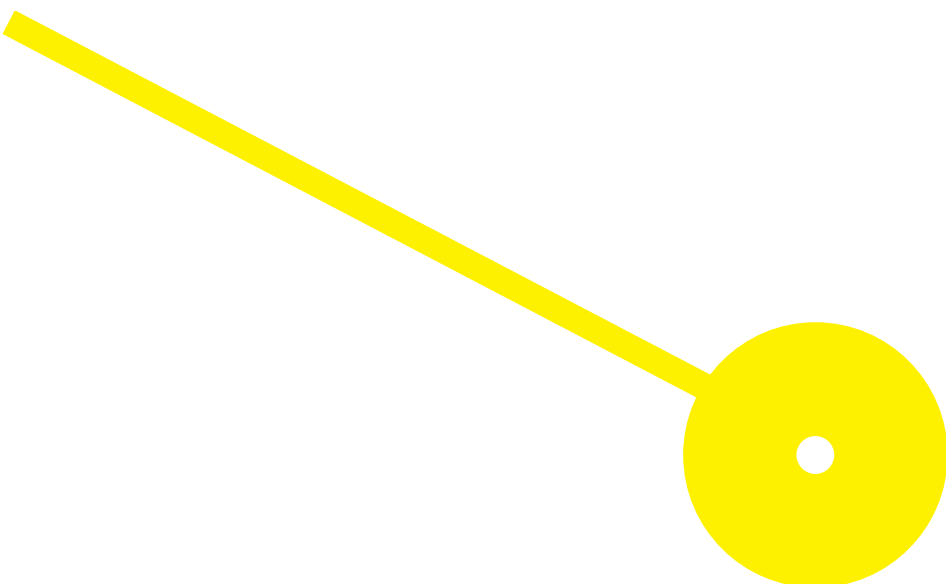




Efeitos colaterais de correntes de alta frequência: Estudo randomizado controlado em organismos modelo

Inês Costa Pontes

06/2023





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



Efeitos colaterais de correntes de alta frequência: Estudo randomizado controlado em organismos modelo

Autor:

Inês Costa Pontes

Orientadores:

PhD/ Piedade Aurora Gonçalves de Barros/ ATC Ciências Morfológicas. Centro de Investigação em Saúde e Ambiente – Escola Superior de Saúde, Politécnico do Porto

PhD/ Andreia Raquel Santos Noites Soares de Pinho/ ATC Fisioterapia – Área Técnico-Científica de Fisioterapia. Centro de Investigação e Reabilitação – Escola Superior de Saúde, Politécnico do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Fisioterapia Dermatofuncional pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Começo por agradecer à minha família, que foram fundamentais nesta minha jornada de académica. Agradeço de coração pelo amor incondicional, apoio constante e paciência ao longo de todo o processo. Tudo o que sou hoje, devo-o a eles.

Ao meu namorado e noivo, Eduardo, sou imensamente grata pela sua compreensão, incentivo e presença constante ao meu lado. O seu apoio inabalável e confiança em mim foram cruciais para superar os desafios encontrados.

À minha orientadora Prof.^a Dra. Piedade Barros, à co-orientadora Prof.^a Dra. Andreia Noites, ao Professor Rubim Santos e ao Professor Carlos Crasto, a vossa experiência e conhecimento foram inestimáveis para o sucesso desta pesquisa.

À minha colega de investigação, Inês Lameira, com quem tive o gosto de partilhar as dificuldades e desafios deste projeto, bem como celebrar as conquistas, tornou esta jornada muito mais enriquecedora.

À Mariana que foi incansável na ajuda que prestou no Centro de Investigação em Saúde e Ambiente.

E aos meus amigos, o meu agradecimento especial pela amizade sincera e compreensão nesta fase tão desafiante.

Resumo

Introdução: Há muito se discute a existência de efeitos colaterais da utilização de micro-ondas e terapia T.E.C.A.R. em Fisioterapia. No entanto, poucos são os estudos desenvolvidos com o objetivo de reconhecer os efeitos colaterais adjacentes à sua utilização. **Objetivo:** Avaliar os efeitos colaterais da alta frequência em organismos *Daphnia magna*. **Metodologia:** Foram utilizadas 45 *Daphnia magna* com dez dias de idade, distribuídas aleatoriamente por 3 grupos (n=15): grupo experimental exposto a terapia T.E.C.A.R. (GE_T) com frequência de 448kHz; grupo experimental exposto a microondas (GE_M) com frequência de 2450 MHz; grupo de controle (GC). Cada grupo experimental foi submetido a duas exposições. Os três grupos foram mantidos nas mesmas condições de cultura. Durante 21 dias, foram registados diariamente os valores relativos à sobrevivência, crescimento e reprodução. A resposta sensório-motora foi avaliada no 11^o (M1), 13^o (M2) e 31^o dia de idade (M3). Foram utilizados os testes Shapiro-Wilk e o Kruskal-Wallis, seguido das comparações múltiplas de Dunn, com um nível de significância de 0,05. **Resultados:** Na sobrevivência não se verificaram diferenças significativas. No crescimento, o GE_T apresentou dimensões significativamente superiores do que os restantes grupos (p<0,001). No GE_M relativamente à resposta sensório-motora, observaram-se diferenças significativas entre os grupos na distância percorrida em M1 (p=0,007) e em M3 (p=0,049) e a reprodução deste grupo foi significativamente inferior (p<0,001). **Conclusão:** Observaram-se efeitos colaterais que interferem no crescimento, resposta sensório-motora e na reprodução das *Daphnia*.

