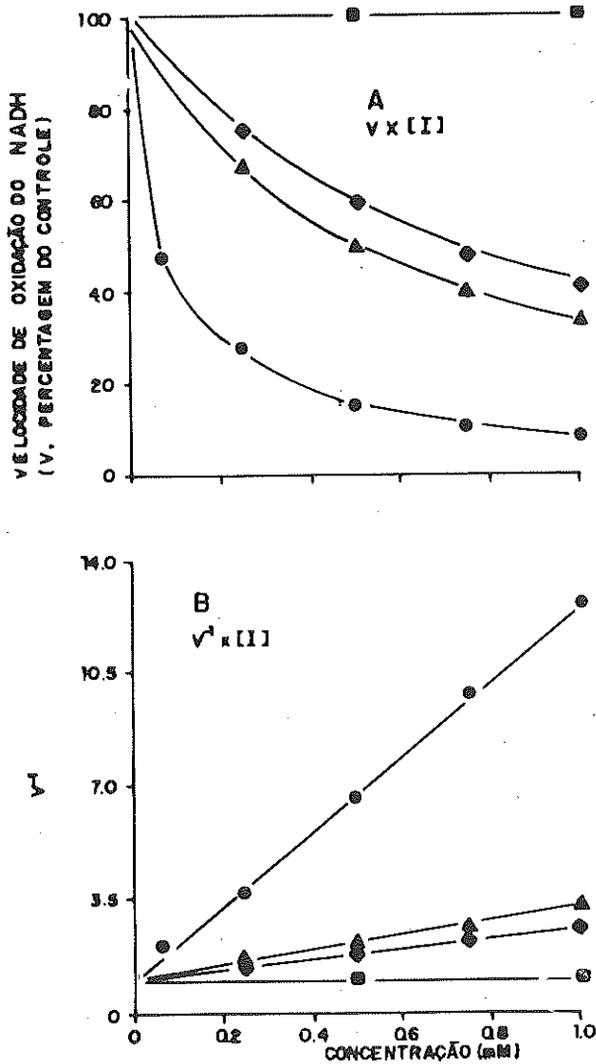


Figura 2. Efeito do steviosídeo (■), do steviolbiosídeo (◆), do isosteviol (▲) e do steviol (●) sobre a NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento. A atividade foi acompanhada espectrofotometricamente a 340 nm. Condições: temperatura ambiente (25°C); concentração de proteína mitocondrial: 100 µg/ml; concentração inicial de NADH: 0,15 mM; meio de incubação contendo Tris 20 mM a pH 7,4. A velocidade (A) ou o inverso da velocidade de reação (B) está representando contra a concentração.

Efeito do extrato aquoso total

A figura 3 mostra o efeito do extrato aquoso total da *Stevia rebaudiana* sobre a NADH-oxidase. Como se percebe, o extrato aquoso tem efeito extremamente potente. Já 0,15 mg de folhas secas extraídas por ml do meio de incubação provocam 50% de inibição. Este efeito é cerca de 10 vezes mais potente do que o efeito sobre a ATP-ase (Kelmer-Bracht, 1981). Em termos de concentração final do steviosídeo, 50% de inibição é observada com steviosídeo 10 μ M. O steviosídeo, isoladamente, não possui efeito, mas este parâmetro permite aquilatar a concentração dos demais glicosídeos no meio de incubação, a qual deve ser bastante baixa, já que o steviosídeo é o mais abundante. É claro que se pode esperar efeito inibidor de alguns deles. É o caso comprovado do steviolbiosídeo, por exemplo. Se apenas os glicosídeos são responsáveis pela inibição, pode haver alguns bastante potentes, já que a sua concentração no sistema é baixa.

Figura 3

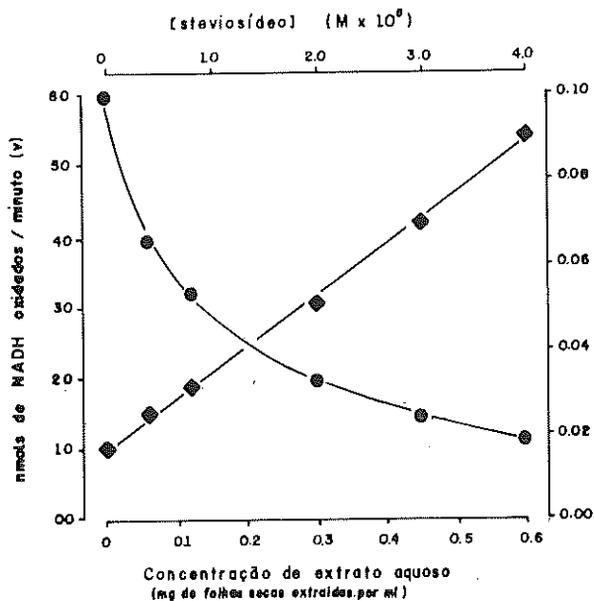


Figura 3. Efeito do extrato aquoso total da *Stevia rebaudiana* sobre a NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento. À temperatura ambiente (25°C), 100 μ g/ml de proteína mitocondrial foram incubados em Tris 20 mM, pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição de NADH 0,15 mM e acompanhada espectrofotometricamente a 340 nm. A velocidade (●) ou o inverso da velocidade de reação (■) está representado contra a concentração do extrato aquoso (expresso em mg de folhas secas extraídas por ml do meio de incubação; escala inferior) ou contra a concentração final de steviosídeo (escala superior).

A figura 3 mostra também a relação entre o inverso da velocidade de reação e a dose do extrato aquoso. A relação é linear. O ajuste de mínimos quadrados revelou um coeficiente de correlação linear (r) igual a 0,99; o erro-padrão da estimativa (S) foi igual a $\pm 0,0017$. Isto não significa — como talvez possa parecer — que haja no extrato aquoso apenas uma substância que possua efeito inibidor. Na realidade, significa que, se houver mais de um inibidor, cada um deles exerce inibição linear. Não se deve deixar de lembrar que o extrato aquoso das folhas da *Stevia rebaudiana* contém outras substâncias além dos derivados do steviosídeo. Por isto, a possibilidade de haver inibidores da NADH-oxidase que não pertençam ao grupo dos derivados do steviosídeo não pode ser descartada.

Efeito sobre a curva de saturação do NADH

Uma extensão da análise cinética da inibição do isosteviol e derivados é o estudo do efeito destes compostos sobre a curva de saturação do NADH (o outro substrato, oxigênio, está presente em concentração constante e saturante). Isto pode fornecer informações adicionais sobre a natureza da inibição. Uma destas informações, por exemplo, diz respeito ao grau de inibição. A indagação que surge é se o grau de inibição depende ou não da concentração de NADH. Deve-se recordar que, nas experiências anteriores, a concentração de NADH foi mantida fixa (0,15 mM, aproximadamente).

Um estudo desta natureza requer que se utilizem quantidades bem pequenas de enzima, já que de outra maneira é impossível medir a velocidade inicial em concentrações muito pequenas de NADH. Por isto, apenas 15 a 20 μ l de proteína mitocondrial por ml do meio de incubação foram utilizadas. Isto tem a vantagem de provocar extrema diluição de possíveis fatores de interferência, como, por exemplo, NAD^+ e NADH endógenos.

A figura 4 mostra os resultados obtidos com a variação simultânea da concentração do NADH (entre 2,5 e 100 μ M) e do isosteviol (controle, 0,125 e 0,25 μ M). Como se vê na figura 4A, o NADH 150 μ M já produz considerável saturação na NADH-oxidase. Isto significa que os dados das figuras 2 e 3, por exemplo, foram obtidos em condições quase que saturantes. As curvas de saturação na presença de isosteviol 0,125 e 0,25 mM correm abaixo do controle. Uma análise revelou que o grau de inibição — igual a $0,46 \pm 0,34$ com isosteviol 0,125 mM e $0,74 \pm 0,008$ com isosteviol 0,25 mM — permanece inalterado entre NADH 2,5 e 150 μ M. Isto já sugere que a inibição é do tipo não-competitiva (Plowman, 1972).

Com o steviolbiosídeo ocorre fato semelhante. A figura 5 mostra os resultados das experiências correspondentes. A curva-controle da figura 5A foi obtida independentemente e com preparação diversa daquela da figura 4A. Uma comparação entre ambas (fig. 6) mostra que são praticamente iguais, dentro de uma certa margem de erro. Isto atesta a reprodutibilidade do sistema, embora ele seja bastante complexo. O grau de inibição do steviolbiosídeo 0,5 mM é igual a $0,48 \pm 0,05$. Igualmente ao que ocorre com o isosteviol, esta inibição também é independente da concentração do NADH, ao menos nos limites de concentração aqui estudados.

Figura 4

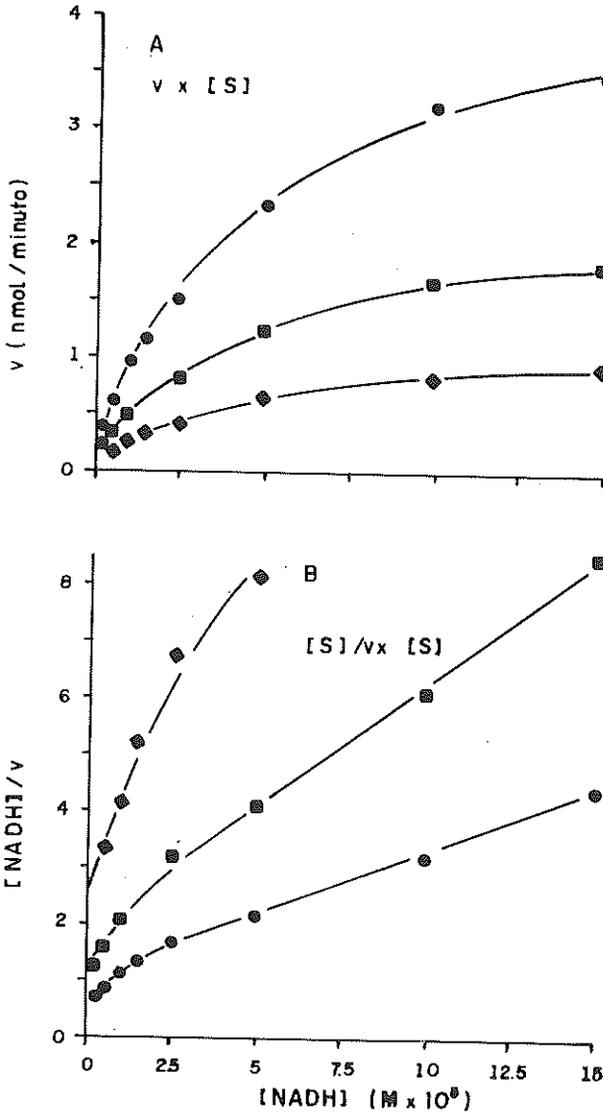


Figura 4. Efeito do isosteviol sobre a curva de saturação da NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento. A velocidade inicial foi medida espectrofotometricamente a 340 nm. Condições: temperatura ambiente (25°C); concentração de proteína: 16 μ g/ml; meio de incubação: tampão Tris 20 mM, pH 7,4. A velocidade (A) ou a razão concentração de NADH/velocidade (B) está representada contra a concentração de NADH. Controle: \circ ; isosteviol 0,125 mM: \square ; isosteviol, 0,25 mM: \diamond .

