

AValiação Toxicogenética de Amostras de Água para uso em EnsaioS Laboratoriais

TOXICOGENETIC EVALUATION OF WATER SAMPLES FOR USES IN LABORATORY TESTS

¹Mylena Boeque Lascola, ¹Kristian Rodolfo Santos, ¹Sara Nascimento dos Santos, ²Iara da Costa Souza, ²Marisa Narciso Fernandes, ¹Silvia Tamie Matsumoto

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, Vitória/ES. ²Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luiz, km 235, São Carlos, São Paulo
mylenalascola@hotmail.com

RESUMO

Os ensaios biológicos realizados em laboratórios de pesquisa exigem água purificada, todavia, não há uma padronização para bioensaios ecotoxicológicos. Assim, avaliou-se os potenciais toxicogenéticos e mutagênicos de quatro diferentes amostras de água, identificando qual a melhor escolha para bioensaios toxicogenéticos. Sementes de *Allium cepa* Linnaeus 1753. foram germinadas em água destilada, água ultra pura, água mineral e de água abastecimento potável. Foram avaliadas os potenciais: fitotóxico por meio da porcentagem de germinação e crescimento radicular, citotóxico por meio das análises do ciclo celular, genotóxico pela avaliação das alterações cromossômicas e nucleares, e o potencial de mutagenicidade por meio da análise de células com micronúcleo. Os resultados obtidos foram expostos por média e desvio padrão e submetidos a ANOVA, seguida do teste de Tukey. Os resultados foram negativos para toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, todavia, por ter maior grau de pureza, sugere-se que a água ultra pura seja a melhor opção para bioensaios laboratoriais.

PALAVRAS-CHAVE: Ecotoxicologia, mutação, *Allium cepa* L, água potável.

ABSTRACT

Biological tests carried out in research laboratories require purified water, but there is no standardization for ecotoxicological bioassays. Therefore, the toxicogenic and mutagenic potential of four different water samples was evaluated to identify the best choice for toxicogenic bioassays. *Allium cepa* Linnaeus 1753, seeds were germinated in distilled water, ultra-pure water, mineral water and drinking water. The potential for phytotoxicity was evaluated by means of the percentage of germination and root growth, cytotoxicity by means of cell cycle analysis, genotoxicity by assessing chromosomal and nuclear alterations, and the potential for mutagenicity by means of micronucleus cell analysis. The results obtained were presented as means and standard deviations and subjected to ANOVA, followed by the Tukey test. The results were negative for toxicity, genotoxicity and mutagenicity; however, as it has a higher degree of purity, it is suggested that ultra-pure water is the best option for laboratory bioassays.

KEYWORDS: Ecotoxicology, mutation, *Allium cepa* L, drinking water.

INTRODUÇÃO

A água utilizada para fins laboratoriais, requerem pré-requisitos de excelência, como o seu processo de purificação. Muitos minerais presentes em sua composição, como potássio, cloro e cálcio, podem limitar o seu uso em determinados processos, afetando a qualidade dos sistemas teste^{1,2}. Mediante isso, alguns métodos são empregados em rotinas de pesquisa³, de modo que a qualidade dos recursos hídricos responda a parâmetros de referência.

De acordo com o Decreto-Lei nº 7.841, de 08/08/1945 que estabelece o código das águas minerais, considera-se água mineral aquela oriunda de fontes naturais ou artificialmente captadas e que possuam propriedades físico-químicas distintas das águas comuns, apresentando elementos e sais minerais em sua composição⁴. Água de abastecimento potável (ABP) do município de Vitória, Espírito Santo, possui qualidade assegurada pela Companhia Espírito-santense de Saneamento, que garante atender aos rigorosos padrões de potabilidade estabelecidos pelo Ministério da Saúde⁵. Ela é a base para a produção das demais qualidades de água produzidas em laboratório⁶.

O processo de destilação consiste no aquecimento da água, até que atinja o ponto de ebulição, transformando-se em vapor, que é resfriado, voltando novamente ao estado líquido, livre de substâncias e impurezas⁷. Ela é utilizada em preparações laboratoriais^{8,9}, e também em protocolos oficiais de pesquisa, como os da Empresa brasileira de pesquisa agropecuária¹⁰. A água ultra pura é um líquido de elevado nível de pureza, usada em aplicações laboratoriais¹¹⁻¹⁴ livre de endotoxinas e possui um número iônico equilibrado¹⁵. É utilizada em bioensaios que requerem protocolos de altíssima pureza³.