Palavras-chave: Alta Frequência; Fisioterapia; Efeitos colaterais; *Daphnia magna*

Abstract

Introduction: The existence of side effects in the use of microwaves and T.E.C.A.R. therapy in Physiotherapy has been discussed for a long time. However, there are studies developed with the aim of recognizing the side effects adjacent to their use. **Objective:** Evaluate the side effects of high frequency using the organism *Daphnia magna*. **Methodology:** 45 ten-day-old *Daphnia magna* were used, randomly distributed in 3 groups (n=15): the T.E.C.A.R. therapy experimental group (GE_T) with 448kHz frequency; in the microwave therapy experimental group (GE_M) with 2450 MHz frequency; in the control group (CG). Each experimental group was subjected to two exposures. The three groups were maintained under the same culture conditions. During the 21-day period, survival, growth and reproduction values were recorded daily. The sensory-motor response was evaluated on the 11th (M1), 13th (M2) and 31st day of age (M3). Shapiro-Wilk and Kruskal-Wallis tests were used, followed by Dunn's multiple comparisons, with a significance level of 0.05. **Results:** In terms of survival, no significant differences were found. For growth, the GE_T presented significantly larger dimensions than the other groups (p<0.001). In the GE_M regarding the sensorimotor response, significant differences were observed between the groups in the distance travelled in M1 (p=0.007) and in M3 (p=0.049) and reproduction of this group was significantly lower (p<0.001). **Conclusion:** Side effects that interfere in *Daphnia* growth, sensory-motor response and reproduction, were observed.

Keywords: High frequency; Physiotherapy; Side effects; *Daphnia magna*

Índice

1.	Introdução.....	1
2.	Metodologia.....	5
2.1.	Desenho de estudo.....	5
2.2.	Amostra.....	5
2.3.	Instrumentos.....	6
2.3.1.	Instrumentos de avaliação.....	6
2.3.2.	Equipamentos de Fisioterapia.....	6
2.4.	Procedimentos.....	7
2.4.1.	Estudo Piloto.....	7
2.4.2.	Procedimento experimental.....	8
2.4.2.1	Sobrevivência.....	9
2.4.2.2	Crescimento.....	9
2.4.2.3	Resposta sensório-motora.....	10
2.4.2.4	Reprodução.....	11
2.5.	Procedimentos estatísticos.....	12
3.	Resultados.....	14
3.1.	Sobrevivência.....	14
3.2.	Crescimento.....	15
3.3.	Resposta sensório-motora.....	16
3.4.	Reprodução.....	16
4.	Discussão.....	18
5.	Conclusão.....	24
	Referências Bibliográficas.....	25
	ANEXOS.....	32

Índice de abreviaturas

Cm – Centímetro

kHz – Kilohertz

MHz – Megahertz

mL – Mililitro

mm – Milímetro

°C – Grau Celsius

s – Segundo

W – Watt

1. Introdução

Atualmente, muitas são as tecnologias utilizadas na Fisioterapia, nomeadamente na área Dermatofuncional, que tornam os tratamentos mais eficazes. Embora os seus efeitos terapêuticos e benefícios sejam, maioritariamente, bem documentados, poucos são os estudos desenvolvidos com o objetivo de reconhecer os efeitos colaterais. Estes têm por definição “efeito diferente daquele efeito principal expectável (...) assim, um efeito colateral pode ser benéfico ou indiferente, e não necessariamente adverso, indesejável” (Noël, 2013).