Figura 5

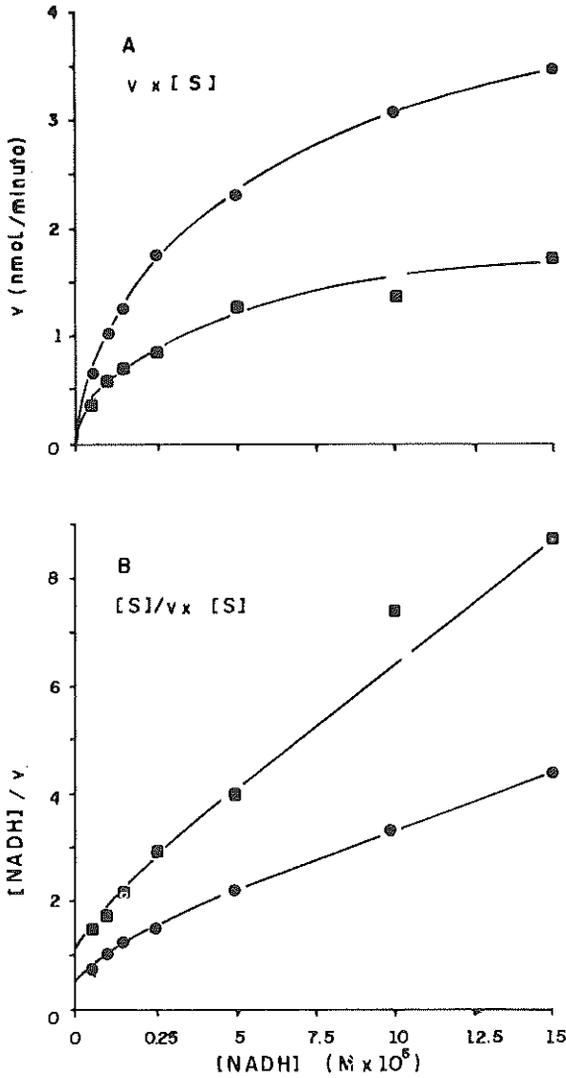


Figura 5. Efeito do steviolbiosídeo sobre a curva de saturação da NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento. Condições e procedimento experimental idênticos aos da figura 4. A velocidade (A) ou a razão concentração de NADH/velocidade (B) está representada em função da concentração de NADH. Controle: ●; steviolbiosídeo 0,5 mM: ■.

Se a independência do grau de inibição da concentração do NADH sugere inibição não-competitiva, uma resposta definitiva requer análise um pouco mais apurada. A análise gráfica da curva de saturação é técnica bem conhecida (Plowman, 1972). Ao fazer-se a representação duplamente recíproca (isto é, $1/v$ contra $1/[NADH]$) de Lineweaver-Burk, bem como a representação de $[NADH]/v$ contra $[NADH]$ (representação de Hanes), constatou-se que os pontos não descrevem, em nenhum dos casos, uma linha reta (Plowman, 1972). Todas as curvas analisadas apresentam curvatura próxima ao eixo dos $1/v$ ou ao eixo dos $[NADH]/v$. A representação de Hanes pode ser vista nas figuras 4B e 5B. Curvas bifásicas deste tipo são freqüentes em sistemas enzimáticos (Hill et al., 1977) e têm sido tradicionalmente interpretadas como indicativas da existência de ao menos duas formas distintas de enzima (Plowman, 1972; Cleland, 1970). Isto não deve surpreender no caso da NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento, já que o sistema realmente é bem complexo. As curvas das figuras 4 e 5 podem ser evidência tanto da existência de duas formas de NADH-oxidase (ou NADH-desidrogenase), como também, por exemplo, refletir dois graus diferentes de desagregação da membrana mitocondrial. Curvas deste tipo são obtidas também no caso de haver várias formas de transição entre formas extremas. Por isto mesmo, a interpretação deste tipo de curva é bastante difícil. Deve-se acrescentar, ainda, que a sensibilidade deste sistema à rotenona é superior a 95%, pelo que é impossível que se trate de uma forma insensível e de outra sensível à rotenona. Tampouco é fácil estabelecer paralelos entre as propriedades cinéticas da NADH-desidrogenase purificada, objeto de grande número de trabalhos (Singer, 1966; Galante e Hatefi, 1979; Dooijewaard e Slater, 1976a; Dooijewaard e Slater, 1976b), e da NADH-oxidase, já que as diferenças entre ambos os sistemas são óbvias. Seja como for, o fato de o grau de inibição depender da concentração de NADH significa, também, que todos os componentes cinéticos são afetados. Caso, por exemplo, um deles fosse afetado e o outro não, o grau de inibição teria que variar. Esta variação seria tanto maior quanto maior fosse a diferença entre as afinidades de cada um dos componentes cinéticos pelo NADH.

Isto tudo não impede, no entanto, que se faça uma avaliação das constantes cinéticas da enzima, desde que seja possível descrever quantitativamente as curvas. Tradicionalmente, curvas como as das figuras 4 e 5 têm sido descritas pela equação abaixo (Plowman, 1972; Cleland, 1970):

$$v = \frac{V [NADH]}{K + [NADH]} + \frac{V' [NADH]}{K' + [NADH]} \quad (10)$$

A equação (10) é idêntica à equação (1), tendo-se apenas introduzido a concentração de NADH no lugar do símbolo genérico para substrato (A). V e V' são as velocidades máximas de cada componente, e K e K' são as respectivas constantes de Michaelis.

Conforme consta em "Materiais e Métodos", formas alternativas desta equação permitem, através de representações gráficas, a obtenção de estimativas preliminares dos parâmetros cinéticos V , V' , K e K' . Estas estimativas preliminares podem, então, ser ajustadas definitivamente pelo método dos mínimos quadrados (Cleland, 1967). Os valores que foram obtidos da análise gráfica não diferiram muito dos valores definitivos resultantes do ajuste de mínimos quadrados, o que bem atesta a relativa precisão do método gráfico utilizado.

TABELA I

Parâmetros cinéticos da NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento: efeito do isosteviol e do steviolbiosídeo. Os parâmetros foram avaliados conforme está descrito, em "Materiais e Métodos". Ao lado das velocidades máximas (V e V') e das constantes de Michaelis (K e K'), o erro-padrão da estimativa (σ) e o coeficiente de correlação (r) também são apresentados

Parâmetro	Controle	Isosteviol 0,125 mM	Isosteviol 0,25 mM	Steviolbiosídeo 0,5 mM
V (nmol/min)	4,03	2,10	1,17	1,85
V' (nmol/min)	0,90	0,43	0,19	0,55
K (μ M)	80,9	74,5	80,7	76,5
K' (μ M)	7,5	6,9	9,6	8,1
σ	$\pm 0,075$	$\pm 0,064$	$\pm 0,03$	$\pm 0,08$
r	0,99	0,99	0,99	0,99

A Tabela I mostra os valores obtidos com o ajuste fino de mínimos quadrados. As constantes de Michaelis para o NADH, na ausência de inibidores, são iguais a $7,5 \mu$ M) e $80,9 \mu$ M). Há, portanto, um componente cinético com baixa constante de Michaelis, e outro com alta constante de Michaelis. O valor maior ($80,9 \mu$ M) aproxima-se dos valores normalmente propostos para a constante de Michaelis da NADH-desidrogenase (Singer, 1966; Doijewaard e Slater, 1966). Não há, porém, dados que permitam afirmar se isto realmente apresenta alguma relação, já que os sistemas são bastante diferentes entre si.

Uma medida do grau de confiança dos parâmetros avaliados é dada pelo coeficiente de correlação (r) e pelo erro-padrão da estimativa (σ). O coeficiente de correlação obtido para as cinco curvas foi igual a 0,99; já o erro-padrão da estimativa variou entre $\pm 0,03$ e $\pm 0,08$ (Tabela I). Uma avaliação visual do ajuste entre os dados experimentais e a equação (10) é oferecida pela figura 6. Nessa figura, traçou-se a linha teórica calculada com base na equação (10), utilizando-se os parâmetros cinéticos constantes da Tabela I. Uma comparação entre a curva calculada e os pontos experimentais indica que a concordância é bastante boa. Não parece haver desvio em nenhum dos extremos. Tendo em vista, pois, os valores do coeficiente de correlação e os valores dos erros-padrões das estimativas — constantes na Tabela I — bem como as curvas da figura 6, pode-se concluir que a equação (10) é, em princípio, suficiente para a descrição das curvas de saturação do NADH.

Figura 6.

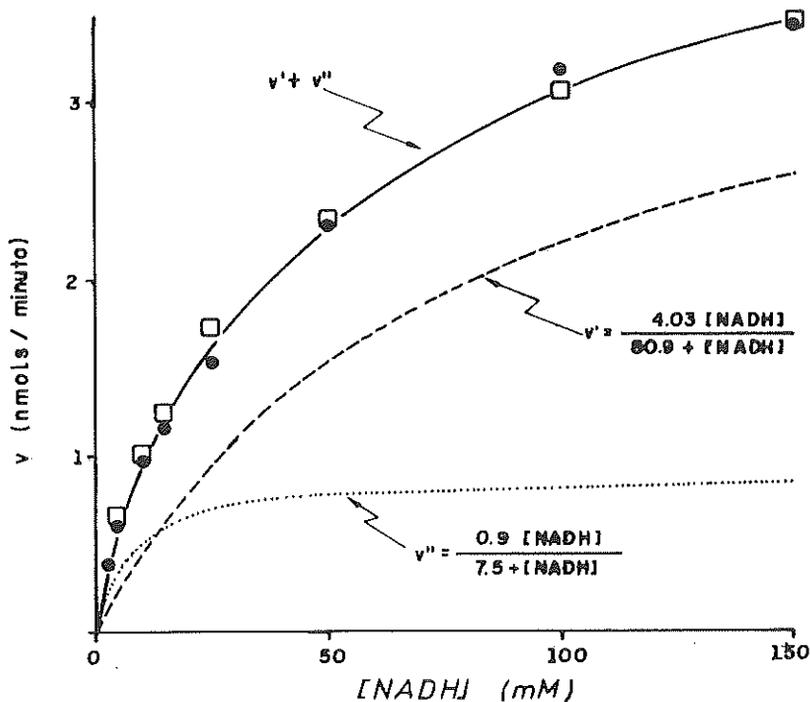


Figura 6. Comparação dos dados experimentais e calculados da curva de saturação da NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento. Os dados experimentais de dois experimentos realizados independentemente (\bullet , \square) estão representados, juntamente com a curva calculada (—), introduzindo-se na equação (10) as constantes cinéticas $K = 80,9 \mu M$, $K' = 7,5 \mu M$, $V = 4,03$ nmol/min e $V' = 0,9$ nmol/min. Os valores das constantes cinéticas resultaram do ajuste fino de mínimos quadrados das estimativas preliminares obtidas por manipulação gráfica (ver "Materiais e Métodos"). A resolução da curva em seus dois componentes também está demonstrada (—,).

A figura 6 mostra também a resolução da curva teórica nos seus dois componentes. Como se vê, o componente com baixa constante de Michaelis ($7,5 \mu M$) satura-se já com NADH $50 \mu M$, enquanto que o componente com alta constante de Michaelis ($80,9 \mu M$) ainda não está saturado com NADH $150 \mu M$. As velocidades máximas de cada componente são também nitidamente distintas: $0,9$ e $4,03$ nmol/min, respectivamente.

