

**ALIMENTOS FUNCIONAIS ATENUAM EFEITOS TÓXICOS CRÔNICOS DO  
TABAGISMO PASSIVO EM PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, NUTRICIONAIS E  
HISTOPATOLÓGICOS DO PULMÃO DE RATOS: UM ESTUDO ALEATORIZADO  
E CONTROLADO**

**RICARDO AUGUSTO SILVA**

**ALIMENTOS FUNCIONAIS ATENUAM EFEITOS TÓXICOS CRÔNICOS DO  
TABAGISMO PASSIVO EM PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, NUTRICIONAIS E  
HISTOPATOLÓGICOS DO PULMÃO DE RATOS: UM ESTUDO ALEATORIZADO  
E CONTROLADO**

**RICARDO AUGUSTO SILVA**

Defesa de Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestrado – Área de concentração: Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

636.213  
S586a

Silva, Ricardo Augusto.

Alimentos funcionais atenuam efeitos tóxicos crônicos do tabagismo passivo em parâmetros fisiológicos, nutricionais e histopatológicos do pulmão de ratos: um estudo aleatorizado e controlado. / Ricardo Augusto Silva. – Presidente Prudente, 2018.

46f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2018.

Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

1. Prebióticos. 2. Probióticos 3. Simbióticos. I. Título.

**RICARDO AUGUSTO SILVA**

**ALIMENTOS FUNCIONAIS ATENUAM EFEITOS TÓXICOS CRÔNICOS DO TABAGISMO PASSIVO EM PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, NUTRICIONAIS E HISTOPATOLÓGICOS DO PULMÃO DE RATOS: UM ESTUDO ALEATORIZADO E CONTROLADO**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestrado - Área de Concentração: Ciência Animal.

Presidente Prudente, 21 de Novembro de 2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Hermann Bremer Neto  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente - SP

---

Prof. Dr. Osimar Sanches  
Universidade de Santo Amaro - UNISA  
São Paulo - SP

---

Profa. Dra. Rogéria Keller  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente - SP

## DEDICATÓRIA

À Deus que sempre se fez presente realizando coisas que muitas vezes eram impossíveis e me fez chegar até aqui.

À minha filha Júlia Keiko Yanagida Silva a qual todo meu esforço e todas as horas da minha vida é dedicada

À minha namorada Danielle Magalhães que me apoia e aguenta meu mal humor;

Aos meus pais que sempre me apoiaram direta e indiretamente na minha vida e lutaram da forma que podiam pra me ajudar, agradeço a vocês pelo amor e carinho por mim dedicado, pois vocês são a minha base;

Aos meus amigos Marcos (Zé Gotinha), Heliard (Afrodescendente), Adriano (PG), que me ajudaram e muito no meu trabalho;

À professora Rogéria Keller, pela ajuda na conquista dessa etapa;

Principalmente ao meu orientador Prof. Dr. Hermann Bremer Neto por toda paciência e ajuda desprendida durante esse tempo.

Obrigado por tudo!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pois ele é a razão de ter chegado até aqui.

Aos meus pais, pois foram eles que sempre motivaram o meu crescimento.

A minha esposa e filha porque estiveram ao meu lado nas horas difíceis ajudando nessa caminhada.

E ao meu orientador Prof. Dr. Hermann Bremer Neto que me ajudou muito e me fez crescer profissionalmente.

A todos os colegas e funcionários do Mestrado em Ciência Animal.

*"Ninguém baterá tão forte quanto à vida. Porém, não se trata de quão forte pode bater, se trata de quão forte pode ser atingido e continuar seguindo em frente. É assim que a vitória é conquistada."*

*Não importa o quanto você bate, mas sim o quanto aguenta apanhar e continuar.*

*(Rocky Balboa)*

## RESUMO

### **Alimentos funcionais atenuam efeitos tóxicos crônicos do tabagismo passivo em parâmetros fisiológicos, nutricionais e histopatológicos do pulmão de ratos: um estudo aleatorizado e controlado**

O tabagismo passivo é uma das principais causas de doenças evitáveis. Alimentos funcionais têm sido sugeridos como uma abordagem alternativa para prevenir efeitos deletérios de inúmeras doenças crônicas. O objetivo foi avaliar os efeitos da suplementação de probiótico, prebiótico e simbiótico suplementados na dieta de ratos na fase crescimento expostos cronicamente a fumaça de cigarro, através de parâmetros nutricionais, fisiológicos e histopatológicos do pulmão. Noventa e seis ratos machos foram aleatoriamente agrupados em oito grupos (n=12): Controle; Controle Tabagista; Probiótico; Probiótico Tabagista; Prebiótico; Prebiótico Tabagista; Simbiótico; Simbiótico Tabagista. O experimento durou 189 dias, sendo 5 dias de adaptação e 184 dias experimental à estratégia de manejo e exposição a fumaça do cigarro ou ventilação forçada de ar. Aos 210 dias de idade, os ratos foram anestesiados, pesados, sacrificados, colhidos e pesados os pulmões e fixados em formalina tamponada e corados com hematoxilina e eosina. Os resultados dos parâmetros nutricionais e fisiológicos foram submetidos ao teste one-way ANOVA, com contrastes pelo método de Tukey e os histopatológicos, escores, ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido das comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls a 5% de significância. O grupo controle tabagista diferiu significativamente ( $P < 0,05$ ) dos demais grupos em todos os parâmetros analisados: ganho de peso e peso final, consumo de água e dieta, peso relativo pulmonar e alterações histopatológicas: inflamação perivascular; inflamação peribronquial, inflamação parenquimal, congestão vascular intraparenquimatosa, trombose vascular intraparenquimatosa, proliferação epitelial respiratória, agregação nodular, destruição alveolar, alterações enfisematosas, macrófagos alveolares, depósito intersticial contendo macrófagos e espessura da parede vascular. A suplementação dos alimentos funcionais atenuou os efeitos deletérios da exposição crônica da fumaça do cigarro observados em todos os parâmetros analisados. Nossos resultados demonstraram que a exposição crônica à fumaça do cigarro causou sérios danos aos parâmetros nutricionais, fisiológicos e histopatológicos pulmonar nos ratos em fase de crescimento. A suplementação dos alimentos funcionais foi benéfica e atenuou os efeitos deletérios do tabagismo passivo em ratos, como modelo experimental.

**Palavras-chave:** Prebióticos. Probióticos. Simbióticos.



## ABSTRACT

### **Functional foods attack chronic toxic effects of passive tobacco in physiological, nutritional and histopathological parameters of rat lung: a randomized and controlled study**

Passive smoking is one of the leading causes of preventable diseases. Functional foods have been suggested as an alternative approach to prevent deleterious effects of numerous chronic diseases. The aim of this study was to evaluate the effects of probiotic, prebiotic and symbiotic supplementation in the diet of chronically exposed rats on cigarette smoke, through nutritional, physiological and histopathological parameters of lung tissue. Ninety-six male rats were randomly grouped into eight groups (n = 12): Control; Smoking Control; Probiotic; Probiotic Smoking; Prebiotic; Prebiotic Tobacco; Symbiotic; Smoking symbiote. The experiment lasted 189 days, with 5 days of adaptation and 184 days experimental to the strategy of handling and exposure to cigarette smoke or forced air ventilation. At 210 days of age, rats were anesthetized, weighed, sacrificed, harvested and weighed lungs and fixed in buffered formalin and stained with hematoxylin and eosin. The results of the nutritional and physiological parameters were submitted to the one-way ANOVA test, with Tukey method contrasts and histopathological scores, non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by multiple Student-Newman-Keuls comparisons at 5% of significance. The smoking control group differed significantly ( $P < 0.05$ ) from the other groups in all analyzed parameters: weight gain and final weight, water and diet consumption, relative lung and histopathological weight: perivascular inflammation; peripronchial inflammation, parenchymal inflammation, intraparenchymal vascular congestion, intraparenchymal vascular thrombosis, respiratory epithelial proliferation, nodular aggregation, alveolar destruction, emphysematous changes, alveolar macrophages, interstitial deposit containing macrophages and vascular wall thickness. Supplementation of functional foods attenuated the deleterious effects of chronic exposure to cigarette smoke observed in all parameters analyzed. Our results demonstrated that chronic exposure to cigarette smoke caused serious damage to the nutritional, physiological and histopathological parameters of the lungs in the growing phase. Functional food supplementation was beneficial and attenuated the deleterious effects of passive smoking in rats as an experimental model.

**Keywords:** Prebiotics. Probiotics. Symbiotics.

## SUMÁRIO

<b>1 ARTIGO.....</b>	<b>09</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>19</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>20</b>

## 1 ARTIGO

### **Alimentos funcionais atenuam efeitos tóxicos crônicos do tabagismo passivo em parâmetros fisiológicos, nutricionais e histopatológicos do pulmão de ratos: um estudo aleatorizado e controlado**

Ricardo Augusto Silva<sup>1</sup>; Larissa Elvira Pauka Santana<sup>2</sup>; Leticia Rocha Magalhães<sup>2</sup>; Marcos Natal Rufino<sup>1</sup>; Heliard Caetano Rodrigues<sup>1</sup>; Osimar Sanches<sup>3</sup>; Hermann Bremer-Neto<sup>1</sup>

1 Departamento de Ciências Funcionais, Faculdade de Medicina; Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente – SP, Brasil

2 Graduando da Medicina, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente – SP, Brasil

3 Departamento de Patologia, Universidade Santo Amaro – UNISA, São Paulo – SP, Brasil

#### **Resumo**

O tabagismo passivo é uma importante causa de aumento de mortalidade e morbidade nos países desenvolvidos e a prevalência também está aumentando no mundo em desenvolvimento. Alimentos funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico têm sido sugeridos como uma abordagem alternativa para aliviar ou prevenir os efeitos deletérios de inúmeras doenças crônicas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de probiótico, prebiótico e simbiótico suplementados na dieta de ratos expostos cronicamente a fumaça de cigarro, através de parâmetros nutricionais, fisiológicos e histopatológicos do pulmão. Noventa e seis ratos machos foram aleatoriamente agrupados em oito grupos (n=12): Controle (C); Controle Tabagista (CS); Probiótico (Pro); Probiótico Tabagista (ProS); Prebiótico (Pre); Prebiótico Tabagista (PreS); Simbiótico (Sym); Simbiótico Tabagista (SymS). Aos 210 dias de idade, os ratos foram anestesiados, pesados, sacrificados, coletados e pesados os pulmões e fixados em formalina tamponada e corados com hematoxilina e eosina. Os resultados dos parâmetros nutricionais e fisiológicos foram submetidos ao teste one-way ANOVA, com contrastes pelo método de Tukey e os histopatológicos, ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido das comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls a 5% de significância. O grupo S diferiu significativamente ( $P < 0,05$ ) dos demais grupos em todos os parâmetros analisados: ganho de peso e peso final, consumo de água e dieta, peso relativo dos pulmões e histopatológicos: inflamação perivascular; inflamação peribronquial, inflamação parenquimal, congestão vascular intraparenquimatosa, trombose vascular intraparenquimatosa, proliferação epitelial respiratória, agregação nodular, destruição alveolar, alterações enfisematosas, macrófagos alveolares, depósito intersticial contendo macrófagos e espessura da parede vascular. Os resultados demonstraram que a exposição crônica à fumaça do cigarro causou sérios danos aos parâmetros nutricionais, fisiológicos e histopatológicos dos pulmões nos ratos em fase de crescimento.

**Palavras chave:** cigarro, toxicidade, probiótico, prebiótico e simbióticos.

**Abstract**

Passive smoking is an important cause of increased mortality and morbidity in developed countries and prevalence is also increasing in the developing world. Functional, probiotic, prebiotic and symbiotic foods have been suggested as an alternative approach to alleviate or prevent the deleterious effects of numerous chronic diseases. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of probiotic, prebiotic and symbiotic supplementation in the diet of chronically exposed rats to cigarette smoke, through nutritional, physiological and histopathological parameters of lung tissue. Ninety-six male rats were randomly grouped into eight groups (n = 12): Control (C), fed basal diet (DB); Control Tobacco (S), DB + exposed to cigarette smoke (S); Probiotic (Pro), DB + Probiotic (Pro); Probiotic Smoker (ProS), DB + Pro + S; Prebiotic (Pre), DB + prebiotic; Prebiotic Tobacco (PreS) DB + Pre + S; Symbiotic (Sym), DB, Pro + Pre; The experiment lasted 189 days, with 5 days of adaptation and 184 days of experimentation in the management strategy and exposure to cigarette smoke (adaptation: 10 minutes / day and experimental: 1 hour / day) or forced air ventilation (placebo). At 210 days of age, rats were anesthetized, weighed, killed, harvested and weighed lungs and fixed in buffered formalin and stained with hematoxylin and eosin. The results of the nutritional and physiological parameters were submitted to the one-way ANOVA test, with Tukey method contrasts and histopathological scores, non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by multiple Student-Newman-Keuls comparisons at 5% of significance. Group S differed significantly ( $P < 0.05$ ) from the other groups in all analyzed parameters: weight gain and final weight, water and diet consumption, relative lung and histopathological weight: perivascular inflammation; peripronchial inflammation, parenchymal inflammation, intraparenchymal vascular congestion, intraparenchymal vascular thrombosis, respiratory epithelial proliferation, nodular aggregation, alveolar destruction, emphysematous alterations, alveolar macrophages (n), interstitial deposit containing macrophages and vascular wall thickness. Supplementation of functional foods attenuated the deleterious effects of chronic exposure to cigarette smoke observed in all parameters analyzed. Our results demonstrated that chronic exposure to cigarette smoke caused serious damage to the nutritional, physiological and histopathological parameters of the lungs in the growing phase. Functional food supplementation was beneficial and attenuated the deleterious effects of passive smoking in rats as an experimental model.

**Keywords:** cigarette, toxicity, probiotic, prebiotic, and symbiotic.

## Introdução

O tabagismo é uma preocupação global devido ao impacto na saúde pública e uma das principais causas de mortes evitáveis (WHO, 2014, 2018). Estima-se em US \$ 422 bilhões o custo global anual dos serviços de saúde associados ao tabagismo, equivalente a US\$ 56,34 por pessoa. Isso representa 5,7% do gasto total em saúde no mundo (UNITED STATES NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2016). A exposição à fumaça do cigarro (tabagismo passivo) causa grandes malefícios a saúde aumentando o risco de adquirir doenças respiratórias e cardiovasculares crônicas (WHO, 2015).

A fumaça do cigarro contém mais de 4000 compostos químicos prejudiciais, dos quais 200 são muito tóxicos. Esses compostos são responsáveis pelo recrutamento de agentes e células inflamatórias e pela formação de oxidantes, induzindo estresse oxidativo e a oxidação de proteínas e grupos tiol (BARREIRO et al., 2010; WIECZFINSKA et al., 2018). Metais tóxicos como alumínio, cádmio, cromo, cobre, chumbo, mercúrio, níquel e zinco são encontrados no tabaco, papel de cigarro, filtros e fumaça de cigarro e alteram a homeostase de metais no corpo humano, desempenhando um papel crucial na gênese de várias doenças (BERNHARD; ROSSMANN; WICK, 2005; NAIR et al., 2013; SMITH; LIVINGSTON; DOOLITTLE, 1997).