Entre as estratégias utilizadas na Fisioterapia Dermatofuncional, surge a eletroterapia de alta frequência que é, muitas vezes, utilizada como uma ferramenta para a redução da gordura localizada e flacidez tecidual (Bonan et al., 2019; Tassinari et al., 2019). A eletroterapia de alta frequência engloba todas as tecnologias de fisioterapia que utilizam frequências superiores a 100000 Hz. As tecnologias de alta frequência, nomeadamente, as microondas e a terapia por Transferência Eletromagnética Capacitiva e Resistiva (T.E.C.A.R.) são bastante eficazes para obter um efeito térmico. Estes aparelhos são muitas vezes designados de aparelhos de diatermia pois caracterizam-se pelo facto de as ondas eletromagnéticas provocarem calor por rotação de dipolos, produzindo inúmeros efeitos terapêuticos, tais como: aumento da taxa metabólica, aumento do fluxo sanguíneo, promove a redução da inflamação do tecido conjuntivo, diminuição da rigidez articular, alívio da dor e espasmos nos tecidos profundos e mudanças na excitabilidade neural (Cordero, 2008; Kitchen, 2003).

A diatermia por microondas produz calor através da conversão de energia eletromagnética de alta frequência, proporcionando o aumento da energia cinética nas moléculas. Tem capacidade de aquecer os tecidos que são mais vascularizados, uma vez que a radiação é absorvida seletivamente pela água neles presente e, por isso, os seus efeitos biológicos dependerão fundamentalmente da estrutura dos tecidos que atravessam, ou seja, das suas propriedades elétricas e conteúdo de água, como é o caso do tecido muscular, vasos sanguíneos, pele e órgãos, o que permite o seu aquecimento seletivo e homogéneo (Cordero, 2008; Ortega et al., 2014). Segundo a Décima Quarta Comissão Federal de Comunicações, para que sejam consideradas microondas com efeitos terapêuticos, estas devem possuir frequências entre 915 MHz e 2450 MHz

(Cameron, 2012). A frequência de microondas comumente usada é centrada em aproximadamente 2,45 GHz, que está dentro da banda de rádio *Industrial Scientific and Medical (ISM)* e é reservada para tais propósitos (Gartshore et al., 2021). Essencialmente, quanto maior for o teor de água do tecido, maior a absorção. A especificidade de ter uma frequência mais alta faz com que tenha menor poder de penetração e, por isso, o calor permanece em tecidos superficiais (Cordero, 2008; Ortega et al., 2014).

A terapia T.E.C.A.R. é uma corrente elétrica sinusoidal que oscila a frequências de rádio nos tecidos entre um eletrodo ativo (capacitivo ou resistivo) e uma placa dispersiva colocada de forma distante à zona de aplicação, sendo gerada por um equipamento de radiofrequência monopolar com frequências entre 250 e 1200 KHz, frequências bastante mais baixas quando comparadas com a terapia por ondas curtas e microondas. As ondas ao atravessar os tecidos geram campos magnéticos oscilantes que movem cargas eletricamente carregadas, produzindo calor, sendo que a quantidade de calor produzida depende da bioimpedância dos tecidos alvo (Lei de Joule). O modo contínuo causa, normalmente, níveis de aquecimento superiores em comparação com o modo pulsado, resultando em vários efeitos como: o aumento da temperatura da pele, vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo superficial e profundo, aumento da saturação de hemoglobina, diminuição do edema, alterações viscoelásticas dos tecidos e aumento da proliferação celular, com benefícios clínicos associados como a diminuição da dor e melhoria da função (Beasley & Weiss, 2014; Bito et al., 2019; Clijsen et al., 2020; Fousekis et al. 2020; Grimnes & Martinsen 2000; Kotnik & Miklavcic, 2000; Kumaran & Watson, 2020; Levy et al., 2016; López-De-Celis et al., 2020; Sadick et al., 2016; Trillo et al., 2021; Yokota et al., 2018; Zati et al., 2018). De acordo com a bibliografia existente, a maioria dos estudos apontam para a utilização no modo contínuo nas duas tipologias de aplicação, primeiramente o modo capacitivo, durante cinco minutos, seguida do modo resistivo por dez minutos, totalizando quinze minutos por zona anatômica (Bito et al., 2019; Bito et al., 2020; Bretelle et al., 2020; Cau et al., 2019; Kumaran et al., 2017; Kumaran & Watson, 2018a; Kumaran & Watson, 2018; Kumaran & Watson, 2020; Pavone et al., 2017; Tashiro et al., 2017; Yokota et al., 2018).