As constantes de inibição do isosteviol e do steviolbiosídeo

Fica para ser analisado ainda o efeito dos inibidores sobre os valores de K , K' , V e V' , o que pode ser feito com base nos valores constantes na Tabela I. A análise revela que, se há algum efeito, este se reflete na velocidade máxima, enquanto que as constantes de Michaelis não são praticamente alteradas. Os valores de K oscilam um pouco mais, porém assistematicamente, entre 6,9 e 9,6 μ M. Já os valores de V e V' mostram nítida e sistemática tendência de queda. Para o isosteviol, por exemplo, V decresce de 4,03 para 1,17 nmol/min, e V' de 0,9 para 0,19 nmol/min. Por outro lado, o decréscimo nos valores de V e V' é comparável ao grau de inibição. Disto se deduz que a inibição se deve praticamente a uma depressão nas velocidades máximas. Deve-se lembrar que a inibição seria competitiva caso houvesse aumento nos valores de K e K' , e os valores de V e V' permanecessem constantes. Se tanto os valores de K e K' como os de V e V' fossem, por outro lado, afetados, a inibição seria incompetitiva. Os dados são, portanto, muito mais consistentes com uma inibição não-competitiva, estando também de acordo com a independência do grau de inibição da concentração do substrato. A constância do grau de inibição indica também que a equação (10), na presença de inibidor, pode ser reescrita com a introdução de um único termo de inibição, ou seja:

$$v_i = \left[\frac{1}{1 + [I]/K_i} \right] \left[\frac{V[NADH]}{K + [NADH]} + \frac{V'[NADH]}{K' + [NADH]} \right] \quad (11)$$

Na equação (11), v_i é a velocidade de reação na presença de inibidor, $[I]$ é a concentração do inibidor (isosteviol ou steviolbiosídeo), enquanto que K_i é a constante de inibição. A divisão da equação (11) pela equação (10) resulta em

$$v/v_i = 1 + \frac{[I]}{K_i}, \quad (12)$$

isto é, a razão $v/v_i - 1$, como conseqüência, o grau de inibição, que é igual a $1 - v_i/v$ - depende exclusivamente da concentração do inibidor, sendo independente da concentração do substrato.

A comparação da equação (10) com a equação (11) revela também que os valores de V e V' obtidos na presença de isosteviol ou steviolbiosídeo são, na realidade, iguais a $V(1 + [I]/K_i)^{-1}$ e $V'(1 + [I]/K_i)^{-1}$, respectivamente. Isto quer dizer, em outras palavras, que os valores de V e V' medidos na presença de inibidores são parâmetros aparentes (V_{ap} e V'_{ap} , respectivamente), o que permite o cálculo da constante de inibição pelas relações.

$$K_i = \frac{V_{ap} I}{V - V_{ap}} = \frac{V'_{ap} I}{V' - V'_{ap}} \quad (13)$$

Os valores médios de K_i , calculados para o isosteviol e para o steviolbiosídeo, são 0,1 e 0,6 mM, respectivamente. Estes valores são, aproximadamen-

te, as concentrações que provocam 50% de inibição (fig. 2). Isto é exatamente o que se espera no caso da inibição não-competitiva pura, pois neste tipo de inibição o valor de K_i corresponde à concentração de inibidor que provoca 50% de inibição.

CONCLUSÕES E DISCUSSÃO FINAL

Os resultados descritos revelam fatos novos acerca da inibição da NADH-oxidase pelos produtos naturais da *Stevia rebaudiana*. Sabia-se que o steviol inibia a NADH-oxidase. Este trabalho demonstra que o efeito pode ser estendido para o isosteviol e para o steviolbiosídeo. Fica claro, também, que o isosteviol é um inibidor bem mais potente do que o steviol, sendo que o principal princípio doce da *Stevia rebaudiana* — o steviolbiosídeo — é inócuo. Também foi possível demonstrar que o extrato aquoso total das folhas da *Stevia rebaudiana* inibe fortemente a NADH-oxidase. Este efeito, porém, não pode ser atribuído ao steviosídeo, sendo duvidoso, inclusive, que se deva unicamente aos derivados deste, já que a inibição é bastante forte, dificilmente explicável com base nos teores conhecidos dos diversos compostos, de natureza glicosídica ou não.

Foi demonstrado claramente que a inibição da NADH-oxidase não se dá por uma competição com o substrato, já que ela é não-competitiva. Provavelmente, o sítio de inibição único situa-se entre a NADH-desidrogenase e a coenzima Q. Esta interpretação encontra respaldo em diversos dados obtidos por Kelmer Bracht (1981). Neste sentido, os produtos naturais da *Stevia rebaudiana* apresentam mecanismo semelhante ao dos inibidores clássicos rotenona e amital.

Foi demonstrado também, no presente trabalho, que a NADH-oxidase de mitocôndrias rompidas por congelamento e descongelamento apresenta duas — ou ao menos duas — formas distintas, discerníveis cineticamente. As duas formas são afetadas de modo idêntico pelo isosteviol e derivados. A natureza das duas formas não está clara. Uma possibilidade, no entanto, é a existência de formas com diferentes graus de integridade. Neste caso, tratar-se-ia de um artifício de técnica, já que mitocôndrias rompidas por congelamento não são a forma que existe na célula intata. Uma correlação da cinética observada para a NADH-oxidase no presente trabalho e as propriedades cinéticas da NADH-desidrogenase purificada não é possível, já que os sistemas diferem acentuadamente entre si (Dooijewaard e Slater, 1976).

BIBLIOGRAFIA

- CLELAND, W. W. The statistical analysis of enzyme kinetic data. In: Nord, F. F. (ed.), **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**. New York, Inter-science Publishers, 1967, vol. 29, p. 1-32.
- CLELAND, W. W. Steady-state kinetics. In: Boyer, P. D. (ed.), **The enzymes**. New York, Academic Press, 1970, vol. 2, p. 1-65.

- DOOIJEWAAARD, G. e SLATER, E. C. Steady-state kinetics of high molecular weight (type-I) NADH dehydrogenase. **Biochim. Biophys. Acta** 440: 1-15, 1976(a).
- DOOIJEWAAARD, G. e SLATER, E. C. Steady-state kinetics of low molecular weight (type-II) NADH dehydrogenase. **Biochim. Biophys. Acta** 440: 16-35, 1976(b)
- GALANTE, Y. M. e HATEFI, Y. Purification and molecular and enzymic properties of mitochondrial NADH-dehydrogenase. **Arch. Biochem. Biophys.** 192 (2): 559-568, 1979.
- HILL, C. M., WAIGHT, R. D. e BARDSLEY, W. G. Does any enzyme follow the Michaelis-Menten Equation?. **Mol. & Cel. Biochem.** 15(3): 173-178, 1977.
- KELMER BRACHT, A. M. Efeito de produtos da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni sobre mitocôndrias de fígado de rato. Tese de Mestrado, Curitiba, 1981.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. e RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275, 1951.
- PLOWMAN, K. M. **Enzyme kinetics**. New York, McGraw-Hill, 1972.
- SINGER, T. P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α - glycerophosphate dehydrogenases. In: Glick, D. (ed.), **Methods of biochemical Analysis**. New York, John Wiley & Sons, 1974, vol. 22, p. 123-175.
- VIGNAIS, P. V., DUEE, E. D.; VIGNAIS, P. M. e HUET, J. Effects of atractyligenin and its structural analogues on oxidative phosphorylation and on the translocation of adenine nucleotide in mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta** 118: 465-483, 1966.
- VOSS, D. O., CAMPELLO, A. P. e BACILA, M. The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat Brain mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 4: 48-51, 1961.

**VARIAÇÕES EM PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS DO SANGUE E URINA DE RATOS TRATADOS
COM EXTRATO AQUOSO DE SEMENTES DE
Stryphnodendron obovatum (barbatimão)**

ANTONIO DE QUEIROZ NETO *
IVALDO MELITO**
EDANIR DOS SANTOS***

RESUMO

Investigou-se o efeito da administração oral do extrato aquoso de sementes de *Stryphnodendron obovatum* em ratos. Foram analisadas variações em parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue e urina. Observou-se aumento do hematócrito, leucopenia e tendência de diminuição da excreção da uréia, células epiteliais e leucócitos no grupo experimental, em relação ao grupo-controle.

ABSTRACT

The effect of oral administration of aqueous extracts of *Stryphnodendron obovatum* seeds in rats was investigated. Variations in haematological and biochemical parameters of blood and urine were analysed. We observed an increase of the globular volume and leukopenia, and a decreasing tendency of the excretion of urea, leukocyte and epithelial cells in the experimental types in relation to the control type.

INTRODUÇÃO

O barbatimão (*Stryphnodendron obovatum*) tem, segundo crenças populares do Norte e Nordeste do Brasil, propriedades anticoncepcionais; já no Sul do país, atribui-se a ele efeito cicatrizante e anti-hemorragico. Dele são usados extratos de sementes, raiz, caule e folhas.

* Professor Auxiliar do Departamento de Farmácia e Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá – UEM

** Professor Livre-Docente do Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP

***Professor Assistente do Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP

Atualmente, vários pesquisadores têm procurado avaliar cientificamente essas crenças. Assim, AZOUBEL *et alii* (1981) demonstraram que o extrato aquoso de sementes de barbatimão provocou diminuição do peso e retarde de crescimento em ninhadas de ratas tratadas por 7 dias *v.o.*. Estudando o efeito do referido extrato sobre a placenta da rata, SALA *et alii* (1982) concluíram que, nos animais tratados, o peso e o volume da placenta foram significativamente menores em relação aos do grupo-controle.

Experiências realizadas por GIORGINI *et alii* (1982) demonstraram que o uso tópico de infusões de casca de barbatimão para a cicatrização de feridas cutâneas de ratos, produz, dentre outros efeitos, proliferação epitelial mais acelerada sob a crosta de fibrina, diminuição da espessura do tecido de granulação e redução, em número e calibre, dos capilares sanguíneos neoformados do tecido de regeneração.

Estudos dos efeitos do extrato aquoso de sementes de barbatimão sobre as glândulas lacrimais (CONTRERA *et alii*, 1982a) e salivares (CONTRERA *et alii*, 1982a) foram realizados.

Nosso intuito, no presente trabalho, é o de avaliar, através de variações de parâmetros fisiológicos induzidas pelo extrato aquoso de sementes de barbatimão em ratos, o potencial toxicológico do vegetal em questão.

MATERIAL E MÉTODOS

1- Obtenção do extrato

Quantidade conhecida de sementes de barbatimão trituradas a pó foi diluída em água até a concentração de 72 mg/ml. Este material foi então acondicionado em recipiente hermeticamente fechado, que foi autoclavado por 15 minutos, findos os quais a solução foi resfriada, filtrada e mantida em congelador a - 40°C, até sua utilização.

2- Animais

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos, com peso, ao início do experimento, de 150 gramas e provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP.

Após um período de adaptação de uma semana, os animais foram divididos em dois grupos de dez (sorteados ao acaso). Um dos grupos, considerado de controle, recebeu durante todo o período experimental um volume de 2 ml de água, através de gavagem. O outro grupo (experimental) recebeu o extrato aquoso de semente de barbatimão na dose de 96 mg/kg de peso, contidos em 2 ml, pela mesma via.

3 - Aparato experimental e coleta de amostras

Para as coletas de urina foram utilizadas gaiolas metabólicas convenientemente preparadas, onde os animais permaneciam por um período de 15 horas, com ração e água "*ad libitum*".

As amostras de sangue eram coletadas através de um corte na extremidade distal da cauda dos ratos (no início do experimento), e através da punção cardíaca (ao final do experimento).

Durante os 30 dias da administração do extrato foram coletadas 3 amostras de urina (ao início, 15 e 30 dias de experimento) e 2 amostras de sangue, uma ao início e outra ao término do experimento.

Os animais foram pesados aos 10, 20 e 30 dias do experimento.

4 - Parâmetros analisados

- Ganho de peso
- Urina
 - volume urinário
 - sedimento (Prescott & Brodie, 1964)
 - avaliação semiquantitativa de leucócitos, nitritos, glicose, bilirrubina, urobilinogênio, corpos cetônicos, sangue e proteínas (Combur Test-9)
 - creatinina (Labtest)
 - uréia (Labtest)
 - proteína (biureto por Gornall et alii, 1949)
- Sangue
 - hematócrito
 - hemograma
 - leucograma com contagem diferencial
 - glicose - método da hexoquinase "gluco-quant" (Boeringer)
 - uréia (Labtest)
 - creatinina (Labtest)
 - proteína (biureto por Gornall et alii, 1949)
 - TGO/TGP (Labtest)

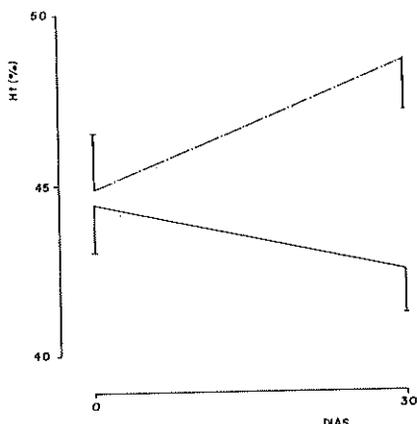


FIGURA 1: Hematócrito(%). Grupos I (————— ,controle); II (- - - - - ;experimental). A diferença entre os grupos é significativa a 10%. As barras verticais representam o erro-padrão da média. n = 10.