Microrganismos classificados como probióticos têm sido sugeridos como uma abordagem alternativa para aliviar ou prevenir os efeitos deletérios dos metais pesados, pois demonstraram efeitos benéficos em estudos pré-clínicos e laboratoriais quando isolados ou em associação, em quantidade e frequência apropriada (MISHRA et al., 2012; MONACHESE; BURTON; REID, 2012; YOUNAN et al., 2016, 2018), devido à sua atividade antioxidante (SINGH; GUPTA; GUPTA, 2007), sequestrante de radicais livres (GETOFF, 2007) e atenuador dos efeitos tóxicos da contaminação de metais (SUN; BROCATO; COSTA, 2015).

Prebióticos suplementados na dieta demonstraram efeito benéfico na saúde do hospedeiro através de diferentes mecanismos, incluindo o crescimento seletivo de bactérias nativas da microbiota intestinal, principalmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, aumento da produção local de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), notavelmente acetato, butirato e propionato, inibição de citocinas pró-inflamatórias, modulação do metabolismo lipídico, aumento da capacidade de absorção do cálcio e melhora do sistema imunológico (MORAES; COLLA, 2006; RUFINO et al., 2018; VAN LOO et al., 2005). O efeito dos simbióticos está associado à combinação individual de probiótico e prebiótico (DE VRESE; SCHREZENMEIR, 2008).

Não há estudos na literatura utilizando o prebiótico, mananoligossacarídeo, ou essa associação de microrganismos probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium longum*) isoladamente ou associados (simbiótico) em ratos expostos cronicamente a fumaça de cigarro e avaliados através de parâmetros fisiológicos, nutricionais e histopatológicos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de alimentos funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico, suplementados na dieta de ratos expostos cronicamente a fumaça de cigarro, através de parâmetros nutricionais, fisiológicos e histopatológicos do tecido pulmonar.

## Material e métodos

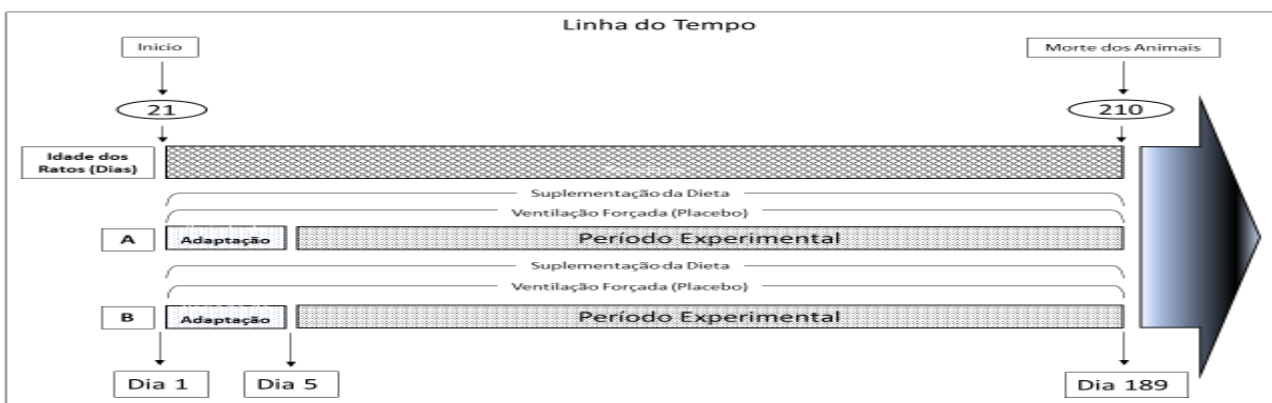
### Animais e cuidados com os animais

Todos os ratos utilizados neste estudo foram provenientes do Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista (Presidente Prudente, São Paulo, Brasil). A dieta basal foi formulada para atender às necessidades nutricionais dos ratos de acordo com os padrões NRC (Tabela 1) (HAN et al., 2016) e água potável da torneira (Cidade de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil), a vontade, exceto durante os períodos de exposição.

Noventa e seis ratos Wistar machos em fase de crescimento (*Rattus norvegicus albinus*), com massa corpórea inicial média de  $46,3 \pm 2,6$  g, 21 dias de idade, foram alojados em gaiolas coletivas com quatro animais cada, durante o período experimental de 189 dias. Os animais foram alojados em caixas de animais com ciclos de 12 h de luz / 12 h escuro a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade  $55 \pm 10\%$  e média de trocas de ar de 15 trocas/hora.

Ocultação da alocação, estratégia de manejo e tratamentos dos animais foi realizada para reduzir viés no estudo (MA et al., 2017). O experimento durou 189 dias, sendo 5 dias de adaptação e 184 dias experimental à estratégia de manejo e a exposição a fumaça do cigarro e alimentação com dietas basal e ou experimentais (Tabela 1 e Figura 1).

O estudo foi conduzido em conformidade com os princípios éticos da Declaração Universal dos Direitos Animais da Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO). O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Estudos em Animais da instalação de teste antes do início do experimento, sob o protocolo nº 3620.



**Figura 1:** Representação gráfica da linha do tempo: Grupos: A= Grupos não expostos a fumaça do cigarro; B = Grupos expostos a fumaça do cigarro. Tratamentos: C: dieta basal; Pro: dieta basal suplementada com 2 g de probióticos [*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* and *Bifidobacterium longum* ( $2-5 \cdot 10^9$  UFC cada)]; Pre: dieta basal suplementada com 1g de mananoligossacarídeo (fração activa,  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,6 derivada de um mananoligossacarídeo, apresentando 30% de  $\alpha$ -mananos, derivados de cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* ); Sym: dieta basal suplementada com 2 g Probióticos e 1 g Prebiótico; CS: dieta basal + protocolo tabagismo passivo; ProS: dieta basal suplementada com 2 g probiótico + protocolo tabagismo passivo; PreS: dieta basal suplementada com 1g prebiótico + tabagismo passivo; e SymS: dieta basal suplementada com 2 g probiótico + 1 g prebiótico + protocolo tabagismo passivo.

### Desenho do estudo

Os animais foram aleatoriamente agrupados por meio de uma tabela de seqüências geradas pelo programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016) e distribuídos em oito grupos experimentais (n=12), os quais foram alimentados com: Controle (C), dieta basal; Probiótico (Pro), dieta basal suplementada com 20 g Kg<sup>-1</sup> de uma associação de microrganismos probióticos [*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium longum* (2–5 10<sup>9</sup> UFC cada) (Brazilian Enterprise to Increase Livestock Productivity – Embrapec, Paranavaí – PR, Brasil)]; Prebiótico (Pre), dieta basal suplementada com 10 g Kg<sup>-1</sup> de prebiótico [mananoligossacarídeo (MOS), composto da fração activa  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,6, apresentando 30% de  $\alpha$ -mananos e derivado de cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*]; Simbiótico (Sym), dieta basal suplementada com 20 g Kg<sup>-1</sup> de uma associação de microrganismos probióticos e 10 g Kg<sup>-1</sup> de prebiótico; Controle Tabagista (CS), dieta basal e submetidos ao protocolo de exposição a fumaça de cigarro; Probiótico Tabagista (ProS), dieta basal suplementada com 20 g Kg<sup>-1</sup> de uma associação de microrganismos probióticos e submetidos ao protocolo de exposição a fumaça do cigarro; Prebiótico Tabagista (PreS), dieta suplementada com 10 g Kg<sup>-1</sup> de prebiótico e submetidos ao protocolo de exposição a fumaça do cigarro; e Simbiótico (SymS), dieta basal suplementada com 20 g Kg<sup>-1</sup> de uma associação de microrganismos probióticos e 10 g Kg<sup>-1</sup> de prebiótico e submetidos ao protocolo de exposição a fumaça do cigarro.

**Tabela 1.** Composição dos ingredientes e nutrientes das dietas basal e experimentais.

Ingredientes (g)	Dieta basal e experimentais			
	Basal	Prob	Pre	Sym
Farelo de milho	82.95	82.95	82.95	82.95
Óleo de Soja	7.00	7.00	7.00	7.00
L-Cisteína	0.30	0.30	0.30	0.30
Celulose	5.00	3.00	4.00	2.00
Cloreto de Sódio	0.25	0.25	0.25	0.25
Vitamina mix*	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral mix**	3.50	3.50	3.50	3.50
Probiótico***	0.00	2.00	0.00	2.00
Prebiótico****	0.00	0.000	1.00	1.00
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

\* Vitamina mix/Kg: Ácido nicotínico, 30 mg; Pantotenato, 15 mg; Piridoxina, 6 mg; Tiamina, 5 mg; Riboflavina, 6 mg; Ácido fólico, 2 mg; Biotina, 0,2 mg; Vitamina B12, 25 mg; Vitamina E, 75UI; Vitamina A, 4000 UI; Vitamina D3, 1000 UI; Vitamina K, 900 mg; Colina, 1000 mg. \*\* Mineral mix mg/Kg: Cálcio, 5000; Fósforo, 1,561; Potássio, 3600; Enxofre, 300; Sódio, 1019; Cloro, 1,574; Magnésio, 507; Ferro, 35; Zinco, 30; Manganês, 10; Cobre, 6; Iodo, 0,2; Molibdênio, 0,15; Selênio, 0,15. \*\*\* *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium longum* (2–5 10<sup>9</sup> UFC cada). \*\*\*\* Mananoligossacarídeo (MOS), composto da fração activa  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,6, apresentando 30% de  $\alpha$ -mananos e derivado de cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

### *Cigarro e geração da fumaça*

No período de adaptação e experimental foram utilizados cigarros de marca comercial (Tabacalera del Este S.A., Hernandarias, Paraguai) e apresentou valores de alcatrão, nicotina e CO de 10 mg/cigarro, 0,8 mg/cigarro de nicotina e 10 mg/cigarro de monóxido de carbono, respectivamente, segundo ISO (International Organization for Standardization) 3402. Os cigarros foram fumados em conformidade com a norma ISO 4387. Os métodos de condicionamento a exposição e geração de fumaça foram realizados conforme descritos por Tsuji et al. (2013).

### *Caracterização da atmosfera de exposição à fumaça*

As concentrações de material particulado total úmido (WTPM) e monóxido de carbono (CO) foram monitoradas via monitor de aerossol em tempo real (RAM; Microdust, Pro; Casella, Amherst, NH, EUA) e monitor de CO (TxiPro® - BioSystems Diagnostics Pvt. Ltd., EUA), respectivamente. O coeficiente de variação (% CV) da concentração de exposição (WTPM) estava dentro de  $\pm 10\%$  por análise gravimétrica usando filtro de fibra de vidro Cambridge 47 mm (Performance Systematix Inc., Grand Rapids, MI, EUA). As concentrações reais médias de exposição foram calculadas a partir da massa coletada nos filtros e o volume total de ar extraído pelos filtros (TSUJI et al., 2013).

A temperatura e a umidade da atmosfera de exposição foram medidas diariamente a partir de uma porta de exposição animal representativa para cada grupo de exposição (Vaisala Inc., Woburn, MA, EUA).

### *Protocolo e período de exposição ao tabagismo passivo*

Durante cinco dias, período de adaptação, os animais dos grupos CS, ProS, PreS e SymS foram expostos diariamente à fumaça do cigarro numa câmara, com temperatura controlada de 22°C, por um período de 10 minutos e os grupos C, Pro, Pre e Sym foram expostos ao ar filtrado pelo mesmo período. Após esse período, iniciou o período experimental de 184 dias, no qual os grupos CS, ProS, PreS e SymS foram expostos à fumaça de cigarro por 60 minutos diários, 30 minutos no período da manhã (7:00 h) e 30 minutos no período da tarde (19:00 h), cinco dias por semana e os grupos C, Pro, Pre e Sym foram expostos ao ar filtrado pelo mesmo período de tempo e períodos do dia. A concentração média da fumaça do cigarro foi ajustada diariamente para conter 350 partes por milhão (ppm) de monóxido de carbono (CO) durante o período de exposição (TxiPro® - BioSystems Diagnostics Pvt. Ltda, EUA) (KOZMA et al., 2014).

Os ratos foram observados duas vezes por dia antes e depois da exposição para mortalidade e morbidade ao longo de cada teste. O peso corporal individual foi medido antes da exposição (todos os grupos), semanalmente e no dia da eutanásia.



### *Necropsia e histopatologia*

Aos 210 dias de idade, todos os ratos foram anestesiados (Thiopentax, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, São Paulo, Brasil) e após serem sacrificados por exsanguinação foi feita abertura ampla da caixa torácica e os pulmões foram retirados, pesados e fixados em 10% de formalina tamponada neutra (NBF). O pulmão foi perfundido com 10% de NBF a 25 cm de pressão hidrostática após ser pesado (PAIVA; MAFFILI; SANTOS, 2005).

Após 48 horas de fixação, os pulmões foram seccionados em fragmentos menores, lavados em água corrente, e processados conforme a técnica para inclusão em parafina. Em seguida foi obtido cortes com espessura de 4-5  $\mu\text{m}$ , os quais foram corados com Hematoxilina e Eosina (HxE) conforme Dogan et al. (2011). e as imagens foram obtidas com o auxílio de câmera digital de definição, modelo Leica ICC50 (Leica Microsystems, Inglaterra), acopladas em um microscópio Leica DM 750 (Leica, Microsystems, Inglaterra).

As imagens microscópicas foram avaliadas por dois patologistas através de estudo cego à natureza das lâminas, que classificaram os achados em escores, conforme o protocolo adaptado de Gokakin et al. (2013). Avaliaram-se os seguintes parâmetros: inflamação perivascular; inflamação peribronquial; inflamação parenquimal; congestão vascular; trombose vascular intraparenquimatosa; proliferação epitelial respiratória; agregação nodular; destruição alveolar; alterações enfisematosas; macrófagos alveolares; depósito intersticial contendo macrófagos; e espessura da parede vascular. A pontuação dada variou de Ausente (0), Leve (1), Moderada (2) a Intensa (3) em cada critério. Um escore médio para cada uma das variáveis foi então calculado. Um escore histopatológico total (máximo 36) foi derivado da soma dos escores médios das 12 variáveis (Tabela 2). Todas as amostras foram analisadas e revisadas para obter pontuação correta e valor médio de cada grupo e os resultados foram utilizados para análise estatística. Os escores, grau da inflamação e destruição alveolar foram pontuados para cada grupo (Tabela 2).

### *Parâmetros fisiológicos e nutricionais*

Foram avaliados para cada animal testado: peso inicial (g), peso final (g), ganho de peso diário (g/dia), ingestão relativa de ração diária (g/100 g PC/ dia), média da ingestão de água diária (mL/100 g PC/ dia) e peso relativo do pulmão (%).