De modo a estudar os efeitos colaterais destes equipamentos de fisioterapia, surge a necessidade de utilizar um organismo animal que seja modelo laboratorial, com estrutura e manutenção simples e de curto ciclo de vida. O crustáceo *Daphnia magna*

apresenta inúmeras características que fazem deste organismo um potencial modelo de estudo: é uma espécie diploide, partenogenética, com uma vida útil média relativamente curta (~50-100 dias, dependendo das condições ambientais), tem um curto período entre ciclos reprodutivos (por exemplo, uma fêmea pode produzir uma ninhada de 1-25 neonatos a cada três dias) e o seu genoma e plano corporal complexo são significativamente mais homólogos aos humanos do que outros organismos, permitindo a análise de manifestações de envelhecimento específicas de tecidos relevantes para humanos (Dudycha, 2003; Dudycha & Tessier, 1999; Ebert, 2005; Kim et al., 2014; Robinson et al., 2012; Smirnov, 2017).

Daphnia magna, comumente chamadas de “pulgas de água”, são crustáceos filtradores que possuem como principais características externas um olho único e um par de antenas ramificadas que permitem a sua locomoção. Possuem também uma carapaça transparente com função de proteção do tórax e do abdômen. Esta zona, para além de conter o coração, o tubo digestivo e vários pares de apêndices locomotores, que estão também envolvidos no processo de alimentação, aloja a câmara incubadora onde se desenvolvem os ovos diploides resultantes de reprodução assexuada que ocorre quando existe abundante alimento e condições ambientais favoráveis. Estes organismos são partenogenéticos, as fêmeas reproduzem-se assexuadamente originando descendentes geneticamente idênticos (Kim et al., 2014). Contudo, são capazes de mudar o seu modo de reprodução para reprodução sexuada em resposta a condições ambientais desfavoráveis. Fatores ambientais como curta duração do dia, depleção de alimentos e elevada densidade populacional são conhecidos como chaves para o início da reprodução sexuada (Tatarazako & Oda, 2017).

Estes organismos aquáticos são amplamente utilizados em investigação há várias décadas, especialmente em testes de avaliação da toxicidade. Mais recentemente, começaram a ser utilizados para avaliar agentes e riscos ambientais, por exemplo, na área da poluição sonora, onde foi possível concluir que as vibrações produzidas por sons de alta frequência desencadeiam efeitos prejudiciais em *Daphnia*, dependendo da intensidade e duração com que são aplicados (Yagcilar & Yardımcı, 2021).

Na área da Fisioterapia, a par dos avanços tecnológicos que ocorrem transversalmente em vários contextos, surge também a necessidade de entender de que forma a aplicação dos diversos aparelhos interfere com o meio envolvente.

O presente estudo tem como objetivo entender os possíveis efeitos colaterais da alta frequência, nomeadamente do equipamento de microondas e terapia T.E.C.A.R. em fisioterapia, a partir de um estudo em organismos modelo.

2. Metodologia

2.1. Desenho de estudo

Trata-se de uma investigação de natureza quantitativa, sendo um estudo experimental randomizado controlado que compreende três grupos distintos: dois grupos experimentais e um grupo de controlo, cuja distribuição de participantes é aleatória. Realizado conforme as normas de Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT), este estudo foi desenvolvido no Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA) da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Porto, Portugal.

2.2. Amostra

O organismo modelo escolhido foi a *Daphnia magna* e a escolha da amostra foi do tipo randomizada, atendendo aos critérios de inclusão da pesquisa. O princípio da randomização foi realizado de forma simples e baseado na condição de que os participantes de um determinado estudo tenham a mesma probabilidade de receber tanto a intervenção a ser testada quanto o seu controlo (Collins et al., 1996).

Para a seleção da amostra foram estabelecidos como critérios de inclusão, especificamente, juvenis de *Daphnia* com dez dias de idade provenientes de fêmeas progenitoras que se reproduziram por partenogénese em laboratório, em condições constantes e otimizadas de temperatura, fotoperíodo e alimentação, visando garantir o mesmo padrão para todos os descendentes (OECD, 2004; OECD, 2012). Por outro lado, foram excluídas da amostra, os organismos que tivessem morrido até ao momento da aplicação da tecnologia.

A amostra final foi constituída por quarenta e cinco *Daphnia* da população alvo, sendo que nenhuma foi excluída. Quinze *Daphnia* foram alocadas no Grupo de Controlo (GC), outras quinze *Daphnia* foram designadas para o Grupo Experimental exposto a terapia T.E.C.A.R. (GE_T) e as quinze *Daphnia* restantes foram colocadas no Grupo Experimental exposto a microondas (GE_M).

2.3. Instrumentos

2.3.1. Instrumentos de avaliação

Lupa LEICA ZOOM 2000 – LEICA MICROSYSTEMS®:

Durante toda a experiência, foi utilizada a lupa LEICA ZOOM 2000, fabricada pela LEICA MICROSYSTEMS®, para observação dos juvenis.

Câmara de filmar CASIO HIGH SPEED EXILIM EX-FC100:

Utilizou-se a câmara de filmar CASIO HIGH SPEED EXILIM EX-FC100, para registar o movimento das *Daphnia*.