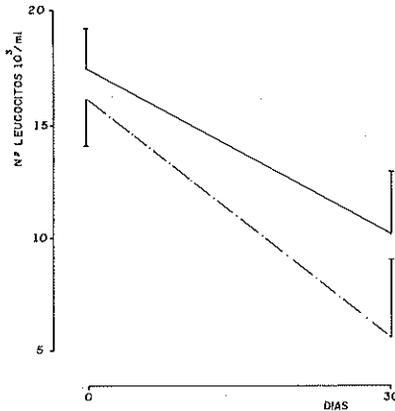


FIGURA 2: Leucócitos sanguíneos. Grupo I (———, controle); grupo II (— · — · —, experimental). A diferença entre os grupos é significativa a 10%. As barras verticais representam o erro-padrão da média. n = 10.

5 - Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi feita usando-se o teste “t” de STUDENT para experimentos não-pareados, estabelecido o nível de significância de 10% SNEDECOR (1956).

RESULTADOS

Não foram observadas entre os animais dos dois grupos, diferenças significativas no percentual de ganho de peso e volume urinário excretado em 15 horas.

O exame direto de urina não revelou alterações, assim como os níveis de creatinina excretada não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Por outro lado, a avaliação quantitativa de uréia e sedimento urinário demonstrou uma tendência de diminuição da excreção de uréia, células epiteliais e leucócitos no grupo experimental, embora não-significativa no modelo proposto.

FIGURA 1

No sangue ocorreram significativos aumentos do hematócrito (fig. 1) e leucopenia (fig. 2), nos animais do grupo experimental em relação ao grupo-controle. Os níveis de uréia, TGO/TGP, glicose e creatinina não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

FIGURA 2

As avaliações dos níveis de proteínas, tanto na urina como no plasma, não foram consideradas em virtude de problemas técnicos surgidos quando da mensuração deste componente na espécie animal utilizada.

DISCUSSÃO

Os dados obtidos, embora relevantes em alguns aspectos, não são conclusivos no que se refere a um possível efeito tóxico do barbatimão. Entretanto, estes dados sugerem que o vegetal estudado pode alterar níveis de componentes séricos e urinários, relacionados a possíveis alterações das funções hepática e renal, bem como o quadro hematológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZOUBEL, R.; CONTRERA, M.G.D.; LOPES, R.A.; CONTRERA, J.D.; COLUSSO, A. J.; GUSMAN, A. B. Efeitos da administração de extrato de sementes de barbatimão - *Stryphnodendron obovatum* Benth (Fabales mimosaceae) na ossificação do embrião do rato. **Resumos do 6.º Encontro de Pesquisas Veterinárias F.C.A.V. - J - UNESP Jaboticabal**, 1981.
- CONTRERA, M.G.D.; LOPES, R.A.; PRADO, M.L.M.; AZOUBEL, R.; GUSMAN, A.B. Estudos morfológicos e morfométricos da glândula lacrimal extra-orbitária do rato adulto tratado com extrato de sementes de barbatimão - *Stryphnodendron obovatum*. **Resumos do VII Simpósio de Plantas Medicinais no Brasil Belo Horizonte**, 1982 a.
- CONTRERA, M.G.D.; LOPES, R.A.; PRADO, M.L.M.; AZOUBEL, R.; GUSMAN, A.B. Efeitos do extrato de sementes de barbatimão - *Stryphnodendron obovatum* nas glândulas salivares de ratos adultos. **Resumos do VII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil Belo Horizonte**, 1982 b.
- GIORGINE, I.L.; CONTRERA, M.G.D.; LOPES, R.A.; GRISI, D.L.C. Efeitos do uso tópico do barbatimão - *Stryphnodendron obovatum* na cicatrização de feridas cutâneas no rato. **Resumos do VII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil - Belo Horizonte**, 1982.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.T.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, **177**: 751-766, 1949.
- PRESCOTT, L.F.; BRODIE, D.E. A simple differential stain for urinary sediment. **The Lancet**. **10**(2): 940, 1964.
- SALA, M.A.; CONTRERA, M.G.D.; LOPES, R.A.; AZOUBEL, R. Efeitos do extrato de sementes de barbatimão - *Stryphnodendron obovatum* na placenta de rata. **Resumos do VII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil - Belo Horizonte**, 1982.
- SNEDECOR, G.W. **Statistical methods**. Iowa State University Press, 1956.

PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTITOPLÂSMICOS EM TRABALHADORES DE MATADOUROS DO MUNICÍPIO DE MARINGÁ (PR)

ANA LUCIA FALAVIGNA
MARIA LUIZA GASPAR GOULART DIAS
MARIA TERESINHA GOMES CASAVECHIA

Departamento de Farmácia-Bioquímica
da Universidade Estadual de Maringá
Caixa Postal 331 – CEP 87.100 – Maringá (PR) – Brasil

RESUMO

A investigação sorológica realizada no período de junho a dezembro de 1983, em 100 magarefes da cidade de Maringá (PR), cuja idade variava de 16 a 56 anos, revelou uma frequência de 40% de reações positivas ao teste de imunofluorescência indireta.

Nos 40 soros positivos ao teste, foram encontrados 16 com título 1/16, 15 com 1/64, 7 com 1/256 e 2 com 1/4096, não sendo detectado nenhum soro reagente para o título 1/1024.

ABSTRACT

The serological investigation carried out in the period of June-December of 1983, on 100 slaughterer in the city of Maringá, State of Paraná, showed a frequency of 40% positive to the indirect immunofluorescence, whose ages varied from 16 to 56 years old.

In the 40 positive serum to the test, were found 16 with title 1/16, 15 with 1/64, 7 with 1/256 and 2 with 1/4096, it was not found any reacting serum to the title 1/1024.

INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) é um protozoário com distribuição geográfica mundial, com prevalência bastante alta: cerca de 40% ou mais da população pode apresentar sorologia positiva (Neves, 1982).

Como essas reações sorológicas indicam, simultaneamente, infecções passadas e presentes, e, por outro lado, a maioria dos indivíduos adultos parece tolerar perfeitamente o parasitismo, não apresentando sintomas apreciáveis, a prevalência de reações positivas não indica a prevalência de toxoplasmose-doença (Pessoa & Martins, 1982).

Entretanto, como a doença se mostra com extensa variedade de manifestações mórbidas, assumindo uma grande variedade de aspectos clínicos, capaz de determinar nos adultos um quadro agudo febril, e nas crianças uma forma subaguda de encefalomielite e coriorretinite (Rey, 1973), tem-se destacado nos últimos anos a relevante importância da toxoplasmose em Patologia Humana.

Predisõem ao contágio certas atividades profissionais, como aquelas desenvolvidas pelos trabalhadores de redes de esgotos, de matadouros, açougueiros, varredores e coletores de lixo. Castanho et alii (1982), em Jundiá (SP), analisaram soros de 253 trabalhadores responsáveis pelo serviço de limpeza pública daquele município e, utilizando a técnica de imunofluorescência indireta, observaram um índice de 74,70% de positividade.

O presente trabalho tem por objetivo estudar a prevalência da infecção toxoplásmica em trabalhadores de matadouros.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi efetuada investigação sobre toxoplasmose em magarefes do Frigorífico Maringá S/A (FRIGMA), situado no município de Maringá (PR), no período de junho a dezembro de 1983.

Os profissionais analisados possuíam idade mínima de 16 e máxima de 56 anos e desempenhavam suas funções em diversos setores, como manança, preparação de carnes, preparação de vísceras, carregamento e graxaria. Nas suas atividades, abatem quase que exclusivamente gado bovino e suíno.

O material de estudo foi representado por 100 amostras de soros de sangue colhido no próprio ambiente de trabalho, através de punção venosa na quantidade de 5-10 ml, e levado ao Laboratório Piloto de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá. Na retirada do sangue, não se observou jejum ou ingestão prévia de alimentos, fazendo-se, todavia, a coleta sempre das 8 às 9 horas.

Foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta, conjugando-se fluoresceína com anti-imunoglobulinas humanas IgG, IgM e IgA (Hyland). O teste foi considerado positivo em títulos iguais ou superiores a 1/16.

A maioria dos indivíduos eram do sexo masculino, perfazendo um total de 71, para apenas 29 mulheres.

RESULTADOS

Em 100 magarefes submetidos ao teste de imunofluorescência

cia indireta para pesquisa de anticorpos antitoxoplásmicos, constatou-se a positividade (títulos iguais ou superiores a 1/16) em 40% dos soros estudados.

Nos 40 soros positivos ao teste, foram encontrados 16 com título 1/16, 15 com 1/64, 7 com 1/256 e 2 com 1/4096, não sendo detectado nenhum soro reagente para o título 1/1024.

A representação gráfica da freqüência dos títulos de anticorpos antitoxoplásmicos consta na figura 1.

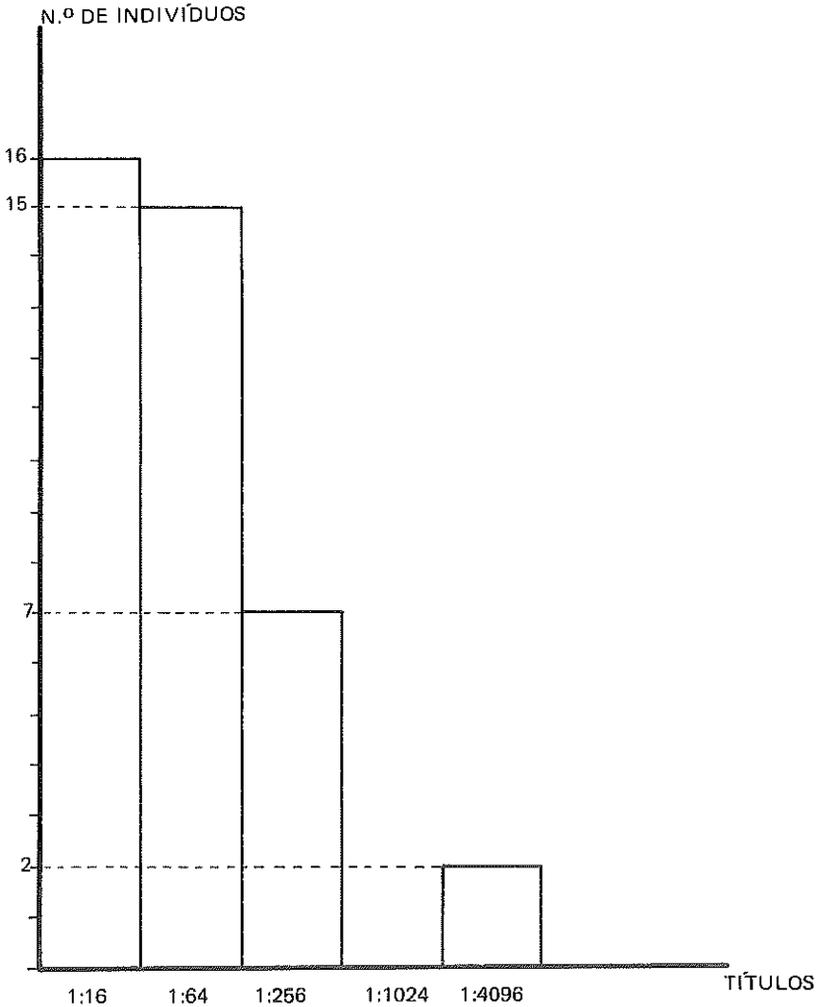


FIG. 1 — FREQUÊNCIA DE TÍTULOS DE ANTICORPOS ANTITOXOPLÁSMICOS

DISCUSSÃO

Entre as investigações realizadas a fim de estudar a prevalência dessa parasitose, considerando-se a população em geral, encontramos os dados de Nussenzeiwig (1957), que pesquisou 370 doadores de sangue de São Paulo, com idade de 20 a 40 anos, demonstrando 71,3% de casos positivos com título 1/16 ou mais, sendo 1/64000 o mais alto.