O sistema *Allium cepa* Linnaeus 1753 é um importante bioensaio reconhecido para análise e monitoramento ambiental, que permite avaliação da toxicidade de uma substância, por meio de análises do crescimento radicular e os danos causados a célula, como alterações cromossômicas, surgimento de micronúcleos e desordens do ciclo mitótico⁹. Esse método exige o uso de água tanto para a preparação dos tratamentos quanto para o grupo controle, no entanto, não há um protocolo específico sobre o tipo de água a ser utilizado, apenas protocolos de uso geral³.

Dessa maneira, fez-se necessário avaliação dos quatro diferentes tipos de água: água mineral, ultra pura, destilada e de ABP, a fim de avaliar qual dos solventes apresenta menor potencial genotóxico e mutagênico para não interferência dos resultados no sistema *A. cepa* L.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 4 tipos de amostras de água, água mineral da marca (lote ES23061409), água de ABP do município de Vitória, Espírito Santo, água destilada, e água ultra pura.

Como organismo teste, o modelo vegetal utilizado neste estudo foi a *A. cepa* L, de variedade baía periforme e lote 153901, sem tratamento. O experimento realizado seguiu de acordo com a metodologia de Aragão et al.⁹, onde foram distribuídas 30 sementes em placas de petri, forradas com papel filtro e adicionados as amostras de água, permanecendo até o tempo de germinação de 4 ciclos celulares (96 horas) à temperatura de 24°C. Para cada amostra, foram preparadas 10 repetições de cada.

Após aproximadamente 96 horas (4 ciclos celulares) de exposição, na temperatura de aproximadamente 24° C, foi realizada a contagem do número de sementes germinadas para determinação da porcentagem de germinação. Para o crescimento radicular, as raízes foram mensuradas com auxílio de paquímetro digital e posteriormente fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético), por 24 horas para análises citogenéticas⁹.

Os testes de *A. cepa* L foram realizados para avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade das amostras de água.

Para a análise do ciclo celular as raízes fixadas foram lavadas em água destilada, para retirada do fixador e hidrolisadas em HCl 1M à 60 °C por 8 minutos, seguindo o método de Feulgen¹⁶, onde as raízes foram coradas em reagente de Schiff, por 2 horas em local escuro¹⁷. Após o procedimento de coloração, as lâminas permanentes foram preparadas pela técnica de esmagamento suave, conforme realizado por Aragão et al.¹⁸, utilizando 1 meristema para cada lâmina, com uma gota de carmim acético 2% para evidenciar o citoplasma. Após essa etapa, para confecção de lâminas permanentes, as lâminas foram imersas em nitrogênio líquido para retirada das lamínulas, e finalizadas com verniz⁹.

Foram analisadas 500 células por lâmina e 10 lâminas por tratamento, totalizando 5000 células por procedimento, de acordo com a metodologia adotada por Aragão, et al.⁹. A Citotoxicidade das águas foi determinada pelos seguintes parâmetros: Índice mitótico (IM) e porcentagem de cada fase da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase). A genotoxicidade foi avaliada pela: porcentagem de alterações cromossômicas (AC) e alterações nucleares.

Para a genotoxicidade, foram consideradas alterações cromossômicas nos estágios da divisão celular como: C-metáfase, anáfase multipolar, atraso, aderência, ponte e perda cromossômica e alterações nucleares como: núcleo lobulados, portadores de brotos, células.