Microscópio LEICA ICC50 HD:

Para visualização das carapaças recolhidas durante a experiência, utilizou-se o microscópio LEICA ICC50 HD, equipado com uma objetiva HI Plan 10x.

KINOVEA 9.5:

O programa KINOVEA 9.5, foi utilizado para a análise do comportamento sensório-motor das *Daphnia*. Este software possibilitou o cálculo da distância percorrida e da velocidade das *Daphnia*.

LEICA ACQUIRE 3.4.7:

Utilizou-se o programa LEICA ACQUIRE, versão 3.4.7, para fotografar as carapaças recolhidas durante a experiência e medir o exopódito¹ das mesmas.

2.3.2. Equipamentos de Fisioterapia

Micro Zimmer Elektromedizin da marca Zimmer MedizinSysteme GmbH®, frequência de 2450 MHz ± 25 MHz.

Indiba Activ 902®, frequência de 448 kHz monopolar.

¹ Estrutura anatómica encontrada na segunda antena da *Daphnia magna*

2.4. Procedimentos

2.4.1. Estudo Piloto

Foi realizado um estudo piloto para testar a sobrevivência das *Daphnia* e prever a viabilidade do estudo na resposta à alta frequência, nomeadamente, microondas e terapia T.E.C.A.R.. Para a cultura e reprodução de *Daphnia*, foi utilizado o meio de cultura M4 (Anexo 1) (Elendt & Bias, 1990). Os organismos foram mantidos em frascos de vidro graduados da marca Duran Schott® de capacidade de 500 mL com 400 mL de meio; o meio foi renovado em dias alternados; as culturas foram feitas à temperatura de $20 \pm 1^\circ \text{C}$, e fotoperíodo de catorze horas de luz e dez horas de escuro. A alimentação diária foi composta por células da microalga *Chlorella vulgaris*, na concentração de 3×10^5 células/mL de meio. Para composição da amostra do estudo piloto, foi necessário isolar duas fêmeas e aguardar que estas libertassem descendentes. Foram utilizadas trinta *Daphnia* com idades heterogêneas, distribuídas equitativa e aleatoriamente por dois frascos 500 mL de meio de cultura M4.

Os organismos foram distribuídos por três frascos, dez *Daphnia* para o grupo experimental do equipamento de terapia T.E.C.A.R., dez para o grupo experimental do equipamento de microondas e dez para o grupo de controlo.

Um frasco com dez *Daphnia* foi submetido ao equipamento de microondas, aplicado à distância de trinta centímetros do equipamento de microondas e do fisioterapeuta que administrou a terapia. O tratamento aplicado teve as seguintes especificações: modo de frequência pulsado, intensidade de 50 W, durante um tratamento com duração de vinte minutos (Ortega et al., 2014). Paralelamente, outro frasco foi exposto a um tratamento de terapia T.E.C.A.R., onde os organismos foram colocados a trinta centímetros do aparelho e do fisioterapeuta que administrou a terapia, no modo de frequência contínuo durante quinze minutos – cinco minutos no modo capacitivo seguido de dez minutos no modo resistivo – com os elétrodos de 55 mm de diâmetro (Bito et al., 2019; Bito et al., 2020; Bretelle et al., 2020; Cau et al., 2019; Kumaran et al., 2017; Kumaran & Watson, 2018; Kumaran & Watson, 2020; Pavone et al., 2017; Tashiro et al., 2017; Yokota et al., 2018). O frasco correspondente ao grupo de controlo, não foi exposto a qualquer tratamento. Porém, foi submetido às mesmas condições ambientais e de manutenção dos grupos anteriores. Os parâmetros utilizados foram baseados na prática

clínica em fisioterapia e na evidência científica disponível (Bito et al., 2019; Bito et al., 2020; Bretelle et al., 2020; Cau et al., 2019; Kumaran et al., 2017; Kumaran & Watson, 2018; Kumaran & Watson, 2020; Ortega et al., 2014; Pavone et al., 2017; Tashiro et al., 2017; Yokota et al., 2018).

A avaliação da sobrevivência dos organismos foi realizada após 24 horas e 48 horas da exposição. As *Daphnia* foram consideradas mortas quando não ocorriam movimentos dos organismos, durante pelo menos 15 segundos, na presença de um estímulo luminoso.