Deane et alii (1963), em pesquisa realizada no território do Amapá, examinaram 354 indivíduos, encontrando 68,1% de casos positivos em maiores de 10 anos.

Jamra (1964), em pesquisa realizada em 300 pessoas da cidade de São Paulo, cuja idade variava de 5 meses a 82 anos, encontrou um alto índice de positividade.

Ainda Deane et alii (1963), na cidade de Cachoeira de Arari (Ilha de Marajó), pesquisaram 323 indivíduos maiores de 10 anos, encontrando 83% de casos positivos.

Giovannoni et alii (1982), em pesquisa realizada em 320 acadêmicos de Medicina de Curitiba (UFPR), evidenciaram 164 (56,2%) soros reagentes.

A positividade de 40% de soros reagentes nos trabalhadores de matadouros observados no presente trabalho é relativamente baixa, quando comparada com aquela encontrada em Sorocaba (SP) por Gomes (1970), que detectou 86,4% de positividade nesse mesmo grupo de profissionais, aproximando-se, no entanto, dos dados divulgados por Starzyk et alii (1953) que encontraram 66,6%.

Considerando a freqüência dos títulos da reação de imunofluorescência indireta, os resultados encontrados neste trabalho são semelhantes aos da maioria das pesquisas consultadas, onde se observa a predominância de casos positivos com títulos baixos. Com isso, confirma-se a afirmativa de Neves (1973) segundo o qual, no homem, a prevalência da infecção aumenta com a idade, de modo que, em geral, mais de 60% de adultos já tiveram a infecção toxoplásmica, apresentando, portanto, anticorpos com baixos títulos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASTANHO, M.L.S.; KAWARABAYASHI, M.; LA SALVIA F.º, V.; SCHLODTMANN, A.G.; BAGGIO, D.; HYAKUTAKE, S. Toxoplasmose e Leptospirose: II – Prevalência das infecções em varredores e coletores de lixo no município de Jundiá, SP. **Resumos do VII Congresso Brasileiro de Parasitologia**, 1982. p. 123.
- DEANE, L.M. Inquérito de toxoplasmose e tripanossomíase realizado no Território do Amapá pela III Bandeira Científica do Centro Acadêmico "Oswaldo Cruz" da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **Rev. Med. (São Paulo)**, 47:1-12, 1963.

- GIOVANNONI, M.; HYAKUTAKE, S.; SILVA, A.F. da; GODOY, O.F. de; KAWARABAYASHI, M.; SCHODTMANN, A.G. Prevalência da toxoplasmose-infecção entre acadêmicos de Medicina em Curitiba, Paraná. **Resumos do VII Congresso Brasileiro de Parasitologia**, 1982. p. 124.
- GOMES, M.C. de O. Epidemiologia da toxoplasmose: Investigação em profissionais do distrito sede do município de Sorocaba, **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, 12(4): 266-271, julho-agosto, 1970.
- JAMRA, L.M.F. **Contribuição para a epidemiologia da toxoplasmose. Inquérito em 100 famílias de uma área da cidade de São Paulo.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1964.
- NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**, 5. ed.; Rio de Janeiro, Atheneu, 1982.p.117.
- NEVES, J. Diagnóstico e tratamento das doenças infectuosas e parasitárias. 1. ed. - Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1973. p.673.
- NUSSENZWEIG, R.S. Toxoplasmose: inquérito sorológico feito pela prova do coagulante em doadores de sangue. **Hospital (Rio)** 51: 723-728, 1957.
- PESSOA, S.B. & MARTINS, A.V. **Parasitologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. p.252.
- REY, L. **Parasitologia**. 1. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1973. p.303.
- STARZYK, J; DOLEZAI, M.; LUTYNSKI, R.; RUDOLF, A. Badania nad czestotcia wystepowania zakazenia *Toxoplasma gondii* wsród pracownikówrzézni wojewodztwa krakowskiego. **Wiad. Parasyt.** 2: 53-54, 1953.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos professores Luiza T. Tsuneto e Maria Valdrinez C. Lonardoní e aos alunos Marcos A. Correa e Marina Gimenes, que contribuíram para a realização deste trabalho.

AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO DO PÊLO, ALTURA DO PELAME E REFLECTÂNCIA DA PELE E DO PELAME DE BOVINOS DA RAÇA JERSEY NA REGIÃO DE SÃO CARLOS, ESTADO DE SÃO PAULO

SANDRA AIDAR DE QUEIROZ *
CARLOS EDUARDO FURTADO **
JOSÉ FRANCISCO ASSELI ***
JOSÉ GOMES ARANTES NETO ****

RESUMO

Utilizaram-se 159 vacas da raça Jersey para o estudo do comprimento do pêlo, altura do pelame e reflectância da pele e do pelame num período de transição entre verão e inverno, visando observar as variações que ocorriam nesses parâmetros. Observaram-se variações significativas no comprimento do pêlo e na altura do pelame dos bovinos, o que indica que, com a aproximação do inverno, os animais apresentam modificações que possibilitam melhor isolamento térmico. Os coeficientes médios de reflectância da pele encontrados neste trabalho variaram de 0,81 a 0,93, e os de reflectância do pelame variaram de 0,63 a 0,78, valores considerados altos na escala de medida utilizada.

ABSTRACT

159 Jersey cows were used to study the length of the hair, its height and reflectance in the transition period from March to May. We observed significant variations in coat length and hides height. These results indicated that the approach of winter turns the animals more efficient in thermal isolation. The coefficient of reflectance of the skin found in this report oscillated from 0,81 to 0,93 and the coefficient of reflectance of hides from 0,63 to 0,78.

- * Professora Colaboradora da UEM e aluna do curso de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - CAMPUS de Jaboticabal - UNESP
** Professor Assistente do Departamento de Zootecnia da UEM.
*** Zootecnista da SUPREMAIS - Campinas - SP
**** Zootecnista da CATI - Marília - SP

INTRODUÇÃO

Os efeitos do ambiente tropical, especialmente o *stress* calórico, são bastante evidentes na criação de bovinos, afetando a sua reprodução, o seu crescimento e a produção de leite e carne.

As altas temperaturas agem sobre a fisiologia do animal, reduzindo a ingestão de alimentos, diminuindo o metabolismo e afetando o sistema endócrino. MONTY JR. & WOLFF (1974), trabalhando com animais da raça Holstein - Friesian em ambiente quente, observaram significativas reduções na fertilidade. O período entre a parição e a subsequente prenhez foi muito extenso, e o estro foi significativamente diminuído nos animais expostos a altas temperaturas. Segundo HAFEZ (1973), a diminuição no rendimento lácteo se apresenta aos 21°C nos bovinos da raça Holstein, entre 24°C e 27°C nas da raça Jersey, e aos 32°C nos zebuínos.

O pêlo, juntamente com a pele, serve como envoltório do corpo, para proteção, percepção do meio, excreção e termorregulação. O pelame (pele + pelos) é extremamente adaptável às alterações de meio interno e externo.

As variações na coloração da pele e dos pêlos são controladas geneticamente e resultam de modificações quantitativas de melanina. O grau desta pigmentação está associado à radiação solar, segundo MULLER (1978). A pigmentação negra da pele absorve totalmente a radiação ultravioleta, sendo que a pele sem pigmentação é muito susceptível às queimaduras do sol e pode sofrer danos por fotossensibilização.

O pêlo de cor clara, como o branco e o creme, reflete maior proporção de calor que o pêlo vermelho e o negro. Uma pelagem branca e lisa está associada a uma menor elevação da temperatura corporal. HAFEZ (1973) afirma que a energia refletida de uma pelagem clara é 40% maior do que a de uma pelagem escura, mesmo que tenha o mesmo comprimento e textura.

A espessura do pelame é menor no verão e maior no inverno; BAR-NABÉ (1975) verificou que a espessura do pelame varia conforme a região do corpo e difere em função das estações do ano. A correlação entre espessura do pelame e produção de leite indica uma tendência de animais de pelame menos espesso apresentarem índices de lactação mais elevados.

Dentro deste contexto, procurou-se neste trabalho avaliar o comprimento do pêlo, a altura do pelame e a reflectância da pele e do pelame de bovinos da raça Jersey num período de alteração do pelame (outono).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 159 vacas da raça Jersey com idade compreendida entre 2 e 17 anos, da Fazenda Santa Maria, situada no município de Ribeirão Bonito, região de São Carlos, estado de São Paulo.

Os parâmetros considerados foram: altura do pelame, comprimento do pêlo e reflectância da pele e do pelame.

O esquema experimental constou de observações dos parâmetros em período compreendido entre as 15 e as 18 horas, durante os meses de março, abril e maio. Nos dias de observação, os animais ficavam presos em um galpão de alvenaria, sendo que as medidas foram efetuadas da seguinte maneira: primeiramente media-se a altura do pelame e o comprimento do pêlo, utilizando-se uma régua metálica milimetrada e provida de cursor; em seguida, com o auxílio de uma máquina de tosquiador e aparelho de barbear, raspavam-se os pêlos de uma região previamente determinada, para posteriores medidas de reflectância da pele. As medidas de reflectância do pelame foram tomadas em região também previamente determinada (fig. 1).

O aparelho utilizado para efetuar as medidas de reflectância foi um reflectômetro especialmente desenvolvido para este trabalho, elaborado pelo professor Dr. Roberto Gomes da Silva, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - *campus* de Jaboticabal - UNESP.

O esquema de análise estatística foi o de quadrados mínimos, controlando fatores que afetavam a produção de leite durante o experimento, como o período de coleta de dados, a idade do animal e o estágio de lactação da vaca.

A coleta dos dados foi feita durante os meses de março, abril e maio, e esse período foi dividido em 6 grupos:

- | | |
|---------------|---------------|
| 1 - 26/03/82; | 4 - 30/04/82; |
| 2 - 02/04/82; | 5 - 07/05/82; |
| 3 - 23/04/82; | 6 - 14/05/82. |

A causa de variação idade da vaca foi dividida em 5 grupos, sendo esses:

- 1 - vacas de até 3 anos;
- 2 - vacas de 4 a 6 anos;
- 3 - vacas de 7 a 9 anos;
- 4 - vacas de 10 a 12 anos;
- 5 - vacas de mais de 12 anos;

A causa de variação estágio de lactação foi dividida em 3 grupos:

- 1 - vacas secas;
- 2 - vacas que produziam até há 6 meses;
- 3 - vacas que produziam há mais de 6 meses.

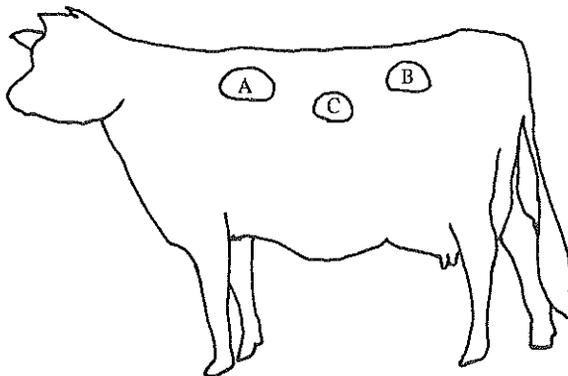


FIGURA 1 — Diagrama que demonstra as regiões onde foram efetuadas as observações de: A - Reflectância da pele, B - reflectância do pelame, C - comprimento do pêlo e a altura do pelame.