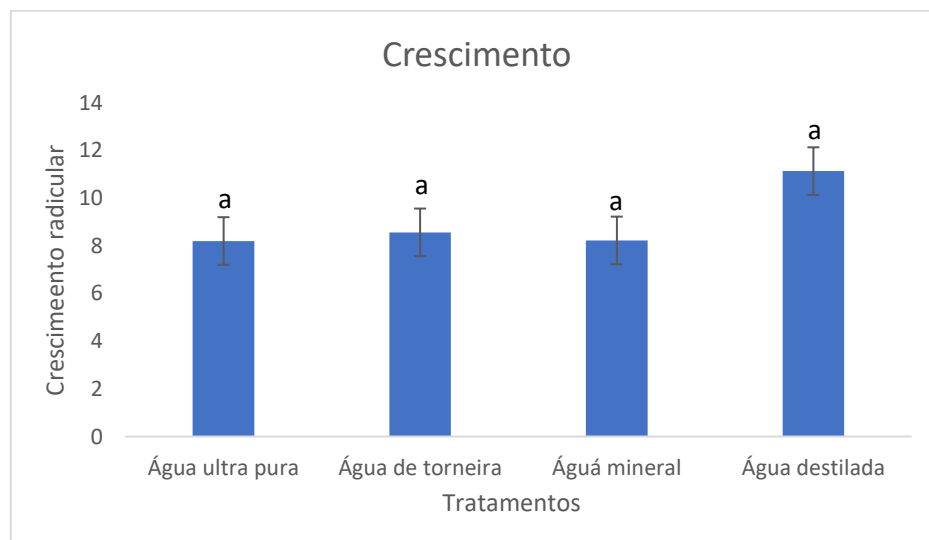
Para mutagenicidade foi considerada a presença de micronúcleo. Os cálculos para análise do índice mitótico, genotoxicidade e mutagenicidade seguiram a metodologia de Aragão, et al.¹⁸.

Os resultados obtidos foram expostos como média \pm desvio padrão. Os dados foram submetidos à ANOVA, seguida do teste de Tukey, por meio do software InfoStat.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

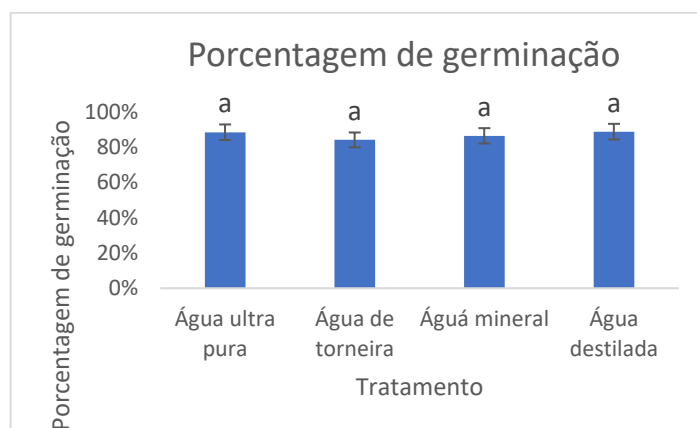
Os resultados observados mostraram que não ocorreu inibição da germinação e do crescimento radicular dos meristemas de *A. cepa* L (Figs. 1 e 2). Os valores observados para porcentagem de germinação das sementes foram próximos entre as amostras, não apresentando diferença significativa, contudo, a água ultra pura apresentou o maior resultado. O crescimento radicular também não mostrou diferença, todavia, a água destilada apresentou o maior valor para este parâmetro. A inibição do crescimento da raiz expressa a toxicidade de um elemento, pois, o contato da semente com a água promove a divisão celular, que possibilitará o crescimento radicular, porém, quando esta possui elementos tóxicos, a divisão será inibida, afetando o alongamento da raiz¹⁹.

Figura 1. Crescimento radicular das raízes de *A. cepa* L germinadas nos diferentes tratamentos de água: água ultra pura, água de ABP, água mineral e água destilada. As colunas contendo letras iguais não diferem estatisticamente no nível de normalidade de 5% de significância, pelo teste Tukey.



Apesar das amostras de água não diferirem estatisticamente, as sementes germinadas em água ultra pura apresentaram os maiores valores de porcentagem de germinação (Figura 2). Por não interferir no crescimento das raízes e não apresentar mutagenicidade e toxicidade, como corroborado com de Almeida et al.²⁰, a água ultra pura possui presença recorrente na preparação e diluição de soluções e tratamento de controle negativo, como observado em experimentos realizados por Zimmermann et al.²¹ e protocolos oficiais da EMBRAPA¹⁰. Esse tipo de água é considerada de alta pureza, porém, é provável que seja impossível deixá-la totalmente livre de moléculas. Ela pode conter pequenos íons e minerais²² presentes em sua composição, o que pode explicar o crescimento e germinação das sementes de *A. cepa* L neste tratamento.

Figura 2. Porcentagem de germinação das sementes de *A. cepa* L germinadas nos diferentes tratamentos de água: água ultra pura, água de ABP, água mineral e água destilada. As colunas contendo letras iguais não diferem estatisticamente no nível de normalidade de 5% de significância, pelo teste Tukey.