2.4.2. Procedimento experimental

A amostra do estudo foi composta por 45 *Daphnia*, obtidas em culturas laboratoriais em condições controladas de acordo com a norma OECD (2012) e OECD (2004). Foram utilizados organismos com dez dias de vida, geneticamente idênticos, obtidos por partenogênese a partir de fêmeas isoladas previamente e mantidas em laboratório, em condições controladas. Estas características foram definidas por questões práticas e de sensibilidade. Tal como realizado no estudo piloto prévio, os organismos foram mantidos em laboratório com um fotoperíodo de catorze horas de luz e dez horas de escuro, onde o meio foi renovado em dias alternados e as culturas foram realizadas à temperatura de $20 \pm 1^\circ$ C. A alimentação diária foi composta por células da microalga *Chlorella vulgaris*, na concentração de 3×10^5 células/mL de meio.

Para a avaliação, quinze organismos foram expostos ao tratamento de microondas, quinze expostos ao tratamento de terapia T.E.C.A.R. e os restantes quinze foram utilizados para grupo controlo. Desta forma, 45 *Daphnia* foram transferidas, cuidadosamente, com o auxílio de uma pipeta de plástico, para frascos de 100 mL, com meio M4. Foram realizados dois momentos de exposição a cada corrente, o primeiro ao décimo dia de vida e, o segundo momento, ao décimo segundo dia de vida.

Cada organismo foi colocado num frasco, previamente etiquetado, a fim de se proceder ao protocolo de exposição.

No grupo experimental de microondas (GE_M), quinze *Daphnia* foram submetidas a um tratamento com o equipamento de microondas, onde foram colocadas a trinta centímetros do equipamento de microondas e do fisioterapeuta que administrou a terapia. As especificações do tratamento aplicado foram as seguintes: modo de frequência

pulsado, intensidade de 50 W, durante um tratamento com duração de vinte minutos (Ortega et al., 2014). Passadas quarenta e oito horas, o processo foi repetido, tendo sido, as mesmas quinze *Daphnia*, submetidas novamente ao mesmo tratamento.

No grupo experimental de terapia T.E.C.A.R. (GE_T), quinze *Daphnia* foram colocadas a trinta centímetros do aparelho de terapia T.E.C.A.R. e do fisioterapeuta que administrou a terapia com os seguintes parâmetros: modo de frequência contínuo, durante quinze minutos - cinco minutos no modo capacitivo seguido de dez minutos no modo resistivo - com os elétrodos de 55 mm de diâmetro (Bito et al., 2019; Bito et al., 2020; Bretelle et al., 2020; Cau et al., 2019; Kumaran et al., 2017; Kumaran & Watson, 2018; Kumaran & Watson, 2020; Pavone et al., 2017; Tashiro et al., 2017; Yokota et al., 2018). Passadas quarenta e oito horas, o processo foi repetido, tendo sido, as mesmas quinze *Daphnia*, submetidas novamente ao mesmo tratamento.

Os quinze organismos, pertencentes ao grupo de controlo (GC), não foram submetidos a qualquer tratamento. Contudo, estiveram sujeitos às mesmas condições ambientais e de manutenção os grupos anteriores.

Após as exposições a microondas e à terapia T.E.C.A.R., cada *Daphnia* foi individualmente colocada num frasco de 100 mL, com 80 mL de meio de cultura, mantidas em condições iguais às descritas para a manutenção das culturas, para posterior avaliação da sobrevivência, crescimento, reprodução e resposta sensório-motora.

A avaliação dos organismos foi realizada diariamente, até aos 21 dias após a exposição inicial (OECD, 2004, 2012).

2.4.2.1 Sobrevivência

Com o objetivo de avaliar a sobrevivência da *Daphnia*, foi realizado um registo diário dos organismos até ao momento da sua morte ou até completarem 21 dias de experiência (Anexo 2).

2.4.2.2 Crescimento

Para a determinação do crescimento, foram recolhidas as carapaças de todos os organismos durante o período de 21 dias, iniciando-se a recolha ao décimo dia de vida. Deste modo, as carapaças recolhidas foram colocadas separadamente em tubos Eppendorf devidamente identificados e procedeu-se à sua congelação de modo a preservar as mesmas até à avaliação. No momento de avaliação, e após o seu

descongelamento, procedeu-se à medição do primeiro exopódito da segunda antena das carapaças libertadas após a primeira postura², ao décimo terceiro dia de idade, e a última postura de cada *Daphnia*, ao vigésimo nono dia de idade (*Anexo 3*). Assim, as carapaças foram colocadas cuidadosamente numa lâmina de vidro e cobertas por uma lamela, sendo, posteriormente, observadas a microscópio LEICA ICC50 HD, com a objetiva de 10x, de forma a localizar o exopódito (*Figura 1*).

Os valores obtidos para o comprimento do primeiro exopódio da segunda antena, foram convertidos em comprimento do corpo, utilizando a equação que se encontra no *Anexo 4* (Pereira et al., 2004). Esta avaliação foi realizada digitalmente pelo programa Leica Acquire com recurso a uma fotografia, de forma a obter o tamanho dos organismos na primeira e última medição (*Figura 2*).