Aplicou-se, após a análise estatística, o teste de TUKEY para os parâmetros que apresentaram diferenças significativas. O teste foi feito ao nível de 5% de probabilidade, ou seja, para 95% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho são apresentados nos quadros 1, 2, 3, 4 e 5.

QUADRO 1 — Análise de variância efetuada para o parâmetro altura do pelame.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	Q.M.	F
Dias de coleta	5	49,1958	31,48**
Idade do animal	4	27,6925	17,72**
Estágio de lactação	2	0,3604	0,23 NS
Resíduo	147	1,5627	—
TOTAL	158	—	—

**significância de 99%

NS não-significativo

Analisando-se o quadro 1, podemos notar que a altura do pelame variou significativamente em função dos dias de coleta e da idade dos animais, e não significativamente em função do estágio de lactação. Como houve significância estatística para os dias de coleta e a idade dos animais, utilizou-se o teste de TUKEY para comparação das médias.

Em relação aos dias de coleta, o teste de TUKEY demonstrou que houve variações significativas, que indicam que a altura do pelame aumentou no decorrer do presente trabalho. Este fato foi consequência da aproximação do período de inverno, quando os animais tendem a apresentar uma capa isolante mais eficiente para diminuir as perdas de calor corporal. Os dados obtidos confirmam as observações de HAFEZ (1973), BARNABÉ (1975) e HOLMES et alii

(1980), que afirmam que a altura do pelame varia conforme as estações do ano. DOWLING (1959) conclui ainda que a diferença de tolerância de um mesmo animal ao calor em diferentes estações do ano pode ser atribuída a trocas de pêlo.

No que se refere à idade dos animais, o teste de TUKEY não apresentou diferenças significativas de médias.

QUADRO 2 – Análise de variância efetuada para o parâmetro comprimento do pêlo.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	Q.M.	F
Dias de coleta	5	43,5500	6,12**
Idade do animal	4	44,1672	6,20**
Estágio de lactação	2	1,0226	0,15NS
Resíduo	147	7,1129	
TOTAL	158	—	—

**significância de 99%

NS não-significativo

Os resultados registrados no quadro 2 demonstram que o comprimento do pêlo variou significativamente conforme os dias de coleta e idade dos animais. Assim sendo, aplicou-se o teste de TUKEY para a comparação de médias, e observou-se que o comprimento do pêlo variou no decorrer do experimento, ou seja, com a aproximação do período de inverno e a diminuição da insolação, os animais foram apresentando um maior comprimento do pêlo. Este fato pode estar associado à variação ocorrida na altura do pelame, conforme se comentou anteriormente, contribuindo, assim, para um melhor isolamento térmico.

O teste de TUKEY, aplicado para as médias de comprimento do pêlo em função da idade do animal, demonstrou que houve uma diminuição no comprimento do pêlo com o avançar da idade. Este fato sugere possíveis modificações morfofisiológicas, que procuram aclimatar os animais às condições de temperatura elevada, visto que variações no comprimento do pelo e na espessura do pelame influenciam decididamente na homeotermia.

QUADRO 3 – Análise de variância efetuada para o parâmetro reflectância da pele.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	Q.M.	F
Dias de coleta	5	0,0589	25,61**
Idade do animal	4	0,0034	1,48NS
Estágio de lactação	2	0,0022	0,96NS
Resíduo	147	0,0033	—
TOTAL	158	—	—

**significância de 99%

NS não-significativo

QUADRO 4 – Análise de variância efetuada para o parâmetro reflectância do pelame.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	Q.M.	F
Dias de coleta	5	0,1050	15,91**
Idade do animal	4	0,0047	0,71NS
Estágio de lactação	2	0,0118	1,79NS
Resíduo	147	0,0066	—
TOTAL	158	—	—

**significância de 99%
NS não-significativo

Os dados constantes nos quadros 3 e 4 demonstram que somente houve significância estatística em relação aos dias de coleta. Como os dados foram obtidos em diferentes animais e em diferentes dias de coleta, era de se esperar que houvesse variações na reflectância da pele e do pelame em relação aos dias de coleta, já que a coloração da pele e do pelame varia entre raças e entre indivíduos de uma mesma raça. Essa variação permite a seleção dos animais que apresentem menores coeficientes de reflectância da pele e do pelame, visando à aclimação em condições de temperatura elevada.

Os coeficientes médios de reflectância para pêlo e pelagem encontrados neste trabalho são mostrados no quadro 5.

QUADRO 5 – Coeficientes médios de reflectância para pele e pelame em função dos dias de coleta.

COEFICIENTES MÉDIOS	GRUPOS DE DIAS DE COLETA					
	1	2	3	4	5	6
Reflectância da pele	0,92	0,86	0,81	0,84	0,93	0,89
Reflectância do pelame	0,72	0,64	0,63	0,63	0,78	0,68

STEWART (1953), citado por CENA (1974), usando um espectofotômetro para medir a reflectância de pêlos de bovinos, concluiu que esta depende fortemente da cor do pelame. Estes coeficientes variam de 0,08, para pelames pretos, a 0,42, para pelames brancos. CENA (1974), medindo a reflectância de pelames de bovinos, encontrou valores entre 0,1, para pelames totalmente escuros, e 0,42, para pelames brancos. Esse mesmo pesquisador determinou um coeficiente de reflectância de pelames claros utilizando o número de pêlos por unidade de área de superfície de pele, o diâmetro do pêlo, a profundidade do pelame e o comprimento do pêlo, obtendo o valor de 0,63 para bovinos.

Os valores dos coeficientes médios de reflectância encontrados no presente trabalho diferem dos apresentados pelos autores citados, sendo este fato decorrente de que o aparelho utilizado para tal considera o valor zero (0) para a coloração branca e o valor um (1) para a coloração escura (preta), seja para pele ou pelame.

Nota-se pelo quadro 5 que os valores dos coeficientes médios de reflectância da pele dos bovinos Jersey são bastante altos, em função de ela ter coloração escura. Já os coeficientes médios de reflectância do pelame são menores, pois o pêlo dos animais possui coloração avermelhada, fazendo com que diminua o coeficiente de reflectância do pelame como um todo. De maneira geral, pode-se afirmar que a pelagem dos animais da raça Jersey não apresenta uma reflectância adequada à aclimação destes animais às condições tropicais, necessitando eles de seleção baseada em menores coeficientes de reflectância do pelame.

Considerando novamente o quadro 4, os dados obtidos demonstram que não houve significância estatística para a idade do animal. Entretanto CENA (1974) observou que a reflectância do pelame de bovinos da raça Brahman mostrou evidência de adaptação, sendo que o pelame tornou-se mais claro com o aumento da temperatura ambiente. Talvez este fato pudesse ser observado se o experimento acompanhasse o lote de animais por um período de tempo mais longo.

CONCLUSÕES

Os bovinos de raça Jersey observados neste trabalho apresentaram variações significativas na altura do pelame e no comprimento do pêlo durante o período experimental. Essas variações são, possivelmente, devidas à aproximação do período de inverno, quando é necessário um melhor isolamento térmico, para diminuir as perdas de calor corporal.

O comprimento do pêlo em função da idade do animal foi avaliado, e notou-se uma diminuição deste, possivelmente devida a modificações morfo-fisiológicas, que procuram aclimatar os animais a temperaturas elevadas.

Os coeficientes médios de reflectância da pele variaram de 0,81 a 0,93, e os de reflectância do pelame de 0,63 a 0,78. Esses coeficientes são considerados altos na escala de medida utilizada, indicando que os bovinos da raça Jersey estudados não apresentam pelames com grande poder de reflexão da energia solar, sendo necessária a seleção dos indivíduos que apresentem menores coeficientes de reflectância do pelame em função da produção de leite.

BIBLIOGRAFIA

- BARNABÉ, R. C. Variações estacionais no pelame de vacas da raça Jersey e sua correlação com a produção leiteira. *Rev. Fac. Med. Vet. e Zoot. Univ. São Paulo*, 12:95 - 106, 1975.
- CENA, K. *Radioactive loss from a animals and man. Heat loss from animals and man. Assessment and control.* England, Page Bros Ltd, 1974.
- DOWLING, D. F. The significance of the coat in heat tolerance of cattle. *Aust. Vet. Agric. Res.*, 10(5): 744-748, 1959.

- HAFEZ, E. S. E. **Adaptación de los animales domesticos**. Barcelona, Labor 1973.
- HOLMES, C. W.; KING, C. T.; SAUWA, P. E. L. Effects at exposure to a hot measurement on Friesian and Brahman X Friesian cattle, with some measurements of the effects of exposure to radiant heat. *Anim. Prod.*, **30**: 1 - 11, 1980.
- MONTY Jr., D. E.; WOLFF, L. K. Summer heat stress and reduced fertility in Holstein-Friesian cows in Arizona. *An. Jour. of Vet. Res.*, **35**(12): 1495 - 1500, 1974.
- MULLER, P. B. **Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos**. Santa Maria, Pallotti, 1978.

ESTIMATIVA DE HERDABILIDADE E CORRELAÇÃO DE PESOS EM DIFERENTES IDADES DE CAMUNDONGOS

SANDRA AIDAR DE QUEIROZ *

RESUMO

Foi formada uma população-base de camundongos a partir de indivíduos escolhidos ao acaso no Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Esta população sofreu seleção a favor dos indivíduos de maior peso corporal, formando-se assim a geração F_1 . Analisaram-se as médias de peso por sexo, ordem de parição e família, sendo que todas apresentaram diferenças significativas, tanto na população-base como na geração F_1 . Os sexos diferiram significativamente a partir do peso aos 21 dias, mostrando que o peso anterior à desmama é influenciado por efeitos maternos. As fêmeas produziram progênies mais pesadas após a primeira parição, o que indica que esta não é a parição aconselhável para a escolha de reprodutores, quando se objetiva maior ganho de peso. As herdabilidades encontradas mostraram valores altos, em alguns casos superiores a 1, e a explicação deste fato estaria numa falha do método de cálculo do coeficiente de herdabilidade. Os valores para as correlações fenotípicas, genéticas e ambientais corresponderam aos esperados, o que indica que se pode selecionar camundongos pelo peso aos 42 dias, baseando-se na correlação fenotípica, e aos 28 dias, baseando-se na correlação genética.

ABSTRACT

A basic mice population was formed at random at the biotron of the Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. From this population a group of individuals characterized by their heavier bodily weight was selected. Generation F_1 was thus formed. Average weights by sex, birth order and family, were analyzed. All the individuals exhibited very significant differences not only in the basic population but also in Generation F_1 . After a period of 21 days the

weight differences between the sexes were significantly different. This showed that the pre-weaning weight was influenced by maternal factors. The females produced heavier off-springs after the first birth. This is an indication that this birth is not the best choice for reproduction selections when its aim is to produce heavier animals. Inherited elements showed high values; in certain cases superior to 1. The explanation for this fact may reside in the methodic error for the calculation of the inheritance coefficient. Phenotypic, genetic and environment correlation values were as expected. This indicated that mice can be chosen by weight in a 42-day period based on phenotypical correlations; on the other hand, they can be chosen in a 28-day period based on genetic correlation.

INTRODUÇÃO

O peso de um animal, em qualquer estágio de seu desenvolvimento, é resultante da interação de muitos processos que afetam o crescimento. Os parâmetros genéticos para peso devem ser estimados em estágios específicos do desenvolvimento animal, facilitando, assim, o estudo e a análise desses parâmetros.

O animal é a menor unidade que pode ser selecionada ou rejeitada, e o emprego de métodos de seleção provoca alterações nas frequências gênicas, que, nas características quantitativas, serão detectadas através de alterações fenotípicas observadas nas médias, variâncias e covariâncias.