### *Análise Estatística*

Os parâmetros nutricionais e fisiológicos são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Para determinar se os grupos experimentais diferiam entre eles, utilizou-se o teste one-way ANOVA, com contrastes pelo método de Tukey.

Os dados histopatológicos em escores, foram submetidos à análise da normalidade pelo teste de Shapiro Wilk e não apresentou normalidade, e, portanto, optou-se pelo uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido das comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. Todos os testes estatísticos foram realizados com 5% de significância. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa Statistical Package for the Social Sciences for Windows (SPSS version 15.0, Chicago, IL., USA).

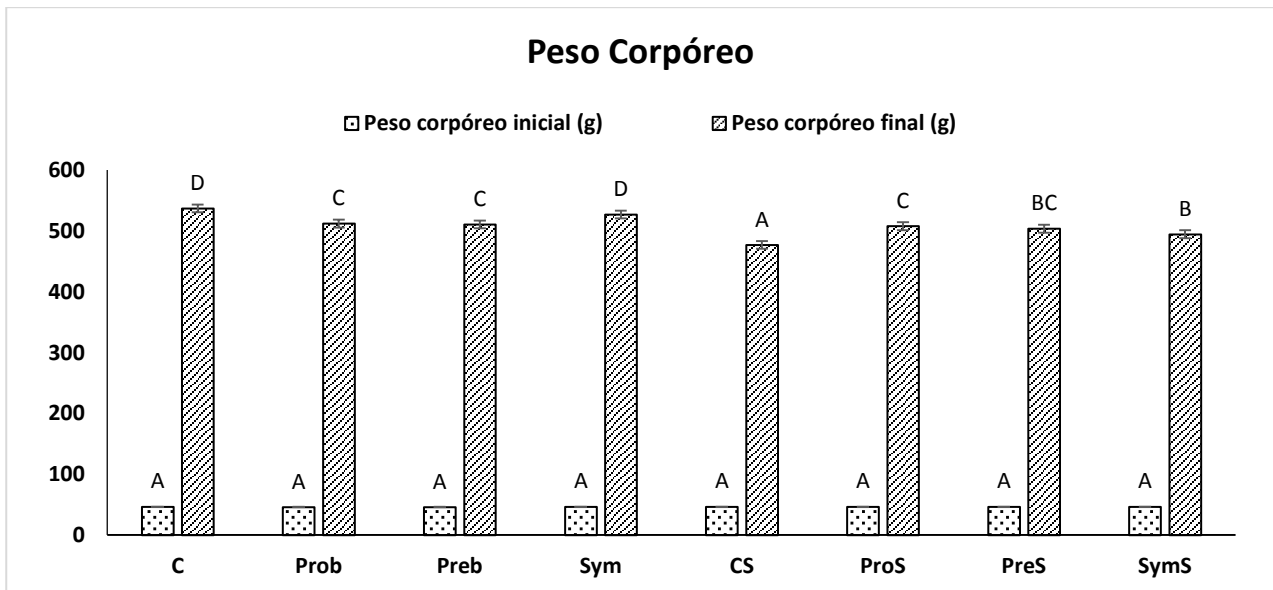
Tabela 2. Parâmetros histopatológicos analisados

Lesão patológica	Valores
Inflamação perivascular	3
Inflamação peribronquial	3
Inflamação parenquimal	3
Congestão vascular intraparenquimatosa	3
Trombose vascular intraparenquimatosa	3
Proliferação epitelial respiratória	3
Agregação nodular	3
Destrução alveolar	3
Alterações enfisematosas	3
Macrófagos alveolares	3
Depósito intersticial contendo macrófagos	3
Espessura da parede vascular	3
Total	36

\* Escores: 0: ausência; 1 - alteração leve (1 a 3 campos); 2 - alteração moderada (4 a 6 campos); e 3 - alteração acentuada (> 6 campos).

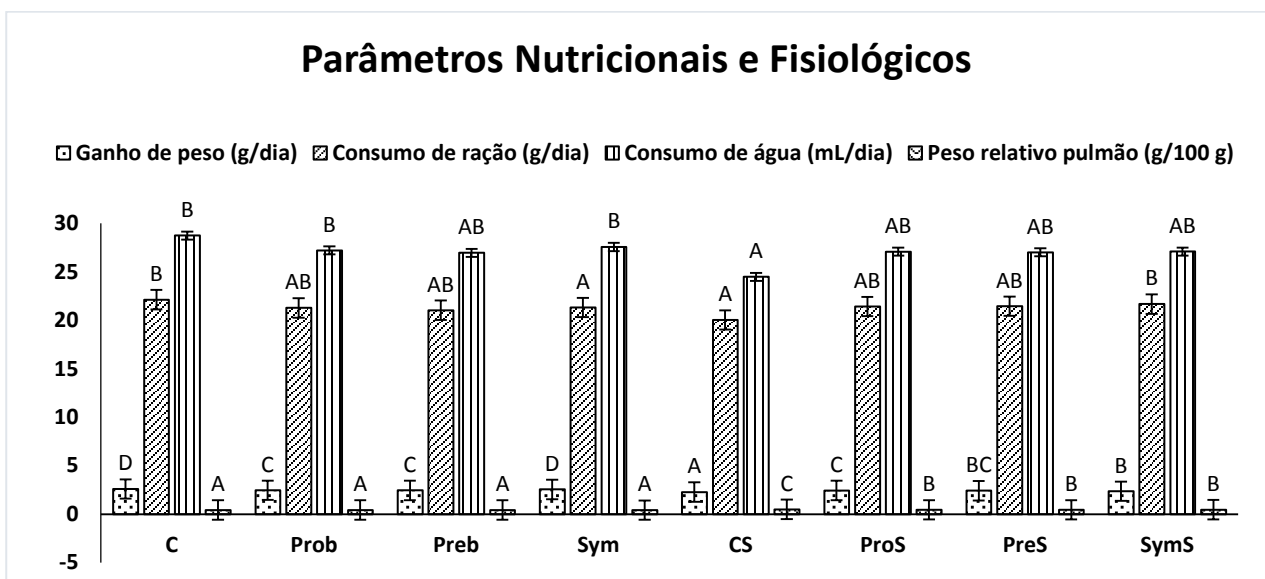
## Resultados

A atmosfera de exposição à fumaça do cigarro foi bem controlada durante o estudo. Não houve remoção não programada devido à morte prematura ou condição moribunda após exposição crônica à fumaça do cigarro ou a ventilação do ar. Imediatamente após a exposição, os animais do grupo CS exibiram atividade locomotora diminuída, marcha atáxica, respiração irregular, náusea e ruído nasal detalhar mais. Esses sinais desapareceram até o próximo período de exposição. Os grupos suplementados com alimentos funcionais e expostos a fumaça do cigarro, ProS, PreS e SymS, apresentaram uma discreta respiração irregular e ruído nasal. Os ratos expostos a fumaça do cigarro ganharam menos peso e pesaram significativamente menos ( $P < 0,05$ ) do que o controle exposto à ventilação forçada. Os resultados dos grupos suplementados com alimentos funcionais e expostos a fumaça do cigarro revelaram maior ganho de peso e peso corpóreo final em relação ao grupo CS (Tabela 3 e Figuras 2 e 3).



**Figura 2.** Parâmetros fisiológicos de ratos machos na fase de crescimento alimentados com dietas incorporadas com probiótico, prebiótico e simbiótico e expostos cronicamente a fumaça do cigarro. Os valores são expressos como médias  $\pm$  SD (n=12). Letras maiúsculas indicam diferença estatística na linha entre os tratamentos. Anova one way, seguida de teste de Tukey (P<0,05).

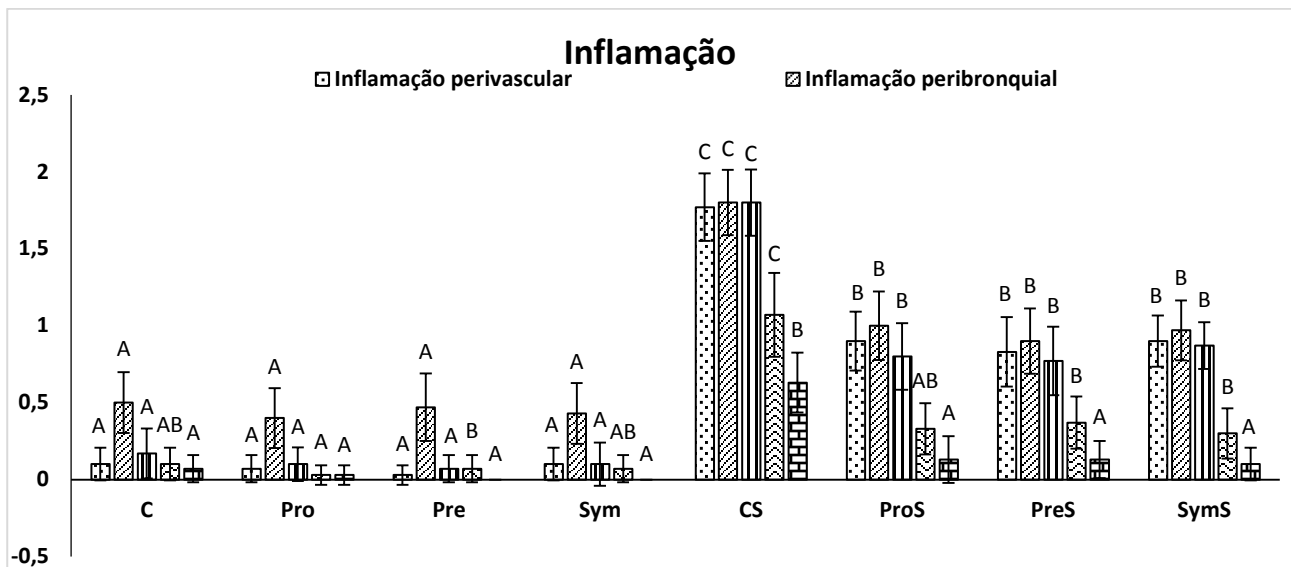
Os grupos Pro e Pre apresentaram uma diminuição do peso corporal em relação aos grupos C e Sym. Em relação à média dos pesos corporais do grupo C, os ratos do grupo Pro, Pre e Sym revelaram perda de aproximadamente 2-5% e os grupos fumantes, CS, ProS, PreS e SymS, apresentaram perda de 5-11%. A maior média da redução de peso, 11%, foi observada no grupo CS.



**Figura 3.** Efeito do tabagismo passivo crônico nos parâmetros nutricionais e fisiológicos de ratos na fase de crescimento alimentados com dietas suplementadas com probiótico, prebiótico e simbiótico. Os valores são

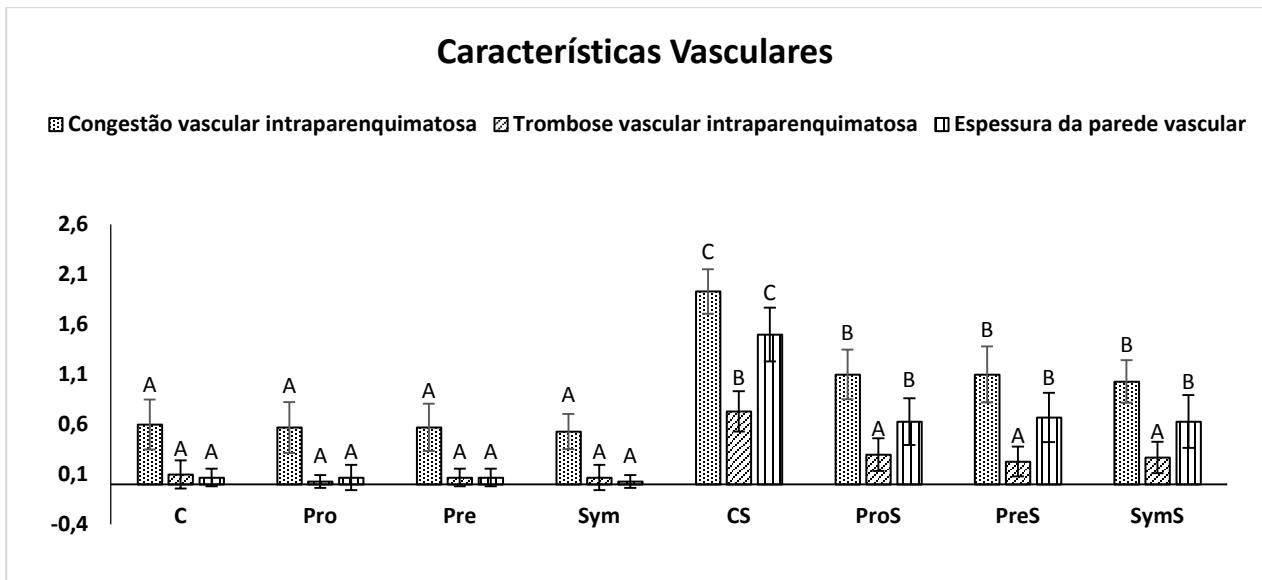
expressos como médias  $\pm$  SD (n=12). Letras maiúsculas indicam diferença estatística na linha entre os tratamentos. Anova one way, seguida de teste de Tukey (P<0,05).

A média do consumo da dieta e água foi reduzida em todos os grupos expostos a fumaça de cigarro, no entanto essa diferença não foi significativa (P>0,05) nos grupos suplementados com alimentos funcionais, quando comparados com a média do grupo controle. Os grupos suplementados com alimentos funcionais e submetidos à ventilação com ar não diferiram do grupo controle (P>0,05). A média do peso relativo dos pulmões (g/100g) foi significativamente maior (P<0,05) do grupo CS em relação aos demais grupos expostos ou não a fumaça do cigarro. Os grupos suplementados com os alimentos funcionais e expostos a fumaça diferiram (P<0,05) dos grupos expostos à ventilação do ar e suplementados ou não com alimentos funcionais (Figura 3).