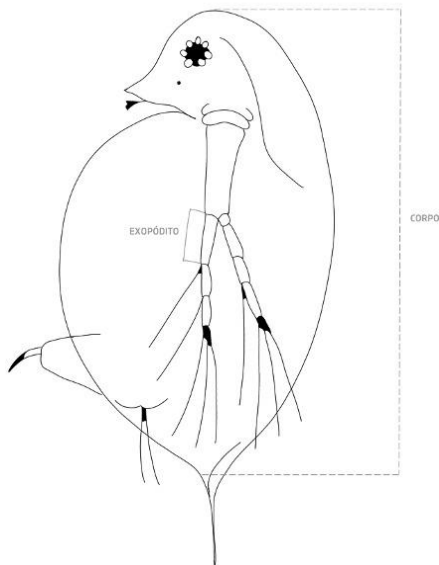


Figura 1 - Daphnia magna com a localização do exopódito na segunda antena.

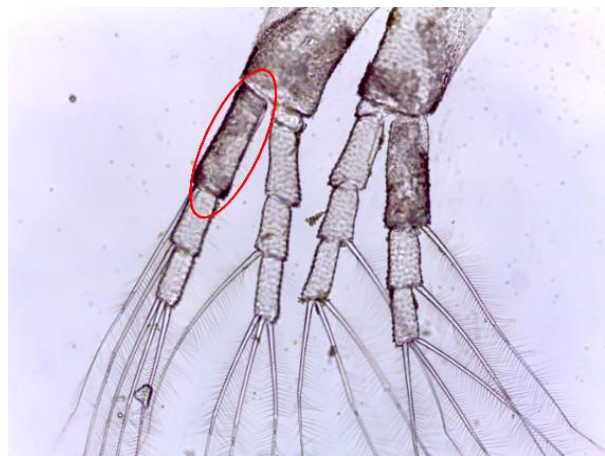


Figura 2 - Primeiro exopódio na segunda antena (ampliação 100x)

2.4.2.3 Resposta sensório-motora

Na primeira avaliação da resposta sensório-motora, foram selecionados cinco organismos expostos à terapia T.E.C.A.R., cinco expostos a microondas e cinco organismos pertencentes ao grupo de controlo. Esta medição e avaliação foi realizada três

² Nome utilizado para referir o momento no qual a *Daphnia* liberta novos juvenis

vezes: a primeira vez no décimo primeiro dia de vida (M1), a segunda vez no décimo terceiro dia de vida (M2) e, por fim, ao trigésimo primeiro dia de vida (M3) (Figura 3). Em cada momento de avaliação, foram escolhidos cinco organismos de cada grupo, tendo sido utilizados sempre organismos diferentes de maneira a todos serem alvo de avaliação.

Assim, com o auxílio de uma pipeta de plástico, a *Daphnia* foi transferida, cuidadosamente, para um tubo com uma altura de catorze centímetros de altura com 50 mL de meio de cultura M4, onde já se encontrava assinalado o ponto inicial e o ponto final a três centímetros de distância entre ambos. Posteriormente, o tubo de vidro foi coberto com papel de alumínio, de forma a garantir que a *Daphnia* se encontrava no fundo do tubo, aquando do início da filmagem. Para a filmagem, foi utilizado o equipamento CASIO EXILIM *High Speed Demo Movie*, colocado à distância de dez centímetros do tubo onde se encontrava o organismo que ia ser avaliado.

De acordo com a bibliografia existente, a *Daphnia* apresenta fototropismo positivo, ou seja, reage aos estímulos luminosos movimentando-se em direção ao mesmo (Clark & Wolf, 1932). Portanto, foi colocada uma lâmpada, a uma distância de dois centímetros do tubo onde se iria proceder à avaliação das alterações motoras e sensitivas. Quando estavam garantidas as condições do teste, sabendo que a *Daphnia* se encontrava no ponto inicial, deu-se início à filmagem, retirando o papel de alumínio e ligando o estímulo luminoso.

Após a obtenção da filmagem, esta foi analisada utilizando o programa Kinovea 9.5. Por meio desse software, foi possível realizar a medição da distância percorrida pelo organismo e o tempo necessário para atingir o ponto final, nos três momentos de avaliação definidos. Com essas informações, foi possível calcular a velocidade do movimento e a distância percorrida da *Daphnia* (Anexo 5). Foi definido como "inexistência de resposta ao estímulo luminoso" quando o organismo não atingia o segundo ponto em dez minutos, em duas tentativas separadas por um intervalo de cinco minutos sem exposição a fontes de luz.