Dentro deste contexto, os objetivos deste trabalho consistem em:

- estimar os coeficientes de herdabilidade referentes ao peso aos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias;
- avaliar o ganho genético realizado após a aplicação de seleção;
- avaliar as correlações genéticas, fenotípicas e ambientais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados utilizados neste trabalho foram obtidos junto ao Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Foram analisados dados referentes a duas gerações de camundongos da cepa Swiss. A população-base foi constituída de 7 famílias formadas, tomando-se animais ao acaso, sendo que cada macho foi acasalado com uma única fêmea durante toda a duração do experimento. As famílias foram formadas logo após a desmama (12 dias), e as fêmeas da população-base tiveram 3 parições. Após a parição das fêmeas, foram tomadas as medidas de peso aos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias.

A seleção, visando aos camundongos de maior peso corporal, foi feita aos 70 dias, e os indivíduos selecionados pertenciam à segunda parição das fêmeas da população-base. A partir dos indivíduos selecionados (geração F₁), formaram-se 8 famílias de um macho e uma fêmea. As mesmas medidas descritas anteriormente foram tomadas após a parição das fêmeas da geração F₁.

O programa utilizado foi o "Least-squares and maximum likelihood general purpose program", descrito por HARVEY (1976).

O modelo linear usado foi o seguinte:

$$Y_{ij} = u + F_i + e_{ij} \quad (1) \text{ onde:}$$

Y_{ij} = resposta para cada variável dependente;

u = média geral;

F_i = efeito das variáveis independentes discretas: sexo, ordem de parto e família;

e_{ij} = erro aleatório.

O coeficiente de herdabilidade foi calculado segundo BECKER (1975), através da fórmula:

$$h^2 = \frac{2 \partial^2 s}{\partial s^2 + \partial w^2} \quad (I) \text{ onde:}$$

h^2 = coeficiente de herdabilidade

∂s^2 = componente da variância de família;

∂w^2 = componente da variância residual.

O coeficiente de herdabilidade para a análise conjunta da população-base e da geração F₁ foi ponderado da seguinte maneira:

$$h_p^2 = \frac{K_1 h_1^2 + K_2 h_2^2}{K_1 + K_2} \quad (II) \text{ onde:}$$

h_p^2 = coeficiente ponderado de herdabilidade;

h_1^2 = coeficiente de herdabilidade da característica da população-base;

h_2^2 = coeficiente de herdabilidade da característica para a geração F₁;

K_1 = número de observações por animal na população-base;

K_2 = número de observações por animal na geração F₁.

As médias de peso para a análise conjunta dos diferentes estágios de vida dos animais foram ponderadas pelo número de indivíduos analisados, sendo

obtidas médias para sexo, ordem de parição e família.

O ganho genético foi obtido calculando-se a diferença entre o peso dos animais da geração F₁ e dos da população-base, ou seja:

$$R = \bar{X}_{F_1} - \bar{X}_P \quad (2) \text{ onde:}$$

R = ganho genético;

\bar{X}_{F_1} = peso médio dos indivíduos da geração F₁;

\bar{X}_P = peso médio dos indivíduos da população-base.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os quadros 1 e 2 referem-se aos quadrados médios obtidos na análise de variância, e a significância do teste F neles é indicada.

QUADRO 1 — Quadrados médios e significâncias do teste F para as diferentes idades referentes à população-base.

Causas de variação	14	21	28	35	42	49	56	63	70
Sexo	0,20 ^{NS}	11,13*	80,77**	386,63**	738,76**	981,46**	1056,22**	1246,85*	1349,59**
Ordem de parição	24,85**	99,81**	123,26**	120,17**	226,72**	146,66**	148,74**	147,07**	202,68**
Família	21,63**	70,47**	164,24**	121,09**	75,04**	64,62**	49,10**	43,36**	46,44**
Resíduo	0,51	2,06	5,21	10,36	9,64	9,34	9,57	9,83	9,88

QUADRO 2 — Quadrados médios e significâncias do teste F para as diferentes idades referentes à geração F₁.

Causas de Variação	14	21	28	35	42	49	56	63	70
Sexo	0,04 ^{NS}	2,33*	0,28 ^{NS}	36,44**	246,42**	475,89**	547,68**	672,15**	752,04**
Família	3,26**	26,91**	59,41**	80,75**	52,65**	26,42**	33,84**	17,31**	19,86**
Resíduo	0,09	0,53	2,84	6,04	6,07	5,55	5,40	5,04	5,94

Observa-se que, tanto para a população-base como para a geração F₁, o peso dos animais passou a diferir significativamente conforme o sexo, a partir do peso aos 21 dias, podendo-se notar, no quadro 4, que os machos eram mais pesados que as fêmeas, para as duas gerações analisadas e em todas as idades. Esses resultados condizem com os verificados por NAGAI (1972), que não encontrou diferenças significativas no peso dos animais dos dois sexos aos 12 dias, e sim a partir dos 25 dias. O fato de haver diferenças entre sexos a partir dos 21 dias pode estar diretamente associado à desmama, que ocorre nesta idade. Além disso, os valores dos quadrados médios aumentam no intervalo de tempo estudado, indicando que o peso dos animais dos dois sexos se diferencia sensivelmente com o aumento da idade, fato este que pode estar associado com fatores hormonais relativos à formação de músculos nos machos, devido à presença de testosterona.

QUADRO 3 — Médias (em gramas) de pesos não-ajustadas às diferentes idades e ganho genético realizado.

Característica	População-base			Geração F ₁			Ganho genético (R)
	Dias	n	\bar{M}_P	n	\bar{M}_{F_1}	s(h)	
14	121	6,28	0,07	67	5,02	0,04	-1,26
21	121	9,95	0,14	67	9,00	0,09	-0,95
28	121	16,77	0,23	67	15,18	0,21	-1,49
35	121	22,45	0,32	67	21,91	0,31	-0,54
42	121	25,65	0,31	67	25,58	0,31	-0,07
49	121	27,84	0,31	67	28,47	0,30	0,63
56	121	29,76	0,31	67	30,43	0,29	0,67
63	121	31,23	0,31	67	31,68	0,28	0,45
70	121	32,46	0,32	67	33,39	0,31	0,93

R = $\bar{M}_{F_1} - \bar{M}_P$; n = número de indivíduos observados; \bar{M}_P = média da população-base; \bar{M}_{F_1} = média da geração F₁; s(h) = erro-padrão da média.

O quadro 3 mostra as médias não ajustadas de pesos e o ganho genético realizado. É possível verificar que a população-base mostrou médias de peso maiores que as da geração F₁ até o peso aos 42 dias, quando a geração F₁ passou a mostrar melhores resultados. EISEN (1973) avaliou a resposta à seleção para peso da ninhada de camundongos aos 12 dias e obteve resultados que indicam que a resposta à seleção é primeiramente devida à média dos efeitos diretos, e que os efeitos maternos contribuíram pouco para a resposta. Esses pesos menores anteriores aos 49 dias, encontrados neste trabalho, podem ser devidos a condições de meio ambiente não-adequadas à expressão do maior potencial genético para ganho de peso dos indivíduos selecionados. Sabe-se que a herdabilidade da característica peso, de maneira geral nas espécies múltiparas, aumenta com a idade, e a seleção anterior à desmama é pouco eficiente. Isto não foi observado neste trabalho, mas serve para tentar justificar o fato de o ganho genético realizado ter sido negativo no intervalo entre o nascimento e os 42 dias, quando começou a crescer, mostrando que a seleção a favor dos indivíduos mais pesados passou a apresentar resultados.

QUADRO 4 — Médias de pesos (em gramas) em diferentes idades, de acordo com o sexo

Característica	População-base						Geração F ₁						Análise Conjunta			
	Machos			Fêmeas			Machos			Fêmeas			Machos		Fêmeas	
	n	\bar{M}	s(\bar{m})	n	\bar{M}	s(\bar{m})	n	\bar{M}	s(\bar{m})	n	\bar{M}	s(\bar{m})	n	\bar{M}	n	\bar{M}
14	60	6,32	0,11	61	6,23	0,10	32	6,04	0,05	35	4,99	0,05	92	5,87	96	5,87
21	60	10,29	0,21	61	9,61	0,20	32	8,81	0,13	35	9,19	0,13	92	9,76	96	9,46
28	60	17,70	0,34	61	15,85	0,32	32	15,21	0,30	35	15,34	0,30	92	16,83	96	15,66
35	60	24,47	0,48	61	20,42	0,45	32	22,66	0,44	35	21,16	0,43	92	23,84	96	20,69
42	60	28,46	0,46	61	22,86	0,43	32	27,54	0,44	35	23,62	0,43	92	28,13	96	23,14
49	60	31,07	0,45	61	24,62	0,42	32	31,19	0,42	35	25,75	0,42	92	31,11	96	25,03
56	60	33,11	0,46	61	26,42	0,43	32	33,35	0,41	35	27,51	0,41	92	33,19	96	26,82
63	60	34,86	0,47	61	27,59	0,43	32	34,92	0,40	35	28,45	0,40	92	34,88	96	27,90
70	60	36,24	0,47	61	28,68	0,44	32	36,81	0,43	35	29,96	0,43	92	36,44	96	29,16

n=número de indivíduos observados;
 \bar{m} =média de pesos em diferentes idades;
 s(\bar{m}) = erro-padrão da média.

A ordem de parição, na população-base, apresentou resultados significativos, tendo nascido, a partir da segunda parição, filhos mais pesados, o que pode ser observado no quadro 5. Esse fato é comum em algumas espécies múltiparas e é importante para indicar quando se deve fazer a seleção de fêmeas. No quadro 5, verifica-se que da segunda e da terceira parições nasceram indivíduos mais pesados, e esta superioridade foi mantida em todas as medidas, tendo sido significativas as diferenças em todas as idades observadas. Observaram-se filhos mais pesados após a primeira parição, o que indica que as fêmeas não devem ser selecionadas por esta parição, pois ainda não apresentam toda a capacidade para gerar filhos mais pesados.

As médias dos pesos das famílias, mostradas no quadro 6, também diferiram significativamente, tanto na população-base como na geração F₁, mas observa-se que os valores de quadrados médios foram aumentando até aos 28 dias para a população-base e até aos 35 dias para a geração F₁, quando começaram a diminuir. É possível que, se tivessem sido tomadas medidas de peso em maior intervalo, as diferenças entre famílias tenderiam a ser menores, ou mesmo não-significativas. Resultados semelhantes obteve NAGAI (1971) ao estudar o peso pós-desmama como medida de produção de leite em camundongos.

A superioridade de algumas famílias sobre outras pode estar relacionada com o fato de algumas mães serem melhores produtoras de leite ou possuírem maior habilidade materna do que outras. Após a desmama, as famílias tenderam ao equilíbrio, pois este fator já não mais influenciou.

QUADRO 5 — Médias de pesos (em gramas) de camundongos segundo a ordem de parição - População-base,

Característica	Ordem de parição								
	1			2			3		
Dias	n	M	s(m)	n	M	s(m)	n	M	s(m)
14	41	5,58	0,12	52	5,83	0,10	28	7,42	0,16
21	41	8,64	0,24	52	8,95	0,20	28	12,26	0,31
28	41	14,90	0,38	52	16,23	0,32	28	19,20	0,49
35	41	20,33	0,53	52	22,52	0,46	28	24,49	0,70
42	41	22,65	0,51	52	26,33	0,44	28	27,97	0,67
49	41	25,30	0,51	52	28,25	0,43	28	29,98	0,66
56	41	27,36	0,51	52	30,10	0,44	28	31,83	0,67
63	41	28,83	0,52	52	31,59	0,44	28	33,26	0,68
70	41	29,67	0,52	52	32,75	0,45	28	34,96	0,68

n = número de indivíduos;
M = média de pesos;
s(m) = erro-padrão da média.

QUADRO 6 — Médias de pesos (em gramas) em famílias de camundongos em diferentes idades.