As sementes germinadas em água destilada também não diferiram estatisticamente das demais amostras (Figura 2), todavia, apresentaram maior valor de crescimento radicular (Figura 1). Experimentos similares mostraram que seu uso não interferiu no desenvolvimento e germinação de plantas, conforme descrito por Conde et al.²³, Gogoi et al.²⁴, Alves et al.²⁵, Santos et al.⁸ de Freitas, et al.²⁶. O processo de destilação consiste em uma separação, por meio do vapor, dos componentes líquidos, eliminando impurezas da água, porém, o processo não é capaz de eliminar todos os minerais da água²⁷, proporcionando assim, uma água com grau de pureza abaixo da água ultra pura. Um estudo desenvolvido por Conde et al.²³, constatou que este tipo de amostra pode provocar extravasamento de eletrólitos, que consiste em um dano celular causado por estresse²⁸ apesar de não afetar a germinação e o desenvolvimento da planta.

No presente trabalho, as sementes tratadas com água mineral apresentaram bons valores de germinação e crescimento radicular (Figura 1 e 2), mesmo não diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, além de apresentarem ausência de toxicidade. Experimentos com água mineral como controle negativo também mostraram resultados satisfatórios em sistemas de detecção de citotoxicidade e genotoxicidade, conforme discutido por Dantas-Terceiro²⁹, da Silva et al.³⁰. Apesar de estudos mostrarem resultados satisfatórios com o uso da amostra em tratamentos controle, por não possuir nenhum grau de pureza e muitos íons e minerais em sua composição, o seu uso em experimentos pode não ser adequado³.

Na avaliação do ciclo celular, (Tabela 1) não foram observadas alterações significativas nas raízes de *A. cepa* L, o que sugere ausência de toxicidade. As aberrações cromossômicas ocorrem quando a estrutura ou o número de cromossomos é alterado³¹. Avaliando o índice mitótico (Tabela 1), não foram observadas alterações significativas. Esse parâmetro indica se as células mantêm sua divisão ainda que na presença de algum agente, sendo utilizado como parâmetro para determinar a citotoxicidade de substâncias³¹.

Tabela 1. Parâmetros de índice mitótico (IM%) e divisão celular em células meristemáticas de *Allium cepa* L expostas durante 96 h ao tratamento de água ultra pura, mineral, destilada e de ABP.

Tratamentos	Índice mitótico (%)
Água Ultra pura	26,24 ± 10,84 ^a
Água Mineral	39,31 ± 12,56 ^a
Água Destilada	36,28 ± 15,20 ^a
Água de ABP	41,90 ± 13,50 ^a

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Não é comum observar estudos que utilizem a água de ABP em rotinas laboratoriais, devido ao seu grau de purificação. Segundo Costa³², a presença de íons inorgânicos, gases e substâncias orgânicas de baixo peso molecular a tornam não apropriada para bioensaios. No presente trabalho, ela demonstrou não ocasionar danos ao DNA e não inibiu a germinação e o crescimento das raízes de *A. cepa* L (Figuras 1 e 2), porém, ela pode conter microrganismos que não afetarão o ciclo celular dos vegetais, mas, acondicionarão a planta à níveis de contaminação³². Estudos realizados com amostras de água usadas para consumo doméstico em algumas cidades do Brasil, constataam a

presença de coliformes e *Escherichia coli*, sendo a presença desses organismos em quantidade superior à permitida por órgãos regulamentadores³⁴.

CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos, conclui-se que o uso das águas: mineral, ABP, destilada e ultra pura não apresentaram toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

Devido à sua composição e menor grau de pureza, as águas ABP e a mineral tornam-se menos indicadas para execução de experimentos laboratoriais. A água destilada não interfere na germinação e no crescimento de sementes, todavia, em sua composição existem minerais que a destilação não é capaz de remover. Sendo assim, devido ao seu alto grau de pureza a água ultrapura é a melhor opção para bioensaios vegetais.