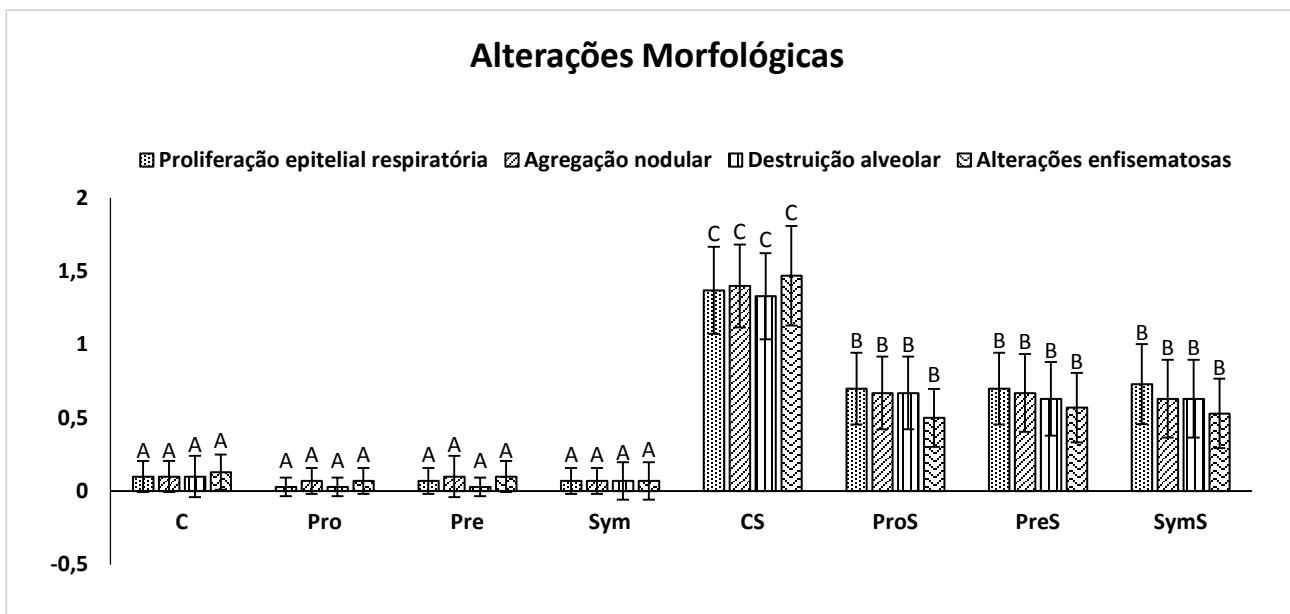


**Figura 4.** Efeito do tabagismo passivo crônico do processo inflamatório dos pulmões de ratos na fase de crescimento alimentados com dietas suplementadas com probiótico, prebiótico e simbiótico. Os valores são expressos como médias  $\pm$  SD (n=12). Letras maiúsculas indicam diferença estatística na linha entre os tratamentos. Anova one way, seguida de teste de Tukey (P<0,05).

O grupo CS (exposto à fumaça do tabaco) diferiu (P<0,05) do C (exposto à ventilação do ar) em todos os parâmetros histopatológicos analisados: inflamação perivascular; inflamação peribronquial; inflamação parenquimal; congestão vascular intraparenquimatosa; trombose vascular intraparenquimatosa; proliferação epitelial respiratória; agregação nodular; destruição alveolar; alterações enfisematosas; macrófagos alveolares (n); depósito intersticial contendo macrófagos; e espessura da parede vascular (Tabela 4).



**Figura 5.** Efeito do tabagismo passivo crônico nas alterações vasculares de ratos na fase de crescimento alimentados com dietas suplementadas com probiótico, prebiótico e simbiótico. Os valores são expressos como médias  $\pm$  SD (n=12). Letras maiúsculas indicam diferença estatística na linha entre os tratamentos. Anova one way, seguida de teste de Tukey (P<0,05).



**Figura 6.** Efeito do tabagismo passivo crônico nas alterações morfológicas de ratos na fase de crescimento alimentados com dietas suplementadas com probiótico, prebiótico e simbiótico. Os valores são expressos como médias  $\pm$  SD (n=12). Letras maiúsculas indicam diferença estatística na linha entre os tratamentos. Anova one way, seguida de teste de Tukey (P<0,05).

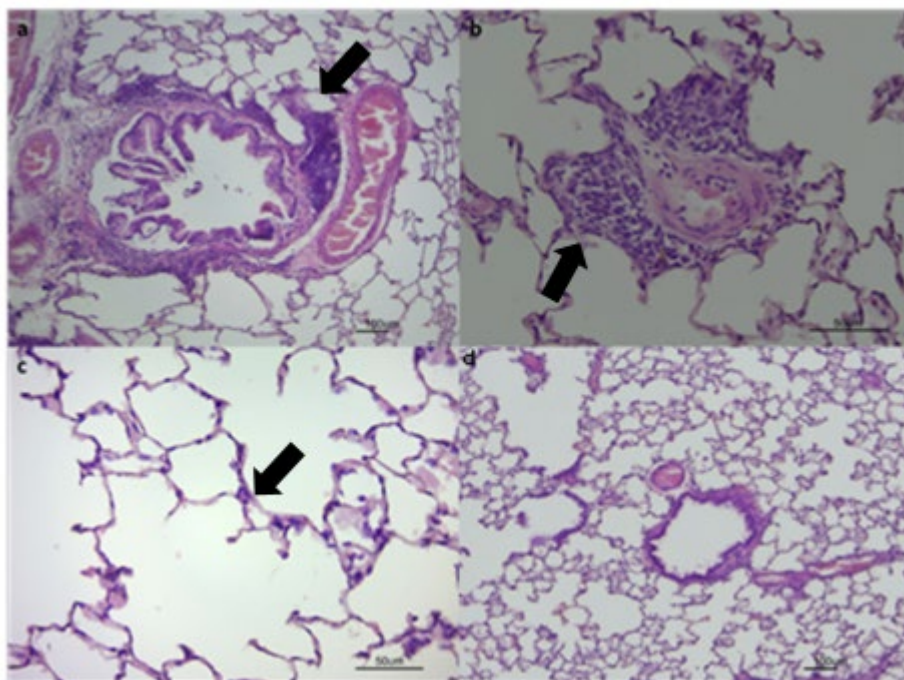
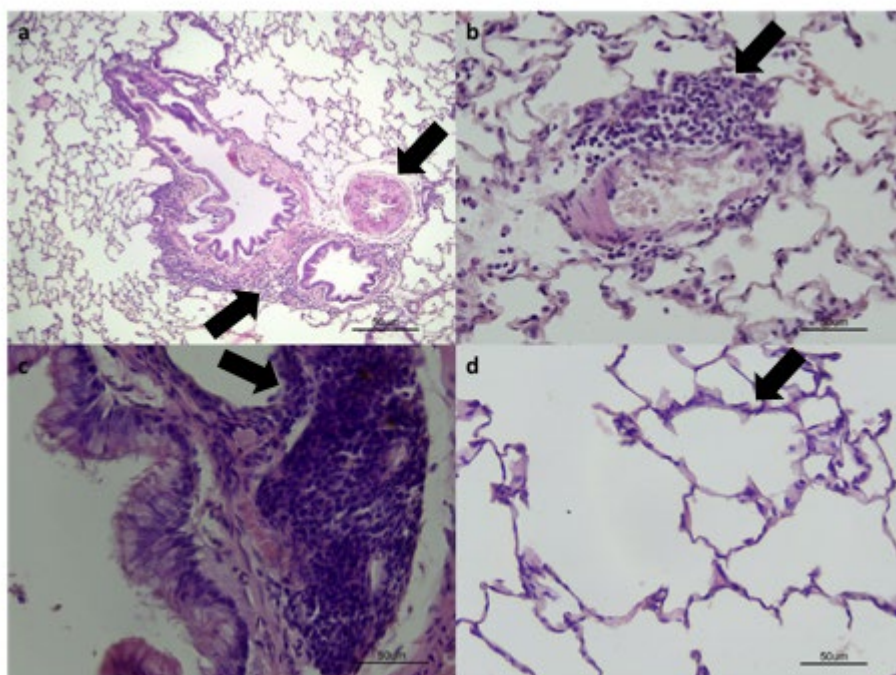


Figura 7. Fotomicrográfrica do pulmão dos grupos expostos à fumaça de cigarro e suplementados com alimentos funcionais: probiótico, prebiótico e simbiótico (Grupos ProS, PreS e SymS). (a) inflamação peribronquial (seta) (H & E, x100). (b) inflamação perivascular (seta) (H & E, x40). (c) enfisema pulmonar (seta) (H&E, x40) (d) enfisema pulmonar com ruptura alveolar (seta) (H&E, x100).

Os grupos C, Pro, Pre e Sym não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre si.



. Fotomicrográfica do pulmão dos grupos exposto à fumaça de cigarro (Grupo CS). (a) inflamação peribronquial e espessamento da parede vascular (seta) (H & E). (b) inflamação (seta) (H&E). (c) inflamação peribronquial (seta) (H&E) (d) enfisema pulmonar e espessamento da parede alveolar (seta) (H&E).

Além disso, os resultados revelaram que os grupos suplementados com alimentos e expostos cronicamente a fumaça de cigarro não diferiram ( $P > 0,05$ ) do grupo de ratos expostos somente à ventilação do ar.

Tabela 3. Parâmetros fisiológicos e nutricionais de ratos machos na fase de crescimento alimentados com dietas incorporadas com probiótico, prebiótico e simbiótico e expostos cronicamente a fumaça do cigarro.

Parâmetros	Grupo/tratamento*							
	C	Prob	Preb	Sym	CS	ProS	PreS	SymS
Peso corpóreo inicial (g)	46,56 ± 3,18 <sup>A</sup>	46,16 ± 2,70 <sup>A</sup>	46,01 ± 2,52 <sup>A</sup>	46,62 ± 3,22 <sup>A</sup>	46,52 ± 2,25 <sup>A</sup>	46,30 ± 2,68 <sup>A</sup>	46,35 ± 3,56 <sup>A</sup>	46,32 ± 2,94 <sup>A</sup>
Peso corpóreo final (g)	536,90 ± 10,41 <sup>D</sup>	511,93 ± 8,79 <sup>C</sup>	510,56 ± 8,81 <sup>C</sup>	526,90 ± 10,84 <sup>D</sup>	476,95 ± 9,34 <sup>A</sup>	507,84 ± 7,25 <sup>C</sup>	503,51 ± 11,13 <sup>BC</sup>	494,36 ± 12,36 <sup>B</sup>
Ganho de peso (g/dia)	2,59 ± 0,05 <sup>D</sup>	2,47 ± 0,04 <sup>C</sup>	2,45 ± 0,04 <sup>C</sup>	2,55 ± 0,06 <sup>D</sup>	2,28 ± 0,05 <sup>A</sup>	2,44 ± 0,04 <sup>C</sup>	2,42 ± 0,06 <sup>BC</sup>	2,37 ± 0,07 <sup>B</sup>
Consumo de ração (g/dia)	22,13 ± 0,12 <sup>B</sup>	21,28 ± 0,12 <sup>AB</sup>	21,04 ± 0,12 <sup>AB</sup>	21,32 ± 0,12 <sup>A</sup>	20,03 ± 0,11 <sup>A</sup>	21,43 ± 0,11 <sup>AB</sup>	21,46 ± 0,11 <sup>AB</sup>	21,68 ± 0,11 <sup>B</sup>
Consumo de água (mL/dia)	28,75 ± 3,91 <sup>B</sup>	27,22 ± 3,11 <sup>B</sup>	26,96 ± 3,26 <sup>AB</sup>	27,57 ± 2,45 <sup>B</sup>	24,49 ± 0,97 <sup>A</sup>	27,08 ± 2,74 <sup>AB</sup>	27,01 ± 3,28 <sup>AB</sup>	27,10 ± 3,16 <sup>AB</sup>
Peso relativo pulmão (g/100 g)	0,425 ± 0,013 <sup>A</sup>	0,428 ± 0,017 <sup>A</sup>	0,427 ± 0,011 <sup>A</sup>	0,421 ± 0,012 <sup>A</sup>	0,492 ± 0,014 <sup>C</sup>	0,451 ± 0,007 <sup>B</sup>	0,456 ± 0,012 <sup>B</sup>	0,462 ± 0,019 <sup>B</sup>

Os valores são médias ± SD de 12 animais em cada grupo. ANOVA one way, seguida de teste de Tukey (P<0,05). Letras minúsculas indicam diferença estatística na linha entre os tratamentos. \* C: grupo controle (dieta basal); Pro: dieta basal + 2 g probiótico [*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium longum* (2–5 10<sup>9</sup> UFC cada)]; Pre: dieta basal + 1 g prebiótico (fração activa, α-1,3 e α-1,6 derivada de um mananoligossacárideo, apresentando 30% de α-mananos, derivados de cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*); Sym: grupo simbiótico (dieta basal + 2 g probiótico + 1 g prebiótico); CS: grupo controle + protocolo tabagismo (PT); ProS: grupo probiótico + PT; PreS: grupo prebiótico + PT; SymS: grupo simbiótico + PT.



Tabela 4. Efeito do tabagismo passivo crônico no escore patológico dos pulmões de ratos alimentados com dietas suplementadas com probiótico, prebiótico e simbiótico.