Característica	População-base		Geração F ₁		Análise conjunta	
	n	M	n	M	n	M
Dias						
14	121	6,11	67	4,93	188	5,69
21	121	9,76	67	8,72	188	9,39
28	121	16,51	67	14,97	188	15,96
35	121	22,16	67	21,62	188	21,97
42	121	25,56	67	25,41	188	25,51
49	121	27,78	67	28,35	188	27,98
56	121	29,75	67	30,63	188	30,06
63	121	31,23	67	31,60	188	31,36
70	121	32,40	67	33,32	188	32,73

n = número de indivíduos observados;
m = média de pesos.

O quadro 7 mostra os coeficientes de herdabilidade para a característica peso em diferentes idades. Como se pode observar, alguns coeficientes são superiores a 1, o que é incorreto teoricamente. Esse fato pode ser explicado por uma falha do método de cálculo do coeficiente de herdabilidade, pois, segundo BECKER (1975), a fórmula utilizada para o cálculo do coeficiente de herdabilidade para irmãos completos é a seguinte:

$$h^2 = \frac{2 \cdot \sigma_s^2}{\sigma_s^2 + \sigma_w^2} \quad (I)$$

O componente da variância σ_s^2 estima 50% da variância genética aditiva, 25% da variância de dominância, várias quantidades de variância epistática, e 100% da variância devida aos efeitos maternos. Quando se multiplica esse valor por 2 para obter 100% da variância aditiva, multiplicam-se por 2 todos os outros valores, o que pode acarretar uma superestimativa dos valores do coeficiente de herdabilidade. Além disso, o número de animais observados (121 na população-base e 67 na geração F₁) não foi adequado, por ter sido pequeno, podendo, devido a isso, ter-se incorrido em erros.

FALCONER (1981) encontrou o valor 0,35 para o coeficiente de herdabilidade do peso corporal de camundongos com 6 semanas (42 dias) sendo esse valor bastante menor que o obtido neste trabalho.

De maneira geral, os resultados para os coeficientes de herdabilidade encontrados diminuem à medida que aumenta a idade dos animais. Tal fato pode ser entendido se se observar que a variância devida aos efeitos maternos diminui após a desmama (21 dias), influenciando cada vez menos no cálculo do coeficiente de herdabilidade, e fazendo com que o valor deste também diminua.

QUADRO 7 — Coeficientes de herdabilidade para o peso em diferentes idades e respectivos erros-padrões.

Característica Dias	População-base K _P = 15,69			Geração F ₁ K _F = 8,28			Análise Conjunta	
	h ²	s(h ²)	n	h ²	s(h ²)	n	h ² _P	n
14	1,45	0,23	121	1,61	0,18	67	1,51	188
21	1,36	0,26	121	1,72	0,14	67	1,48	188
28	1,32	0,27	121	1,41	0,25	67	1,35	188
35	0,81	0,30	121	1,20	0,29	67	0,94	188
42	0,61	0,28	121	0,96	0,32	67	0,73	188
49	0,55	0,27	121	0,63	0,31	67	0,58	188
56	0,42	0,23	121	0,78	0,32	67	0,54	188
63	0,36	0,22	121	0,45	0,28	67	0,39	188
70	0,38	0,22	121	0,44	0,28	67	0,40	188

h² = coeficiente de herdabilidade;

s(h²) = erro-padrão do coeficiente de herdabilidade;

n = número de indivíduos observados.

Os quadros 8 e 9 referem-se aos valores das correlações fenotípicas, para a característica peso em diferentes idades. Espera-se que as correlações entre os pesos sejam mais altas quanto mais próximos estiverem entre si os pesos, o que pode ser observado através dos resultados obtidos.

QUADRO 8 — Correlações fenotípicas para a característica peso em diferentes idades (população-base)

	14	21	28	35	42	49	56	63	70
14	1,00	0,771	0,777	0,664	0,543	0,479	0,421	0,368	0,333
21	—	1,00	0,908	0,802	0,720	0,617	0,524	0,449	0,369
28	—	—	1,00	0,916	0,842	0,778	0,696	0,619	0,532
35	—	—	—	1,00	0,882	0,838	0,769	0,685	0,563
42	—	—	—	—	1,00	0,940	0,897	0,837	0,711
49	—	—	—	—	—	1,00	0,950	0,898	0,783
56	—	—	—	—	—	—	1,00	0,955	0,854
63	—	—	—	—	—	—	—	1,00	0,877
70	—	—	—	—	—	—	—	—	1,00

QUADRO 9 — Correlações fenotípicas para a característica peso em diferentes idades (geração F₁).

	14	21	28	35	42	49	56	63	70
14	1,00	0,617	0,293	0,299	0,153	0,205	0,152	0,084	0,000
21	—	1,00	0,782	0,779	0,670	0,600	0,588	0,461	0,341
28	—	—	1,00	0,952	0,879	0,763	0,655	0,532	0,450
35	—	—	—	1,00	0,944	0,848	0,754	0,618	0,522
42	—	—	—	—	1,00	0,934	0,843	0,757	0,660
49	—	—	—	—	—	1,00	0,892	0,844	0,774
56	—	—	—	—	—	—	1,00	0,911	0,822
63	—	—	—	—	—	—	—	1,00	0,929
70	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000

A correlação fenotípica indica que os efeitos ambientais e genéticos atuam juntos sobre o fenótipo no valor da correlação, e isso é muito importante do ponto de vista da seleção, pois é com base nela que se pode fazer mais cedo a escolha dos melhores animais.

Os indivíduos da população-base poderiam ter sido selecionados em função do peso aos 42 dias, pois este apresenta correlação de 0,711 com o peso aos 70 dias, sendo esta correlação alta e, portanto, indicada como referência para a seleção. O mesmo poderia ser dito da escolha dos melhores indivíduos da geração F₁, sendo que a seleção destes pode ser baseada no peso aos 42 dias, que apresenta correlação de 0,660 com o peso aos 70 dias.

As correlações ambientais são mostradas nos quadros 10 e 11. Pode-se notar que houve correlações negativas na população-base para o peso aos 14 dias com os pesos aos 21 e 28 dias, e do peso aos 21 dias com o peso aos 28 dias, entre outros. Isto pode ter sido devido à desmama, que ocorreu aos 21 dias, indicando ter havido uma mudança sensível nas condições de meio ambiente. O mesmo pode ser verificado na geração F₁, reforçando a conclusão de que a desmama é um importante fator de alteração do meio.

QUADRO 10 — Correlações ambientais para a característica peso em diferentes idades (população-base).

	14	21	28	35	42	49	56	63	70
14	1,00	-1,260	-1,373	1,270	0,529	0,506	0,268	0,078	0,329
21	—	1,00	-1,243	1,016	0,354	0,290	0,143	0,044	0,166
28	—	—	1,00	0,462	0,065	-0,004	-0,242	-0,242	-0,036
35	—	—	—	1,00	0,937	1,010	1,026	0,991	0,629
42	—	—	—	—	1,00	0,888	0,904	0,846	0,638
49	—	—	—	—	—	1,00	0,942	0,888	0,665
56	—	—	—	—	—	—	1,00	0,939	0,780
63	—	—	—	—	—	—	—	1,00	0,822
70	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000

QUADRO 11 — Correlações ambientais para a característica peso em diferentes idades (geração F₁).

	14	21	28	35	42	49	56	63	70
14	1,00	-0,812	-0,292	-0,382	0,352	0,272	0,359	0,150	0,157
21	—	1,00	-0,829	-1,106	1,998	0,549	0,788	0,366	0,241
28	—	—	1,00	-1,130	2,046	0,374	0,509	0,192	0,114
35	—	—	—	1,00	1,449	0,011	0,399	-0,063	-0,169
42	—	—	—	—	1,00	1,597	1,120	1,727	1,881
49	—	—	—	—	—	1,00	0,913	0,889	0,909
56	—	—	—	—	—	—	1,00	0,96F	0,920
63	—	—	—	—	—	—	—	1,00	0,916
70	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000

Os quadros 12 e 13 referem-se às correlações genéticas para a característica peso em diferentes idades. A correlação genética entre duas características indica que os genes que afetam uma característica afetam a outra no valor da correlação, e esse seria, portanto, o parâmetro mais adequado para a escolha dos melhores indivíduos para a reprodução.

QUADRO 12 -- Correlações genéticas para a característica peso em diferentes idade (população-base)

	14	21	28	35	42	49	56	63	70
14	—	0,910	0,938	0,955	0,814	0,795	0,718	0,570	0,681
21	—	—	0,993	1,017	0,938	0,852	0,783	0,675	0,620
28	—	—	—	0,995	0,964	0,914	0,846	0,742	0,727
35	—	—	—	—	0,893	0,813	0,735	0,631	0,634
42	—	—	—	—	—	0,981	0,924	0,886	0,823
49	—	—	—	—	—	—	0,975	0,949	0,942
56	—	—	—	—	—	—	—	0,984	0,966
63	—	—	—	—	—	—	—	—	0,970
70	—	—	—	—	—	—	—	—	—

QUADRO 13 -- Correlações genéticas para a característica peso em diferentes idades (geração F₁).

	14	21	28	35	42	49	56	63	70
14	—	0,694	0,291	0,311	0,166	0,334	0,255	0,199	0,109
21	—	—	0,792	0,834	0,778	0,854	0,782	0,781	0,566
28	—	—	—	0,980	0,974	0,969	0,772	0,778	0,639
35	—	—	—	—	0,996	0,083	0,868	0,809	0,641
42	—	—	—	—	—	0,958	0,856	0,769	0,593
49	—	—	—	—	—	—	0,902	0,828	0,681
56	—	—	—	—	—	—	—	0,967	0,850
63	—	—	—	—	—	—	—	—	0,945
70	—	—	—	—	—	—	—	—	—

A seleção dos indivíduos, no presente trabalho, visando à escolha dos mais pesados, poderia ser feita para a população-base aos 28 dias, o mesmo ocorrendo para a geração F₁, pois o peso aos 28 dias tem correlação genética de 0,727 e 0,639 para a população-base e a geração F₁, respectivamente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados do presente trabalho, observou-se que os machos apresentaram maior ganho de peso que as fêmeas e que essa diferença foi significativa a partir do peso à época da desmama (21 dias), quando os efeitos maternos diminuíram.

No que se refere à ordem de parição, observou-se que as fêmeas produziram progênies mais pesadas a partir da segunda parição, não devendo, portanto, ser selecionadas pelo peso da progênie da primeira parição.

As várias famílias também apresentaram diferenças significativas quanto ao peso em diferentes idades, mas observou-se uma tendência ao equilíbrio, o que indica uma provável influência de efeitos maternos.

Os coeficientes de herdabilidade para a característica peso nas diferentes idades mostraram valores maiores que 1, o que pode ser explicado por uma falha do método de cálculo deste coeficiente.

As correlações fenotípicas, ambientais e genéticas apresentaram resultados compatíveis com os esperados, e as correlações fenotípicas indicam que os animais da população-base poderiam ser selecionados pelo peso aos 42 dias, o mesmo podendo ser dito para a geração F₁.

A seleção, se baseada nas correlações genéticas, poderia ser realizada aos 28 dias, tanto para a população-base como para a geração F₁.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKER, W. A. *Manual of quantitative genetics*. Washington, Wash. State Univ. Press, 1975.
- EISEN, E. J. *Direct and maternal genetic responses resulting from selection for 12 day litter in mice*. Can. J. Gen. Cytol., **15**: 483-490, 1973.
- FALCONER, D. S. *Introduction to quantitative genetics*. Essex, Longman House, 1981.
- HARVEY, W. R. *Instructions for use of L.S.M.L.G.P.* Ohio, Ohio State University 1976.
- NAGAI, J. *Prewaning weight as a measure of milk production in mice*. Can. J. Gen. Cytol., **13**: 354-361, 1971.
- NAGAI, J. *Heterosis and combining and maternal abilities in mouse litter weight*. Can. J. Ani. Sci., **51**: 687-695, 1972.

AGRADECIMENTOS

Ao médico-veterinário Luís Carlos Laus, do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, e ao Dr. Raysildo Barbosa Lôbo, por terem possibilitado a realização deste trabalho.