REFERÊNCIAS

1. Valdivia-Medina, RY, Pedro-Valdés, S, Laurel-Gómez, M. Água para uso en laboratorios. Boletín Científico Técnico INIMET. 2010; (1): 3-10. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223017807002>.
2. Cirilo, NRM, Arriel, EF, Gomes, VF, Costa, GA, Oliveira, Junior, JA, Leite, J A, Arriel, LC. Water quality in the rooting of *Allium cepa* L. in a hydroponic system for the study of mitosis. Brazilian Journal of Development. 2019; 5(12), 29405–29416. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n12-097>.
3. Sperotto, RA. Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana. Editora da Univates. Lajeado-RS. 2014; 329 (1).
4. Tavares, RG, Santos Gusmão, AC, Oliveira Silva, R de S, do Monte Silva, GF, Batista de Andrade, PK, Rocha, EA. Alteração físico-química da água para consumo humano após uso de filtros domésticos. Revista Geama. 2020; 6(1), 58–63. <https://www.journals.ufrpe.br/index.php/geama/article/view/3411>.
5. Cesan, Companhia Espírito Santense de Saneamento. Nota da Cesan sobre a qualidade da água. Vitória. 2024. https://www.cesan.com.br/_news-cesan-/nota-da-cesan-sobre-a-qualidade-da-agua.
6. de Carvalho, PLN, Abjaude, SAR., Hipolito, TMM., dos Reis Lopes, A, do Nascimento, LC, Veiga, SMOM. Água purificada para laboratório: qualidade microbiológica, formação de biofilme e uso do ozônio como sanificante alternativo. Revista da Universidade Vale do Rio Verde. 2012; 10(2), 260-269. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5033153>.

7. Simões, FAF, de Freitas, CAS, Feitosa, RGF, da Costa Santos, YT, Costa, LDA, de Oliveira Pinho, C, dos Santos, SP. Potencial de reúso das águas de resfriamento de destiladores laboratoriais. *Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias Ambientais*. 2020; 180-194.
8. Santos, KR, Galter, IN, Grecco, KD, Silva, EZM, Lascola, MB, Dos Santos, SN, Matsumoto, ST. Toxicogenetic, biochemical, and anatomical effects of the herbicide Clethodim on *Allium cepa* L. *Environmental Science and Pollution Research*. 2023; 30(60), 125388-125397. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-31048-9>.
9. Aragão, FB, Galter, IN, Grecco, KD, Coelho, EJR, da Silva, TT, Bonomo, MM, Matsumoto, ST. Toxic risk evaluation of effluents from a swine biodigester in the plant models *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2024; 196(1), 64. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-12173-x>.
10. Embrapa. Método Simplificado para Determinação de Glifosato e Ácido Aminometilfosfônico em Águas Superficiais. 2023; 94; 1679-0456. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1158146/1/BP-94-2023-CPAO-1.pdf>.
11. da Cunha, LS, da Silva, LP, de Castro, MS, de Souza, PG. Tratamento de água para utilização em processo anti-risco de lentes oftálmicas / Water treatment for use in anti-risk process of ophthalmic lenses. *Brazilian Journal of Development*. 2021; 7(4), 37437–37449. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n4-284>.
12. Bezerra-Filho, LEA. Caracterização da água produzida associada ao petróleo na indústria petrolífera do Rio Grande do Norte. 2020. Disponível em <https://repositorio.ufersa.edu.br/server/api/core/bitstreams/63606a56-f440-448a-a2ec-9fce69fdb6c8/content>.
13. Rittershaussem, GP, Silva, LIDD, Vera, YM. Determinação de elementos terras-raras em soluções contendo ácido cítrico utilizando ICP-OES. 2017.
14. Vieira, MG, Steinke, G, Arias, JLO, Primel, EG, Cabrera, LCC (2017). Avaliação da contaminação por agrotóxicos em mananciais de municípios da região sudoeste do Paraná. *Revista Virtual de Química*. 2017; 9(5), 1800-1812.
15. Machado, FM. Avaliação do uso de nanopartículas de prata e atividade antimicrobiana para tratamento de águas. 2012.
16. Mello, MLS, de Campos Vidal, B. The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives. *Acta histochemica*. 2017; 119(6), 603-609. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.07.002>.
17. Malini, M, Marin-Morales, MA, Mantovani, MS, Jamal, CM, Nati, N, Passos, TDS, Matsumoto, ST. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. *Genetics and molecular biology*. 2010; 33, 176-181. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000106>.