Parâmetros histopatológicos <sup>a</sup>	Grupos / Tratamentos <sup>c</sup>							
	C	Pro	Pre	Sym	CS	ProS	PreS	SymS
Inflamação perivascular	0,10 ± 0,10 <sup>A</sup>	0,07 ± 0,08 <sup>A</sup>	0,03 ± 0,06 <sup>A</sup>	0,10 ± 0,10 <sup>A</sup>	1,77 ± 0,21 <sup>C</sup>	0,90 ± 0,19 <sup>B</sup>	0,83 ± 0,22 <sup>B</sup>	0,90 ± 0,16 <sup>B</sup>
Inflamação peribronquial	0,50 ± 0,20 <sup>A</sup>	0,40 ± 0,19 <sup>A</sup>	0,47 ± 0,21 <sup>A</sup>	0,43 ± 0,20 <sup>A</sup>	1,80 ± 0,21 <sup>C</sup>	1,00 ± 0,22 <sup>B</sup>	0,90 ± 0,21 <sup>B</sup>	0,97 ± 0,19 <sup>B</sup>
Inflamação parenquimal	0,17 ± 0,16 <sup>A</sup>	0,10 ± 0,10 <sup>A</sup>	0,07 ± 0,08 <sup>A</sup>	0,10 ± 0,14 <sup>A</sup>	1,80 ± 0,22 <sup>C</sup>	0,80 ± 0,22 <sup>B</sup>	0,77 ± 0,22 <sup>B</sup>	0,87 ± 0,15 <sup>B</sup>
Congestão vascular intraparenquimatosa	0,60 ± 0,25 <sup>A</sup>	0,57 ± 0,25 <sup>A</sup>	0,57 ± 0,23 <sup>A</sup>	0,53 ± 0,18 <sup>A</sup>	1,93 ± 0,22 <sup>C</sup>	1,10 ± 0,25 <sup>B</sup>	1,10 ± 0,27 <sup>B</sup>	1,03 ± 0,21 <sup>B</sup>
Trombose vascular intraparenquimatosa	0,10 ± 0,14 <sup>A</sup>	0,03 ± 0,06 <sup>A</sup>	0,07 ± 0,08 <sup>A</sup>	0,07 ± 0,12 <sup>A</sup>	0,73 ± 0,20 <sup>B</sup>	0,30 ± 0,16 <sup>A</sup>	0,23 ± 0,14 <sup>A</sup>	0,27 ± 0,15 <sup>A</sup>
Proliferação epitelial respiratória	0,10 ± 0,10 <sup>A</sup>	0,03 ± 0,06 <sup>A</sup>	0,07 ± 0,08 <sup>A</sup>	0,07 ± 0,08 <sup>A</sup>	1,37 ± 0,30 <sup>C</sup>	0,70 ± 0,24 <sup>B</sup>	0,70 ± 0,24 <sup>B</sup>	0,73 ± 0,27 <sup>B</sup>
Agregação nodular	0,10 ± 0,10 <sup>A</sup>	0,07 ± 0,08 <sup>A</sup>	0,10 ± 0,14 <sup>A</sup>	0,07 ± 0,08 <sup>A</sup>	1,40 ± 0,28 <sup>C</sup>	0,67 ± 0,28 <sup>B</sup>	0,67 ± 0,26 <sup>B</sup>	0,63 ± 0,26 <sup>B</sup>
Destruição alveolar	0,10 ± 0,14 <sup>A</sup>	0,03 ± 0,06 <sup>A</sup>	0,03 ± 0,06 <sup>A</sup>	0,07 ± 0,12 <sup>A</sup>	1,33 ± 0,29 <sup>C</sup>	0,67 ± 0,24 <sup>B</sup>	0,63 ± 0,25 <sup>B</sup>	0,63 ± 0,26 <sup>B</sup>
Alterações enfisematosas	0,13 ± 0,12 <sup>A</sup>	0,07 ± 0,08 <sup>A</sup>	0,10 ± 0,10 <sup>A</sup>	0,07 ± 0,12 <sup>A</sup>	1,47 ± 0,33 <sup>C</sup>	0,50 ± 0,20 <sup>B</sup>	0,57 ± 0,23 <sup>B</sup>	0,53 ± 0,23 <sup>B</sup>
Macrófagos alveolares	0,10 ± 0,10 <sup>AB</sup>	0,03 ± 0,06 <sup>A</sup>	0,07 ± 0,06 <sup>AB</sup>	0,07 ± 0,08 <sup>AB</sup>	1,07 ± 0,27 <sup>C</sup>	0,33 ± 0,16 <sup>AB</sup>	0,37 ± 0,16 <sup>B</sup>	0,30 ± 0,16 <sup>B</sup>
Depósito intersticial contendo macrófagos	0,07 ± 0,08 <sup>A</sup>	0,03 ± 0,06 <sup>A</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,63 ± 0,19 <sup>B</sup>	0,13 ± 0,15 <sup>A</sup>	0,13 ± 0,12 <sup>A</sup>	0,10 ± 0,10 <sup>A</sup>
Espessura da parede vascular	0,07 ± 0,08 <sup>A</sup>	0,07 ± 0,12 <sup>A</sup>	0,07 ± 0,08 <sup>A</sup>	0,03 ± 0,06 <sup>A</sup>	1,50 ± 0,22 <sup>C</sup>	0,63 ± 0,23 <sup>B</sup>	0,67 ± 0,24 <sup>B</sup>	0,63 ± 0,26 <sup>B</sup>

<sup>a</sup> Comparação entre os oito grupos (Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido das comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls). Resultados com diferentes sobrescritos na linha diferem significativamente (P<0,05). <sup>b</sup> As alterações de cada parâmetro histopatológico foram pontuadas de 0 a 3, sendo então somadas para uma pontuação total máxima de 36. Os dados estão apresentados como média ± **Erro Padrão DP**. <sup>c</sup> \* C: grupo controle (dieta basal); Pro: dieta basal + 2 g probiótico [*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium longum* (2–5 10<sup>9</sup> UFC cada)]; Pre: dieta basal + 1 g prebiótico (fração activa, α-1,3 e α-1,6 derivada de um mananoglicosacárido, apresentando 30% de α-mananos, derivados de cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*); Sym: grupo simbiótico (dieta basal + 2 g probiótico + 1 g prebiótico); CS: grupo controle + protocolo tabagismo (PT); ProS: grupo probiótico + PT; PreS: grupo prebiótico + PT; SymS: grupo simbiótico + PT.

## Discussão

Exposição crônica e maciça a irritantes inalatórios pode acarretar diversos desfechos patológicos, aumentando significativamente os danos pulmonares. Muitos estudos experimentais em animais revelam que os efeitos crônicos do fumo, particularmente dos cigarros, causam alterações patológicas muito graves (DOGAN et al., 2011; MESHI et al., 2002; WRIGHT, 2001; WRIGHT et al., 2002), decorrente dos seus efeitos deletérios devido ao estresse oxidativo (DOGAN et al., 2011; MCGUINNESS; SAPEY, 2017; VAN EEDEN; SIN, 2013; ZINELLU et al., 2016), o que foi evidenciado também nesse estudo, através das alterações de parâmetros nutricionais, fisiológicos e histopatológicos analisados.

O peso corporal final, ganho de peso diário e consumos médios de água e dieta diminuíram significativamente em ratos expostos à fumaça de cigarro em relação ao grupo C. A redução do peso e consequente ganho de peso possa ser devida a ação da nicotina do cigarro, que aumenta a taxa metabólica pela ativação simpato-adrenal (LUMB, 2016) e aumenta o gasto energético (CECIL; GOLDMAN; SCHAFER, 2011), além disso, suprime a ingestão alimentar possivelmente modificando os níveis de substâncias neuroreguladoras conhecidas por iniciar ou suprimir a alimentação (CHATKIN; CHATKIN, 2007). O fumante, portanto, ingeriria menos alimentos devido à maior atividade de leptina (ou de seus receptores), com consequente captação deste hormônio no hipotálamo, paralelamente à diminuição da liberação de neuropeptídeo Y (NPY), levando a sensação de saciedade (JO; TALMAGE; ROLE, 2002). Além dessas propriedades, a nicotina tem uma ação antidiurética, provavelmente devido à estimulação do hipotálamo, aumentando a liberação do hormônio antidiurético (ADH) (FUXE et al., 1989). A náusea, observada nesse estudo e induzida pelo tabagismo pode também produzir um aumento nos hormônios cortisol, GH, prolactina e ADH (SEYLER et al., 1986; TWEED et al., 2012). Respostas mais pronunciadas são observadas em fumantes pesados em comparação com fumantes leves, refletindo o efeito toxicogênico direto da fumaça do cigarro (KAPOOR; JONES, 2005). Além disso, ratos expostos a fumaça do cigarro apresentam refluxo gastrointestinal e úlcera péptica e que podem reduzir a ingestão alimentar (KATZMAN et al., 2016).

Os pesos relativos dos pulmões revelaram aumentados em todos os grupos expostos ao fumo, e isto tem sido observado comumente por outros estudos devido à inflamação pulmonar (MAUDERLY et al., 2004; TSUJI et al., 2013). Observa-se também exacerbação da inflamação perivascular, peribronquial e parenquimal, indicando serem decorrentes das lesões provocadas pela fumaça do cigarro e que desencadeia a ativação transcricional de vários genes inflamatórios, acarretando aumento dos níveis celulares de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio, e também um grande número de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e enzimas (LEE et al., 2005; SHIMODA et al., 2003; WESTPHAL et al., 2005). O aumento na congestão e trombose vascular intraparenquimatosa também foi observado em estudos utilizando ratos e coelhos como modelo animal (GERAGHTY; DABO; D'ARMIENTO, 2011; GHOBASHY; ELMELEEGY; SELEEM, 2010; GOLDKLANG et al., 2016; SEZER et al., 2007; XIAO; GOLDKLANG; D'ARMIENTO, 2016).

As inflamações perivasculares, peribronquial e parenquimal foram exacerbadas nos ratos expostos a fumaça do cigarro, possivelmente devido a interface dos constituintes gasosos e particulados fazerem interface com o sistema imunológico nas superfícies mucosas que revestem a cavidade oral, seios e vias aéreas. Milhares de espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas no cigarro em chamas (MAZZONE et al., 2010) e estão contidas na fase gasosa e frequentemente são de curta duração, afetando principalmente as vias aéreas superiores. Aqueles na fase particulada, particularmente os radicais semiquinona, têm a capacidade de gerar secundariamente mais radicais livres (HUANG; LIN; MA, 2005). Os ROS danificam as células epiteliais que revestem as vias aéreas, induzindo a peroxidação de lipídios e outros constituintes da membrana celular, ativam as vias celulares sensíveis à oxidação e induzem danos ao DNA (VALAVANIDIS; VLACHOGIANNI; FIOTAKIS, 2009). Constituintes da fumaça do cigarro (particularmente ROS) ativam cascatas de sinalização intracelular de células epiteliais que levam à ativação de genes inflamatórios [por exemplo, interleucina-8 ou IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ )] (CHUNG, 2005; CHURG et al., 2002). A secreção destes mediadores inflamatórios promove o recrutamento crônico de células imunes e a inflamação (LEE; TANEJA; VASSALLO, 2012).

Lesões no tecido pulmonar e outras patologias, como exacerbação da proliferação epitelial respiratória, agregação nodular, destruição alveolar alterações enfisematosas e exacerbação da presença de macrófagos alveolares e da espessura da parede vascular também foram descritas por outros estudos e são decorrentes de mecanismos oxidantes criados por meio de substâncias presentes no extrato da fumaça do cigarro, bem como as liberadas pelas células inflamatórias recrutadas, especialmente macrófagos alveolares e neutrófilos (CZEKAJ et al., 2002; DOGAN et al., 2011; GHOBASHY; ELMELEEGY; SELEEM, 2010). Os macrófagos são a principal população de células pulmonares e que servem como a primeira linha de defesa celular contra poluentes, devido à sua função antigênica e propriedades fagocitárias (SHIELDS, 2002).

Os macrófagos desempenham um importante papel na patogênese do enfisema induzido por fumaça, pois liberam enzimas elastolíticas e que têm efeitos destrutivos na parede das vias aéreas e aumento na produção de metaloproteinasas (MMP), decorrente da exposição crônica à fumaça de cigarro. Estas são enzimas proteolíticas e sua liberação aumentada pode ser responsável pela destruição do tecido pulmonar (BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003; TARASEVICIENE-STEWART; VOELKEL, 2008). Esses mediadores ativos podem causar uma ativação de neutrófilos e aumentar a permeabilidade vascular pulmonar e o edema pulmonar (MURAKAMI; TRABER, 2003). Além disso, estudos observaram também dano parenquimatoso pulmonar, incluindo alterações no tecido pulmonar relacionadas à congestão, hemorragia, espessamento septal e edema (DOGAN et al., 2011; SHIELDS, 2002).

A concepção do eixo intestinal e pulmonar é de grande interesse e a perspectiva da aplicação de prebióticos, probióticos e sua combinação no tratamento de doenças pulmonares parece muito promissora (EVSYUTINA et al., 2017). Os resultados deste trabalho revelaram que os alimentos funcionais, probiótico [*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium longum* (2–5 10<sup>9</sup> UFC cada)], prebiótico (mananoligossacarídeo) e simbiótico (associação do probiótico e simbiótico), nas concentrações e frequências de administração desse estudo, atenuaram os efeitos deletérios

da exposição crônica de ratos, como modelo animal, à fumaça do cigarro em todos os parâmetros aqui analisados. Esses efeitos benéficos da associação dos microrganismos probióticos suplementados na dieta podem ser devido à alteração da microbiota do hospedeiro, potencialmente conferindo benefícios para a saúde (MORAES; COLLA, 2006; THOMAS; GREER, 2010) e particularmente em fumantes (SHIMAUCHI et al., 2008).

O efeito dos metabólitos bacterianos, probióticos, em particular os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) na modulação da resposta imune, é um dos tópicos mais discutidos. Os SCFAs, notavelmente acetato, butirato e propionato, reduzem do pH colônico, servem de nutriente para os colonócitos, com o benefício de reparar o epitélio intestinal, atuando diretamente nas células epiteliais e imunológicas e contribuindo para poderosos efeitos anti-inflamatórios (EVSYUTINA et al., 2017; GALLACHER; KOTECHA, 2016; ROGERS; WESSELINGH, 2016; SAMUELSON; WELSH; SHELLITO, 2015; VENKATARAMAN et al., 2015). Demonstrou-se que os SCFAs modulam a atividade do NF- $\kappa$ B, reduzem a produção de TNF- $\alpha$  e regulam negativamente a estimulação dos PRRs (receptores de reconhecimento de padrões) (GALLACHER; KOTECHA, 2016; LOOIJER-VAN LANGEN; DIELEMAN, 2009; MOREAU et al., 2004; OREL; TROP, 2014; ROGERS; WESSELINGH, 2016). Postulado que a capacidade de SCFAs para interagir com certos receptores de ligação de G de neutrófilos depende do seu perfil, o qual é definido pela composição bacteriana. A estimulação do receptor Ffar2 (GPR43) associada à diminuição do nível de eosinófilos e redução da broncoconstrição em comparação com a estimulação de Ffar3 (ou GPR41), que foi associada ao aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios. A expressão deprimida de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e CD40 modificam a capacidade das células dendríticas (DCs) de interagir com células T reguladoras (T-regs) (EVSYUTINA et al., 2017).

Os efeitos benéficos da associação de microrganismos probióticos suplementados na dieta também podem ser devido à modulação da microbiota intestinal, ação de reforço e manutenção da permeabilidade da parede celular intestinal do hospedeiro e melhora da função de barreira da mucosa intestinal, reduzindo o vazamento de antígenos através da mucosa e, assim, a quantidade de alérgenos a que o pulmão pode estar exposto por via circulatória. Além disso, a modulação direta do sistema imunológico pode ocorrer através da indução de citocinas antiinflamatórias, produção aumentada de IgA secretora, ativação de células T-reg e distorção da ativação de células Th1, Th2 e Th17 ou alterações na função macrofágica, resultando em respostas alérgicas reduzidas (MORTAZ et al., 2013; SALVA; VILLENA; ALVAREZ, 2010; WU et al., 2016; ZHOU et al., 2015).

Isoladamente, a administração oral de *Lactobacillus* (LAB) pode modular os perfis de citocinas não apenas intestinal, mas também sistemicamente, como demonstrado por (SHREINER; HUFFNAGLE; NOVERR, 2008), assim como aumentar a resposta imunológica mediadas por células, incluindo proliferação de linfócitos T, capacidade fagocitária de células mononucleares e atividade tumoricida de células NK (AZIZ; BONAVIDA, 2016), protegendo o hospedeiro da infecção das vias aéreas por meio de uma interação do tecido linfoide associado ao intestino (GALT), como os das Placas de Peyer no intestino, provocando um aumento indireto da imunidade respiratória (IZUMO et al., 2010).

Quando as células DC estão sob a estimulação de probióticos produtores de IFN- $\gamma$  altamente ativos, *L. paracasei* BRAP01, *L. acidophilus* AD300, *B. longum* BA100, *E. faecium* BR0085, *L. rhamnosus* AD500 e *L. reuteri* BR101, isto pode levar à secreção de IL-12 por DCs que podem manter um circuito de realimentação adequado de DC para NK (HO et al., 2014).

Foi observado neste estudo associação direta entre o efeito dos prebióticos, mananoligossacarídeos, em ratos em fase de crescimento e expostos cronicamente a fumaça do cigarro. Porém, os efeitos benéficos observados nesse estudo devam ser decorrentes da sua capacidade funcional como substrato para a microbiota intestinal do hospedeiro, estimulando diferentes reações bioquímicas, promovendo a proliferação e renovação de células intestinais e, portanto, os prebióticos parecem ser uma parte ativa e importante do eixo gastro-pulmonar (EVSYUTINA et al., 2017). Além disso, esses oligossacarídeos induzem importantes benefícios imunológicos e fisiológicos para o ambiente do cólon e o paciente como um todo (LAURELL; SJÖBERG, 2017; RUFINO et al., 2018).

O prebiótico mananoligossacarídeo é derivado da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e devido ao seu baixo custo de produção, tecnologia de extração e potencial de fornecimento infinito, tem sido amplamente utilizado como suplemento em dietas animais nos últimos 20 anos (SPRING et al., 2015), porém poucos estudos têm sido realizados utilizando esse prebiótico em humanos e nenhum foi identificado em relação ao seu efeito direto e ou indireto no pulmão de humanos e ou animais expostos cronicamente a fumaça de cigarro. Porém, os resultados benéficos nesse estudo foram robustos e indicam que a suplementação de mananoligossacarídeo, na frequência e dose adicionadas na dieta desse estudo, pode atenuar os efeitos deletérios da exposição crônica a fumaça do cigarro. Portanto, outros estudos mais aprofundados deverão ser realizados e que possam comprovar a eficácia dos mananoligossacarídeos direta ou indiretamente em outras doenças crônicas.

A associação do probiótico e prebiótico, simbiótico, resultou em resposta benéfica nos parâmetros analisados nesse estudo e os resultados mostraram que esse suplemento também atenuou os efeitos observados nos grupos suplementados com probiótico e prebiótico.

## **Conclusões**

Os resultados nos permitem afirmar que os alimentos funcionais, probiótico (*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium longum*), prebiótico (mananoligossacarídeo) e simbiótico (associação do probiótico e prebiótico), atenuaram os efeitos deletérios da exposição crônica a fumaça do cigarro avaliados através de parâmetros fisiológicos, nutricionais e histopatológicos.

## Conflito de interesse

Não existe conflito de interesse.

## Referências

- AZIZ, N.; BONAVIDA, B. Activation of Natural Killer Cells by Probiotics. **Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics**, v. 7, n. 1–2, p. 41–55, 2016.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245–252, 19 mar. 1998.
- BARNES, P. J.; SHAPIRO, S. D.; PAUWELS, R. A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. **The European Respiratory Journal**, v. 22, n. 4, p. 672–688, out. 2003.
- BARREIRO, E. et al. Cigarette smoke-induced oxidative stress: A role in chronic obstructive pulmonary disease skeletal muscle dysfunction. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 4, p. 477–488, 2010.
- BERNHARD, D.; ROSSMANN, A.; WICK, G. Metals in cigarette smoke. **IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)**, v. 57, n. 12, p. 805–809, 1 dez. 2005.
- CALDER, P. C. Feeding the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 72, n. 3, p. 299–309, 21 ago. 2013.
- CECIL, R. L.; GOLDMAN, L.; SCHAFER, A. I. **Goldman's Cecil medicine**. 24. ed. Philadelphia: Saunders, 2011.
- CHATKIN, R.; CHATKIN, J. M. Tabagismo e variação ponderal: a fisiopatologia e genética podem explicar esta associação? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 6, p. 712–719, dez. 2007.
- CHUNG, K. F. Inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 6, p. 619–625, dez. 2005.
- CHURG, A. et al. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Is Central to Acute Cigarette Smoke-induced Inflammation and Connective Tissue Breakdown. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, n. 6, p. 849–854, 15 set. 2002.
- CORTHÉSY, B.; GASKINS, H. R.; MERCENIER, A. Cross-Talk between Probiotic Bacteria and the Host Immune System. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 781S–790S, 1 mar. 2007.
- CZEKAJ, P. et al. Morphological changes in lungs, placenta, liver and kidneys of pregnant rats exposed to cigarette smoke. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 75, n. 0, p. 27–35, 1 jul. 2002.
- DE KIVIT, S. et al. Regulation of Intestinal Immune Responses through TLR Activation: Implications for Pro- and Prebiotics. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 60, 2014.
- DE VRESE, M.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. In: **Advances in Biochemical**

- Engineering/Biotechnology**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 1–66.
- DOGAN, O. T. et al. Pulmonary toxicity of chronic exposure to tobacco and biomass smoke in rats. **Clinics**, v. 66, n. 6, p. 1081–1087, 2011.
- EVSYUTINA, Y. et al. Lung microbiome in healthy and diseased individuals. **World Journal of Respiriology**, v. 7, n. 2, p. 39, 2017.
- FUXE, K. et al. Neuroendocrine actions of nicotine and of exposure to cigarette smoke: medical implications. **Psychoneuroendocrinology**, v. 14, n. 1–2, p. 19–41, 1989.
- GALLACHER, D. J.; KOTECHA, S. Respiratory Microbiome of New-Born Infants. **Frontiers in Pediatrics**, v. 4, p. 10, 23 fev. 2016.
- GERAGHTY, P.; DABO, A. J.; D'ARMIENTO, J. TLR4 Protein Contributes to Cigarette Smoke-induced Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) Expression in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 34, p. 30211–30218, 26 ago. 2011.
- GETOFF, N. Anti-aging and aging factors in life. The role of free radicals. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, n. 10, p. 1577–1586, out. 2007.
- GHOBASHY, H. A.; ELMELEEGY, U. A. G.; SELEEM, H. S. Histological, Histochemical, Immunohistochemical and Morphometric Study of Adult Male Albino Rat's Lung Following Exposure to Air Pollution. **The Egyptian Journal of Histology**, v. 33, n. 1, p. 140–155, mar. 2010.
- GOKAKIN, A. K. et al. The protective effects of sildenafil in acute lung injury in a rat model of severe scald burn: A biochemical and histopathological study. **Burns**, v. 39, n. 6, p. 1193–1199, set. 2013.
- GOLDKLANG, M. P. et al. Single-Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography Imaging in a Rabbit Model of Emphysema Reveals Ongoing Apoptosis In Vivo. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 55, n. 6, p. 848–857, dez. 2016.
- HO, Y.-H. et al. Daily Intake of Probiotics with High IFN- $\gamma$ /IL-10 Ratio Increases the Cytotoxicity of Human Natural Killer Cells: A Personalized Probiotic Approach. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1–7, 11 dez. 2014.
- HOOVER, L. V.; MACPHERSON, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 159–169, 1 mar. 2010.
- HUANG, M.-F.; LIN, W.-L.; MA, Y.-C. A study of reactive oxygen species in mainstream of cigarette. **Indoor Air**, v. 15, n. 2, p. 135–140, abr. 2005.
- IZUMO, T. et al. Effect of intranasal administration of Lactobacillus pentosus S-PT84 on influenza virus infection in mice. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 9, p. 1101–1106, set. 2010.
- JO, Y.-H.; TALMAGE, D. A.; ROLE, L. W. Nicotinic receptor-mediated effects on appetite and food intake. **Journal of Neurobiology**, v. 53, n. 4, p. 618–632, dez. 2002.
- KAPOOR, D.; JONES, T. H. Smoking and hormones in health and endocrine disorders. **European Journal of Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 491–499, 1 abr. 2005.
- KATZMAN, D. K. et al. **Neinstein's Adolescent and Young Adult Health Care : a Practical Guide**. 6. ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health, 2016.

- LARSEN, J. M. et al. Divergent Pro-Inflammatory Profile of Human Dendritic Cells in Response to Commensal and Pathogenic Bacteria Associated with the Airway Microbiota. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31976, 21 fev. 2012.
- LAURELL, A.; SJÖBERG, K. Prebiotics and synbiotics in ulcerative colitis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 52, n. 4, p. 477–485, abr. 2017.
- LEE, J.-H. et al. Simvastatin Inhibits Cigarette Smoking–induced Emphysema and Pulmonary Hypertension in Rat Lungs. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 172, n. 8, p. 987–993, 15 out. 2005.
- LEE, J.; TANEJA, V.; VASSALLO, R. Cigarette Smoking and Inflammation. **Journal of Dental Research**, v. 91, n. 2, p. 142–149, 29 fev. 2012.
- LOOIJER–VAN LANGEN, M. A. C.; DIELEMAN, L. A. Prebiotics in Chronic Intestinal Inflammation. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 15, n. 3, p. 454–462, mar. 2009.
- LUMB, A. B. **Nunn’s applied respiratory physiology**. 8. ed. Oxford: Elsevier Academic Press, 2016.
- MAUDERLY, J. L. et al. Chronic Inhalation Exposure to Mainstream Cigarette Smoke Increases Lung and Nasal Tumor Incidence in Rats. **Toxicological Sciences**, v. 81, n. 2, p. 280–292, 14 jul. 2004.
- MAZZONE, P. et al. Pathophysiological Impact of Cigarette Smoke Exposure on the Cerebrovascular System with a Focus on the Blood-brain Barrier: Expanding the Awareness of Smoking Toxicity in an Underappreciated Area. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4111–4126, 26 nov. 2010.
- MCGUINNESS, A.; SAPEY, E. Oxidative Stress in COPD: Sources, Markers, and Potential Mechanisms. **Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 2, p. 21, 15 fev. 2017.
- MESHI, B. et al. Emphysematous Lung Destruction by Cigarette Smoke. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 52–57, jan. 2002.
- MISHRA, R. et al. Reduction of chromium-vi by chromium resistant lactobacilli: A prospective bacterium for bioremediation. **Toxicology International**, v. 19, n. 1, p. 25–30, jan. 2012.
- MONACHESE, M.; BURTON, J. P.; REID, G. Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6397–6404, set. 2012.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 254, p. 109–122, 2006.
- MOREAU, N. M. et al. Resistant starch modulates in vivo colonic butyrate uptake and its oxidation in rats with dextran sulfate sodium-induced colitis. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 3, p. 493–500, mar. 2004.
- MORTAZ, E. et al. Probiotics in the Management of Lung Diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1–10, 8 maio 2013.
- MURAKAMI, K.; TRABER, D. L. Pathophysiological basis of smoke inhalation injury. **News in Physiological Sciences**, v. 18, p. 125–129, jun. 2003.
- NAIR, A. et al. Cadmium-Induced Pathologies: Where Is the Oxidative Balance Lost (or Not)?



**International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 6116–6143, 18 mar. 2013.

OREL, R.; TROP, T. K. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease.

**World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 33, p. 11505–11524, set. 2014.

PAIVA, F. P.; MAFFILI, V.; SANTOS, A. C. S. **Curso de manipulação de animais de laboratório.**

Disponível em: <[http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha\\_manipulacao.pdf](http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf)>. Acesso em: 15 out. 2015.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R SoftwareR: A Language and Environment for Statistical Computing**, 2016.

ROGERS, G. B.; WESSELINGH, S. Precision respiratory medicine and the microbiome. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 4, n. 1, p. 73–82, jan. 2016.

RUFINO, M. N. et al. Systematic review and meta-analysis of preclinical trials demonstrate robust beneficial effects of prebiotics in induced inflammatory bowel disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 62, p. 1–8, dez. 2018.

SALVA, S.; VILLENA, J.; ALVAREZ, S. Immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: Impact on intestinal and respiratory infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1–2, p. 82–89, 30 jun. 2010.

SAMUELSON, D. R.; WELSH, D. A.; SHELLITO, J. E. Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1085, 7 out. 2015.

SEYLER, L. E. et al. Pituitary hormone response to cigarette smoking. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 24, n. 1, p. 159–162, jan. 1986.

SEZER, M. et al. Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on the Histopathological Changes in the Lungs of Cigarette Smoke-Exposed Rabbits. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 101, n. 3, p. 187–191, set. 2007.

SHIELDS, P. G. Tobacco Smoking, Harm Reduction, and Biomarkers. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 19, p. 1435–1444, 2 out. 2002.

SHIMAUCHI, H. et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, n. 10, p. 897–905, out. 2008.

SHIMODA, K. et al. Effect of poly(ADP ribose) synthetase inhibition on burn and smoke inhalation injury in sheep. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 285, n. 1, p. L240–L249, jul. 2003.

SHREINER, A.; HUFFNAGLE, G. B.; NOVERR, M. C. The “Microflora Hypothesis” of Allergic Disease. In: **GI Microbiota and Regulation of the Immune System**. New York, NY: Springer New York, 2008. v. 635p. 113–134.

SINGH, A. K.; GUPTA, V. K.; GUPTA, B. Chromium(III) selective membrane sensors based on Schiff bases as chelating ionophores. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, n. 1, p. 171–178, fev. 2007.

SMITH, C. J.; LIVINGSTON, S. D.; DOOLITTLE, D. J. An international literature survey of “IARC group

I carcinogens” reported in mainstream cigarette smoke. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 10–11, p. 1107–1130, out. 1997.

SPRING, P. et al. A review of 733 published trials on Bio-Mos®, a mannan oligosaccharide, and Actigen®, a second generation mannose rich fraction, on farm and companion animals. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v. 3, n. e7, p. e8, 20 maio 2015.

SUN, H.; BROCATO, J.; COSTA, M. Oral Chromium Exposure and Toxicity. **Current Environmental Health Reports**, v. 2, n. 3, p. 295–303, 10 set. 2015.

TARASEVICIENE-STEWART, L.; VOELKEL, N. F. Molecular pathogenesis of emphysema. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 394–402, 1 fev. 2008.

THOMAS, D. W.; GREER, F. R. Probiotics and Prebiotics in Pediatrics. **Pediatrics**, v. 126, n. 6, p. 1217–1231, 1 dez. 2010.

TSUJI, H. et al. Comparison of Biological Responses in Rats Under Various Cigarette Smoke Exposure Conditions. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 26, n. 2, p. 159–174, jun. 2013.

TWEED, J. O. et al. The endocrine effects of nicotine and cigarette smoke. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 7, p. 334–342, jul. 2012.

UNITED STATES NATIONAL CANCER INSTITUTE, W. H. O. **Monograph 21: The Economics of Tobacco and Tobacco Control | BRP | DCCPS/NCI/NIH**. Bethesda (MD): [s.n.]. Disponível em: <<https://cancercontrol.cancer.gov/brp/tcrb/monographs/21/>>. Acesso em: 18 jul. 2018.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, K. Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisms of Oxidative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effects with Other Respirable Particles. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, n. 2, p. 445–462, 2 fev. 2009.

VAN EEDEN, S. F.; SIN, D. D. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Lung and Systemic Process. **Canadian Respiratory Journal**, v. 20, n. 1, p. 27–29, 2013.

VAN LOO, J. et al. The SYNCAN project: goals, set-up, first results and settings of the human intervention study. **The British journal of nutrition**, v. 93 Suppl 1, p. S91-98, abr. 2005.

VENKATARAMAN, A. et al. Application of a Neutral Community Model To Assess Structuring of the Human Lung Microbiome. **mBio**, v. 6, n. 1, p. e02284-14, 27 fev. 2015.