18. Aragão, FB, Palmieri, MJ, Ferreira, A, Costa, AV, Queiroz, VT, Pinheiro, PF, Andrade-Vieira, LF. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Allelopathy Journal*. 2015; 35(1), 259-272.
19. Porto, AS, da Silveira, LB, dos Santos, JG. Silver nanoparticles synthesized by combustion reaction and toxicity studies by changes in radicular growth of *Allium cepa* Nanopartículas de prata sintetizadas por reação de combustão e estudos de toxicidade por alterações no crescimento radicular de *Allium cepa*. *Brazilian Journal of Development*. 2022; 8(4), 28826-28837. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n4-397>.
20. Grippa, A, Morozesk, M, Nati, N, Matsumoto, ST. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Toxicologia*. 2010; 23(1-2), 11-16.
21. Zimmermann, LOG, Silva, DC, Costa, MRL, Tiggemann, HM. Proposta de metodologia analítica para determinação de Arsênio e Selênio em sacarina sódica dihidratada pela técnica de HG-ICP OES. *Revista JRG De Estudos Acadêmicos*. 2023; 6(13), 716-730. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8028618>.
22. Zhang, X, Yang, Y, Ngo, HH, Guo, W, Wen, H, Wang, X, Long, T. A critical review on challenges and trend of ultrapure water production process. *Science of The Total Environment*. 2021; 785, 147254. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147254>.
23. Conde, TT, da Cunha Codognoto, L, Faria, GA, Maltoni, KL. Resposta fisiológica de sementes de alface imersas em águas destilada e piscicultura. *Brazilian Journal of Development*. 2021; 7(4), 37490-37499. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n4-288>.
24. Gogoi, JYOT, Karabi, D, Dutta, PA. Effect of preservatives and pesticides on mitotic index of *Allium cepa* roots-biological model experiment for genotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021; 40(3), 777-781.
25. Alves, RH, dos Reis Wickert, MFO, Fernandes, GR, Hojo, ETD, Marreiros, EO. Uso de diferentes doses de stimulate® em sementes de trigo. *Anais do City Farm*. 2022; 1(1).
26. de Freitas, LGDR, dos Reis, HS, Magalhães, SBS, da Rocha, CAM, da Silva, FPE. Ecotoxicidade da água do canal Água Cristal (Marambaia, Belém, Pará, Brasil): utilizando o sistema teste *Allium cepa* como bioindicador. *Revista Brasileira de Meio Ambiente*. 2023; 11(2). <https://doi.org/10.5281/zenodo.8023617>.
27. Sriwijayasih, I, Novianarenti, E, Ramadani, TA, Leonard, R. Calcule a eficiência térmica de um evaporador de água destilada usando água limpa como matéria-prima: Calcule a eficiência térmica de um evaporador de água destilada usando água limpa como matéria-prima. *Jornal de Tecnologia Mecânica, Elétrica e Industrial*. 2024; 1(1): 33-39.
28. Taroco, HÁ, Ribeiro, LV, Reina, LDCB, Silva, MR, Melo, MLOF, Silva, VD M, Finger, FL. Efeito da temperatura e meja na massa fresca e extravasamento de eletrólitos de flores de corte de ave do paraíso. *Agricultura em foco: tópicos em manejo, fertilidade do solo e impactos ambientais-volume*. 2020; 1, 1(1), 152-156.

29. Dantas-Terceiro, AJM, Oliveira, MAS. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do infuso das folhas de *Lippia sidoides* (Verbenaceae). Revista Ciência E Estudos Acadêmicos De Medicina. 2020; 1(12).
30. da Silva, GR, de Oliveira, AJ, de Oliveira, TC, Karsburg, IV, da Silva, EL, da Silva Almici, M. Detecção da citotoxicidade e genotoxicidade do extrato de myrcia multifloraem bioindicador *allium sativum*. Pesquisa e desenvolvimento de abordagens para o ensino de ciências biológicas. 2021; 76.
31. Leme, DM0, Marin-Morales, MA. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutation research/reviews in mutation research*. 2009; 682(1), 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>.
32. Costa, SS. Avaliação do desempenho de membrana de osmose inversa na produção de água pura para uso laboratorial: estudo de caso do if goiano-campus rio verde; 2021.
33. Bitencourt, MLR, Indriunas, A, dos Santos, JG. Qualidade microbiológica de plantas medicinais comercializadas no município de Taubaté, São Paulo. Revista Biociências; 2023, 29(2).
34. de Oliveira, AF, Rodrigues, RB, da Costa Silva, ME, de Farias Martins, JP. Avaliação da contaminação de nitrato e *Escherichia coli* em água subterrânea no município de Carapicuíba (SP). Health Science Institute. 2021; 38(2), 107-16.