WESTPHAL, M. et al. Selective Thromboxane A2Synthase Inhibition by OKY-046 Prevents Cardiopulmonary Dysfunction after Ovine Smoke Inhalation Injury. **Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 102, n. 5, p. 954–961, 1 maio 2005.

WHO, W. H. O.-. **WHO | Global status report on noncommunicable diseases 2010**. Geneva, Switzerland,: World Health Organization, 2015.

WIECZFINSKA, J. et al. Analysis of Short-Term Smoking Effects in PBMC of Healthy Subjects—Preliminary Study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 5, p. 1021, 18 maio 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**.

Geneva, Switzerland,: WHO, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **World no tobacco day**. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/events/2018/world-no-tobacco-day/en/>>. Acesso em: 18 jul. 2018.

WRIGHT, J. L. The Importance of Ultramicroscopic Emphysema in Cigarette Smoke-Induced Lung Disease. **Lung**, v. 179, n. 2, p. 71–81, 6 mar. 2001.

WRIGHT, J. L. et al. Cigarette smoke induces rapid changes in gene expression in pulmonary arteries.

**Laboratory Investigation**, v. 82, n. 10, p. 1391–1398, out. 2002.

WU, C.-T. et al. Effects of immunomodulatory supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* on airway inflammation in a mouse asthma model. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, n. 5, p. 625–635, 1 out. 2016.

XIAO, R.; GOLDKLANG, M. P.; D'ARMIENTO, J. M. Parenchymal Airspace Profiling: Sensitive Quantification and Characterization of Lung Structure Evaluating Parenchymal Destruction. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 55, n. 5, p. 708–715, nov. 2016.

YOUNAN, S. et al. Chromium(VI) bioremediation by probiotics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 12, p. 3977–3982, set. 2016.

YOUNAN, S. et al. Probiotic mitigates the toxic effects of potassium dichromate in preclinical study: a randomized controlled trial. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, 30 maio 2018.

ZHOU, Y. et al. A diet with lactosucrose supplementation ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. **Food & Function**, v. 6, n. 1, p. 161–171, 2015.

ZINELLU, E. et al. Circulating biomarkers of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. **Respiratory Research**, v. 17, n. 1, p. 150, 14 dez. 2016.

## ANEXO A

## COMPROVANTE APROVAÇÃO - CEUA

---

**UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista**

---

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação  
PROBIC - Programa de Bolsas de Iniciação Científica**Parecer Final**

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "O EFEITO DO PREBIÓTICO, PROBIÓTICO E SIMBIÓTICO SOBRE O APARELHO REPRODUTOR DE RATOS FUMANTES PASSIVOS EM CRESCIMENTO", cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) sob o número n° 2470 e tendo como participante(s) HERMANN BREMER NETO (responsável), CALIE CASTILHO SILVESTRE (docente), ANA PAULA ALVES FAVARETO (docente), ADRIANO FALVO (discente), MONICA MARIA NAKAHARA PAPAÏT (discente), VINICIUS AUGUSTO DIONISIO XAVIER (discente), foi avaliado e EM TRÂMITE pelo COMITÊ ACESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente SP.

Presidente Prudente, 2 de Junho de 2015.



---

Prof. Dr. Luiz Rodrigues Garcia Jr.  
Coordenador Científico da CCPq

## ANEXO B: NORMAS DA REVISTA SEMINA: CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Diretrizes para Autores

### Normas Editoriais para Publicação

#### Atenção Autores:

**Recomendamos aos autores COMPLETAMENTE consultar o Guia, DESDE papéis que não estão preparados RIGOROSAMENTE acordo com as normas não serão aceitos.**

**Depois de 2015/02/19, a taxa de submissão de novos artigos será de R \$ 100,00** . Se o artigo for rejeitado, esta taxa não será devolvida.

Os artigos submetidos após **2015/02/19** que são aceitos e aprovados para publicação serão submetidos a uma taxa de publicação, ajustado de acordo com o número de páginas do manuscrito.

Até 10 páginas: **R \$ 300,00**  
 de 11 a 15 páginas: **R \$ 400,00**  
 De 16 a 20 páginas: **R \$ 500,00**  
 de 21 a 25 páginas: **R \$ 600,00**

Se o **artigo for aceito para publicação** , a quantidade de **R \$ 100,00** pago pela taxa de inscrição **não será deduzida a taxa de publicação** .

O **comprovante de depósito** deve ser digitalizado e anexado como arquivo suplementar no sistema eletrônico.

O depósito deve ser feito em nome do Instituto de Tecnologia e Desenvolvimento Econômico e Social (ITEDES), CNPJ: 00.413.717 / 0001-65, em uma das três contas bancárias abaixo:

#### **Banco do Brasil (001)**

Branch: 1212-2  
 Conta corrente: 43509-0 - Brasil

#### **Caixa Econômica Federal (104)**

Branch: 3076  
 Conta Corrente: 0033-4  
 Transação: 003 - Brasil

#### **Itaú (341)**

Branch: 3893  
 Conta Corrente: 29567-9 - Brasil

#### **Padrões editoriais para publicação em Semina: Ciências Agrárias , Universidade Estadual de Londrina (UEL)**

**Os artigos podem ser submetidos em Português ou Inglês, mas só serão publicados em Inglês** . Os artigos que são submetidos em Português, se aceito para publicação, terá de ser **traduzida em Inglês**.

**Artigos enviados à revista, 31 de março de 2014 e aqueles que ainda estão sendo processados pode ser publicado em Português; no entanto, será dada prioridade para publicação os artigos que são traduzidos para o Inglês.**

Todos os artigos, depois de ser aceito para publicação, devem ser acompanhados de um certificado comprovativo de tradução ou correção (como arquivo suplementar) de um dos seguintes serviços de tradução:

Especialistas American Journal

Editage

Elsevier

<http://www.proof-reading-service.com>

<http://www.academic-editing-services.com/>

<http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

<http://www.stta.com.br/>

O autor deve anexar o **documento que fornece evidência de** esta tradução ou correção no sistema eletrônico na página de apresentação em "**Docs. Sup** . "

### **COMENTÁRIOS:**

1) Os manuscritos originais submetidos para revisão são inicialmente avaliados pelo Comitê Editorial da *Semina: Ciências Agrárias* . Nessa avaliação, serão avaliados os requisitos de qualidade para a publicação com a revista, tais como escopo do artigo, adequação em relação aos padrões da revista, a qualidade da escrita e da fundamentação teórica. Além disso, ele também é considerado atualização revisão da literatura, consistência e precisão da metodologia, a contribuição dos resultados, discussão dos dados observados no estudo, tabela e figura representação, e originalidade ea consistência das conclusões.

Se o número de manuscritos submetidos exceder a capacidade de avaliação e publicação de *Semina: Ciências Agrárias* , uma comparação entre as submissões serão feitas, e as obras consideradas como tendo o maior potencial de contribuição para o conhecimento científico será direcionado para consultores ad hoc. Os manuscritos que não são aprovados por estes critérios são arquivados, enquanto os manuscritos restantes são submetidos a avaliação por pelo menos dois conselheiros científicos que são especialistas na área disciplinar do manuscrito, sem identificar os autores. A taxa de inscrição não serão devolvidos aos autores que têm seus manuscritos arquivados.

2) Se for caso disso, se o projeto de pesquisa que originou o artigo foi realizada de acordo com biossegurança e ética normas técnicas sob a aprovação de um comitê de ética envolvendo seres humanos e / ou uma ética comissão que envolva animais, o nome de comissão, instituição e número do processo deve ser indicado.

### **Requisitos obrigatórios para ACEITAÇÃO:**

a) O arquivo artigo principal anexa tem os nomes dos autores e suas respectivas afiliações.

b) O **registo completo** de todos os autores foi adicionado aos metadados durante a submissão; **Exemplo:** Nome completo; Instituição / Afiliação; País; Resumo da Biografia / Título / função.

c) Texto explicando a relevância do trabalho (importância e da distinção de trabalhos previamente publicados), com um comprimento máximo de 10 linhas, está incluído nos comentários de campo para o editor.

d) A apresentação é acompanhado de um documento comprovativo do pagamento da taxa de inscrição como arquivo suplementar no "**Docs. Sup** . "Seção.

e) O artigo principal é acompanhada por arquivos suplementares, incluindo gráficos, figuras, fotografias e outros documentos, na sua versão original (formatos JPEG, TIFF ou Excel).

f) As informações a seguir é incluída no manuscrito original: título, resumo, palavras-chave em tabelas português e inglês, e figuras.

### **RESTRICÇÕES por área temática:**

**PARA A AGRONOMIA CAMPO, manuscritos que não será aceite em caso dos seguintes:**

- a) As experiências realizadas com uma *in vitro* cultura estão limitados à melhoria de protocolos padronizados já ou não fornecer nova informação sobre a área de assunto;
- b) Os experimentos de campo não incluem dados correspondentes a, pelo menos, dois anos ou para diversos locais dentro do mesmo ano;
- c) As experiências referem-se apenas a testes sobre a eficácia de produtos comerciais contra os agentes bióticos e abióticos ou estresse fisiológico;
- d) As experiências envolvem apenas bioensaios (screening) sobre a eficácia dos métodos para controlar insetos, ácaros, ou doenças em plantas, a menos que contenham uma contribuição importante sobre os mecanismos de ação sob a perspectiva de uma fronteira do conhecimento; ou
- e) O objectivo é limitado a registrar a ocorrência de uma espécie de uma praga ou patógeno ou associações com os anfitriões em novos locais dentro de regiões geográficas onde a espécie já é conhecido. Documentação das espécies ou associações já conhecidas só será considerada se eles são descritos em novas áreas ecológicas. Os registros de distribuição deve ser baseada nos ecossistemas e não em fronteiras políticas.

**PARA O VETERINÁRIO FIELD, os manuscritos não serão aceites EM CASO DE O SEGUINTE:**

- a) A publicação de relatos de casos é restrita; apenas artigos com grande relevância e originalidade que fazem uma real contribuição para o avanço do conhecimento no campo serão selecionados para processamento.

**Categorias de trabalho**

- a) Artigos Científicos: máximo de 20 páginas, incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas
- b) Comunicações científicas: máximo de 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e um máximo de duas mesas, duas figuras ou uma combinação de uma tabela e uma figura
- c) Relatos de casos: máximo de 10 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 12 citações e um máximo de duas mesas, duas figuras ou uma tabela e uma figura
- d) Artigos de revisão: máximo de 25 páginas, incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas

**Apresentação do Trabalho**

artigos completos originais, comunicações, relatos de casos e comentários devem ser escritos em Português ou Inglês usando o Microsoft Word para Windows, em papel tamanho A4, com linhas numeradas por página, espaço 1,5, fonte Times New Roman, tamanho 11 normal, margens de 2 cm em todos os lados, com páginas numeradas no canto superior direito e seguindo as diretrizes para o número máximo de páginas de acordo com a categoria do trabalho.

*Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e tabelas* devem ser numeradas com algarismos arábicos, devem ser incluídas no final do trabalho imediatamente após as referências bibliográficas, e devem ser citadas no texto. Além disso, os números devem ser de boa qualidade e deve ser fixada em seu formato original (JPEG, TIFF, etc.) em Docs Sup na página de submissão. As figuras e tabelas não serão aceitas se não estiverem em conformidade com as seguintes especificações: largura de 8 cm ou 16 cm com altura máxima de 22 cm. Se a figura tem maiores dimensões, que irá ser reduzido durante o processo de edição para as dimensões acima mencionadas.

**Nota** : Os números (Ex. **Figura 1.** Título) e tabelas ( **Tabela 1.** Título) deve ter uma largura de 8 cm ou 16 cm com altura máxima de 22 cm. Aqueles com maiores dimensões irá ser reduzido durante o processo de edição para as dimensões acima mencionadas. Para todas as tabelas e figuras que não são trabalho original do autor, uma citação da fonte de consulta é obrigatória. Coloque esta citação abaixo da tabela ou figura e indicar com uma fonte menor (Times New Roman 10).

Ex: " **Fonte**": IBGE (2014), ou **Fonte** : IBGE (2014).

### **preparação do manuscrito**

#### **artigo científico:**

Os artigos científicos devem relatar os resultados de pesquisas originais nas áreas afins, com as seções organizadas da seguinte maneira: Título em Inglês; Título em Português; Resumo em Inglês com palavras-chave (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Resumo em Português com palavras-chave (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Introdução; Materiais e métodos; Resultados e Discussão, com conclusões no final da discussão ou Resultados (Discussão e Conclusões deve ser escrito em separado); Agradecimentos; Fornecedores, se for o caso; e Referências Bibliográficas. Os títulos devem estar em negrito, sem numeração. Se há uma necessidade de incluir um subtítulo dentro de uma seção, ele deve ser colocado em itálico, e se existem outras sub-temas a incluir no âmbito de um sub-título, estas devem ser numeradas com algarismos arábicos. (Exemplo: **Materiais e Métodos** , *Áreas de estudo* , 1. *área rural* , 2. *Urbanuma rea* . )

O trabalho apresentado não pode ter sido publicado anteriormente com o mesmo conteúdo, a não ser sob a forma de um resumo em Eventos Científicos, notas introdutórias, ou formato reduzido.

#### **Os trabalhos deverão ser apresentados na seguinte ordem:**

**1. Título do trabalho** , acompanhada de sua tradução em Português, se for o caso.

**2. Resumo e Palavras-chave:** Um informativo abstrato com um mínimo de 200 palavras e máximo de 400 palavras devem ser incluídas, no mesmo idioma usado no texto do artigo, acompanhados de uma tradução em Inglês ( *Abstract e Palavras-chave* ) se o texto não foi escrito em Inglês.

**3. Introdução:** A introdução deve ser conciso e conter apenas o comentário que é estritamente necessário para introduzir o tema e apoiar a metodologia e discussão.

**4. Materiais e Métodos:** Esta seção pode ser apresentado de forma contínua, descritiva ou com sub-rubricas para permitir que o leitor a compreender e ser capaz de repetir a metodologia citada com ou sem o apoio de citações bibliográficas.

**5. Resultados e Discussão :** *Esta seção* deve ser apresentada de uma forma clara, com o auxílio de tabelas, gráficos e figuras, para que ele não levanta quaisquer perguntas para o leitor que diz respeito à autenticidade dos resultados e pontos de vista discutidos.

**6. Conclusões:** *Estes* devem ser claras e apresentadas de acordo com os objetivos propostos no trabalho.

**7. Agradecimentos:** As pessoas, instituições e empresas que contribuíram para o trabalho deve ser mencionado no final do texto, antes da seção do Referências Bibliográficas.

#### **Nota:**

**Notas:** Cada nota sobre o corpo do texto deve ser indicado por um símbolo sobrescrito imediatamente após a expressão se refere e devem ser incluídos como uma nota de rodapé no final da página.

**Figuras:** As figuras que são consideradas essenciais serão aceitas e devem ser citadas no texto pela sua ordem numérica, em algarismos arábicos. Se nenhuma ilustrações apresentadas já foram publicados, a fonte ea permissão para publicação deve ser indicado.

**Tabelas:** Tabelas deve ser acompanhada por um cabeçalho que vai permitir a compreensão dos dados recolhidos sem a necessidade de utilizar o corpo do texto por referência.

#### **Quantidades, unidades e símbolos:**



- a) Os trabalhos devem estar de acordo com os critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais em cada área temática.
- b) Use o Sistema Internacional de Unidades em todo o texto.
- c) Use o formato de potência negativa observar e apresentar unidades relacionados: por exemplo,  $\text{kg ha}^{-1}$ . Não use o símbolo de barra para relacionar unidades: por exemplo,  $\text{kg / ha}$ .
- d) Use um espaço simples entre as unidades:  $\text{g L}^{-1}$ , não  $\text{gL}^{-1}$  ou  $\text{gL}^{-1}$ .
- e) Use representação de tempo de 24 horas com quatro dígitos para as horas e minutos: 09h00, 18h30.

### 8. citações de autores no texto

As citações devem ser seguido pelo ano de publicação, e várias citações devem seguir o sistema de ordem alfabética, de acordo com os seguintes exemplos:

- a) Os resultados por Dubey (2001) confirmou que .....
- b) De acordo com Santos et al . (1999), o efeito de azoto .....
- c) Beloti et ai. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica .....
- d) [...], e inibir o teste para a formação de sincício (BRUCK et al., 1992).
- e) [...] comprometer a qualidade dos seus derivados (AFONSO; Vianni, 1995).

### Citações com dois autores

Em citações de fontes que têm dois autores, os nomes dos autores são separados por um ponto e vírgula, quando citando-os entre parênteses.

Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2000).

Use e quando os autores estão incluídos na frase em vez de citados entre parênteses.

**Ex** : Pinheiro e Cavalcanti (2000).

### Citando mais de dois autores

Indique o primeiro autor seguido da expressão et al.

Entre parênteses, referências separadas com um ponto e vírgula, quando mais de uma referência é citada.

Ex: (. Russo et al, 2000) ou Russo et al. (2000); (Russo et ai, 2000;.. FELIX et ai, 2008).

### Citando vários documentos do mesmo autor , publicado no mesmo ano

Adicionar letras minúsculas, em ordem alfabética, após a data e sem um espaço.

**Ex** : (SILVA, 1999a, 1999b).

### Citando vários documentos do mesmo autor, publicados em anos diferentes

Separe as datas com uma vírgula.

**E x** : (Andrade, 1999, 2000, 2002).

### Citando vários documentos de vários autores , mencionado em simultâneo

Coloque as citações em ordem alfabética, separadas por um ponto e vírgula.

**Ex :** (Bacarat, 2008; RODRIGUES, 2003).

**9. Referências:** As referências, de acordo com a norma NBR 6023, agosto de 2000, e número reformulação 14,724 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), de 2011, devem ser listados em ordem alfabética no final do manuscrito. **Todos os autores participar num estudo referenciado deve ser mencionado, independentemente do número de participantes** . A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e demonstrações, são da responsabilidade exclusiva dos autores.

**Nota :** Consulte problemas encontrados recentemente publicados de **Semina: Ciências Agrárias** para mais detalhes sobre como formatar referências no artigo.

As restantes categorias de trabalhos (comunicação científica, Relato de Caso e Revisão) devem seguir as normas acima mencionadas, mas com as seguintes indicações adicionais para cada categoria:

### **comunicação científica**

comunicações científicas devem ser apresentados de uma forma concisa, mas com uma descrição completa da pesquisa termo ou investigação em curso (Nota introdutória), com documentação bibliográfica completa e metodologias, semelhante a um artigo científico regular. comunicações científicas deve conter as seguintes seções: Título (em Português e Inglês); Resumo com Palavras-chave em Português; Abstrato com palavras-chave em Inglês; e corpo do texto. O corpo do texto não deve ser dividido em seções, mas deve seguir esta sequência: introdução, metodologia, resultados e discussão (tabelas e figuras podem ser incluídos), conclusão e referências bibliográficas.

### **Relato de caso**

Um relatório do caso deve ser uma breve descrição de casos clínicos e patológicos, resultados sem precedentes, relatórios de novas espécies ou estudos sobre a ocorrência ou a incidência de pragas, microorganismos ou parasitas de interesse agrônomo, zootécnico, ou veterinária. O relato de caso deve conter as seguintes seções: Título (Português e Inglês); Resumo com Palavras-chave em Português; Abstrato com palavras-chave em Inglês; Introdução com revisão da literatura; relato de caso (s), incluindo os resultados, discussão e conclusão; e referências bibliográficas.

### **artigos de revisão bibliográfica**

artigos de revisão deve envolver temas relevantes no âmbito da revista. O número de artigos de revisão por edição é limitada, e os autores só pode escrever artigos de revisão de interesse para a revista, na sequência de um convite por parte dos membros do conselho editorial da revista. Se um artigo de revisão é apresentado por um autor, a inclusão de resultados relevantes do autor ou do grupo envolvido no estudo é necessário, juntamente com referências bibliográficas que demonstrem experiência e conhecimento sobre o tema.

Um artigo de revisão deve conter as seguintes seções: Título (Português e Inglês); Resumo com Palavras-chave em Português; Abstrato com palavras-chave em Inglês; Desenvolvimento do tema proposto (o texto pode ser dividido em seções, mas isso não é necessário); Conclusões ou Considerações Finais; Agradecimentos (se aplicável); e Referências Bibliográficas.

### **Outras informações importantes**

1. A publicação de artigos depende do parecer favorável de consultores ad hoc e a aprovação da *Semina: Ciências Agrárias* UEL Conselho Editorial.

2. Reprints não será dada aos autores, uma vez que as questões estarão disponíveis on-line no site da revista (<http://www.uel.br/revistas/uel>).

3. Transferência de Direitos Autorais: Os autores concordam com a transferência de direitos de publicação do manuscrito para a revista. A reprodução dos artigos é permitida somente quando a fonte seja citada. É proibido o uso comercial das informações.

4. perguntas imprevistas sobre ou problemas nos actuais padrões serão abordados pelo Conselho Editorial da área de assunto em que o artigo foi submetido para publicação.

5. *Número de autores*: Não há limite para o número de autores, mas as pessoas incluídas como co-autores deveriam ter efetivamente participaram do estudo. Pessoas com pouca participação no estudo ou a preparação artigo devem ser citadas na seção Agradecimentos, como deve instituições que concederam bolsas de estudo e outros recursos financeiros.

### as condições de submissão

Como parte do nosso processo de submissão, os autores devem verificar que o pedido está em conformidade com todos os itens listados abaixo. As inscrições que não estejam em conformidade com as normas será rejeitado e os autores informados sobre a decisão.

1. Os autores devem declarar que a contribuição é original e nova e que não está sendo avaliada para publicação em outros lugares; qualquer exceção (s) deve ser justificada em "Comentários ao Editor".
2. Os autores devem também afirmam que o material é formatado corretamente e que os documentos complementares estão ligados, estar consciente de que o **formato incorreto resultará na suspensão do processo de avaliação, sem avaliação do mérito** .
3. **Dados de autoria para todos os autores devem ser inseridos no campo de metadados durante o processo de submissão** .

Use o botão " **incluem o autor** ."

1. **No passo seguinte, por favor preencha os metadados em Inglês.**

A fim de incluir os dados, depois de salvar os dados de submissão em Português, clique em " **editar metadados** " no topo da página. Alterar o idioma para Inglês e inserir o título em Inglês, o resumo e palavras-chave. Salvar e continuar para a próxima etapa.

1. A **identificação de autoria** do trabalho deve ser removida do arquivo e da Word usando a opção "Propriedades", a fim de garantir que os critérios de anonimato da revista, no caso o artigo é submetido a revisão por pares, de acordo com as instruções disponíveis em [Assegurando um blind peer review](#) .
2. Os arquivos para submissão deve estar em Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapasse 2 MB).

O texto deve ser digitado em papel A4, com linhas numeradas, espaçamento 1,5 e fonte Times New Roman tamanho 11.

1. Confirme se todos os padrões éticos foram seguidos se a pesquisa foi realizada com seres vivos. Incluir documentos à prova de aprovação por um comité de ética institucionais envolvendo seres humanos e / ou uma comissão de ética envolvendo animais, se estes documentos são solicitados.
2. **Incluir o pagamento da [taxa de inscrição](#) , e anexar o comprovante de pagamento como documento suplementar em "[Docs. Sup](#) . "**

### Declaração de direitos de autor

A **Declaração de Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista é o direito do autor. Uma vez que os artigos publicados nesta revista são de acesso público, os artigos podem ser usados livremente, com as suas próprias atribuições, para fins educacionais e não-comerciais.

A revista tem o direito de fazer alterações em um nível normativo, ortográfica e gramatical nos artigos originais, com o objectivo de manter o uso padrão adequado da linguagem e a credibilidade da revista. No entanto, o estilo de escrita dos autores serão respeitados.

Alterações, correções ou sugestões em um nível conceitual, quando necessário, será direcionado para os autores.

As opiniões expressas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

### **Política de Privacidade**

Os nomes e as filiações relatados neste jornal são usados exclusivamente para os serviços prestados e não são disponibilizados para qualquer outra finalidade ou a terceiros.

as condições de submissão

Como parte do nosso processo de submissão, os autores são obrigados a assegurar que a apresentação está em conformidade com todos os itens listados abaixo. As inscrições que não estejam em conformidade com as normas serão devolvidas aos autores.

1. Os autores afirmam que a contribuição é original e nova e que não está sendo avaliada para publicação em outro periódico; qualquer exceção (s) deve ser justificada em "Comentários ao Editor".
2. Os autores afirmam que o material é formatado corretamente e que os arquivos Suplementar foram carregados, estando ciente de que o **formato incorreto resultará na suspensão do processo de avaliação, sem avaliação do mérito** .
3. **Na próxima etapa, preencha os metadados em Inglês.**

Para incluir os metadados, depois de salvar os dados de submissão em Português, clique em " **editar metadados** " no topo da página. Alterar o idioma para Inglês e inserir o título em Inglês, o resumo e palavras-chave. Guardar e ir para a próxima etapa.

1. **Dados de autoria de todos os autores devem ser preenchidas durante o processo de submissão.**

Use o botão " **incluem o autor.** "

1. Verifique se a **identificação de autoria** do trabalho foi removida do arquivo e da Word usando a opção Propriedades, a fim de garantir que os critérios de anonimato da revista, se o artigo é submetido a revisão por pares de acordo com as instruções disponíveis em [Assegurando um ponto cego avaliação](#) .
2. Os arquivos para submissão estão em Word, OpenOffice ou RTF (desde que não excedam 2 MB).

O texto é escrito com espaçamento 1,5 e, em fonte Times New Roman tamanho 11. Use itálico em vez de sublinhado (exceto para endereços URL).

O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#) sob o título "Sobre a Revista".

1. Confirme se todos os padrões éticos foram seguidos se a pesquisa foi realizada com seres vivos. Fornecer a documentação da aprovação de um comitê de ética institucional e prova de consentimento informado se esses documentos são solicitados. A conformidade com os preceitos éticos aplicáveis devem ser citadas no corpo do texto.
2. Um texto indicando a relevância do trabalho (importância e da distinção em relação a outros trabalhos já publicados), com um comprimento máximo de 10 linhas, deve ser incluído no campo **Comentários ao Editor** .

## Declaração de direitos de autor

A **Declaração de Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista é o direito do autor. Uma vez que os artigos que são publicados nesta revista são de acesso público, os artigos podem ser usados livremente, com as suas próprias atribuições, para fins educacionais e não-comerciais.

A revista tem o direito de fazer alterações em um nível normativo, ortográfica e gramatical nos artigos originais, com o objectivo de manter o uso padrão adequado da linguagem e a credibilidade da revista. No entanto, o estilo de escrita dos autores serão respeitados.

Alterações, correções ou sugestões a nível conceptual, quando necessário, será direcionado para os autores. Nestes casos, depois de ter sido alterado, os artigos vai ser submetido a uma nova avaliação.

As opiniões expressas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

## Política de Privacidade

Os nomes e as filiações relatados neste jornal são usados exclusivamente para os serviços prestados e não são disponibilizados para qualquer outra finalidade ou a terceiros.

Eles devem ser tanto destaque e em negrito? Ou isso deve apenas ler "Os títulos devem estar em negrito"?

Parece que esta frase e a seguinte frase (depois de "1") talvez deva ser comutada para maior clareza, como se segue:

**Utilizando os seguintes passos, por favor preencha os metadados em Inglês.**

### **1 . Use o botão "incluem o autor."**

**Por favor, revise as posições e a ordenação / numeração das etapas desta seção cuidadosamente para garantir que os passos são numerados claramente os autores de pedidos deve segui-los.**

Uma vez que a frase indica "no caso de o artigo é submetido a revisão por pares", parece desnecessário incluir (ex .: artigos) aqui. Por favor considerar a exclusão desta.

Deve haver um item numerado separado com uma explicação sobre a taxa de inscrição? Se assim for, por favor, forneça as informações apropriadas. Se não, por favor em apagar isso.

## Apresentação Preparação Checklist

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão com todos os itens a seguir, e apresentações podem ser devolvidos aos autores que não aderem a estas orientações.

1. A apresentação não foi publicado anteriormente, nem é antes de outra revista para apreciação (ou uma explicação foi fornecida Comentários ao Editor).
2. O arquivo de submissão estão em OpenOffice, Microsoft Word, RTF ou formato de arquivo de documento do WordPerfect.
3. Quando disponíveis, URLs para as referências foram fornecidas.
4. O texto está em espaço simples; usa uma fonte de 12 pontos; emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); e com figuras e tabelas são colocados dentro do texto nos pontos apropriados, em vez de no final.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#) , que está na seção Sobre a Revista.
6. Se submeter-se a uma seção com revisão por pares da revista, as instruções [Garantir um Blind Review](#) foram seguidas.

## Nota de direitos autorais

Direitos Autorais dos manuscritos publicados pertencem à revista. Uma vez que eles são publicados em uma revista de acesso aberto, eles estão disponíveis gratuitamente, para uso particular ou para ser utilizado para fins educacionais e não-comerciais.

A revista tem o direito de fazer, no documento original, as mudanças em relação as normas linguísticas, ortografia e gramática, com o objectivo de assegurar as normas padrão da língua e a credibilidade da revista. Será, no entanto, respeitar o estilo de escrita dos autores.

Quando necessário, conceituais alterações, correções ou sugestões serão encaminhadas para os autores. Em tais casos, o manuscrito deve ser submetido a uma nova avaliação depois da revisão.

A responsabilidade pelas opiniões expressas nos manuscritos encontra-se inteiramente com os autores.

## Declaração de privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para qualquer outra finalidade ou a qualquer outra parte.