2.4.2.4 Reprodução

Relativamente à avaliação da reprodução, esta foi realizada de forma quantitativa e qualitativa, tendo em conta a presença de ovos viáveis/inviáveis, nomeadamente ovos abortados (OA), juvenis mortos (JM) e juvenis imóveis (JI). Além disso, realizou-se a

contagem dos juvenis libertados em cada postura, totalizando-os para obter um número final por *Daphnia* (Anexo 6).

A seguinte figura apresenta uma visão geral da metodologia utilizada no estudo (Figura 3).

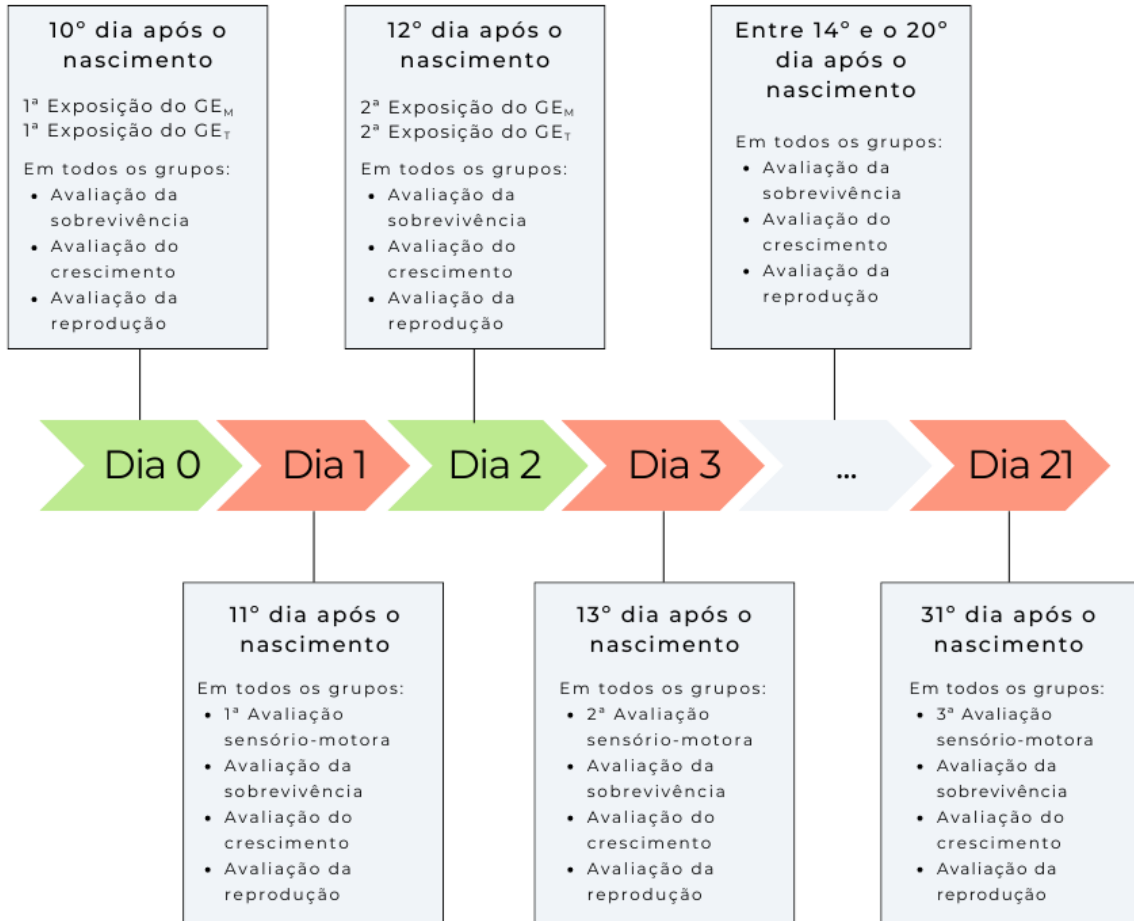


Figura 3 – Esquema temporal do procedimento experimental e respectivas avaliações

2.5. Procedimentos estatísticos

A análise estatística foi realizada através do *software IBM SPSS Statistics (versão 27.0; IBM Corp, Armonk, NY USA) (Anexo 7)*, com um nível de significância de 0,05.

A comparação entre grupos na variável reprodução, quantificada através do número total de juvenis, foi realizada através do teste Kruskal-Wallis seguido das comparações múltiplas de Dunn. A utilização da versão não paramétrica dos testes prendeu-se com o não cumprimento dos pressupostos dos testes paramétricos,

nomeadamente o pressuposto da normalidade (verificado por meio do teste de Shapiro-Wilk).

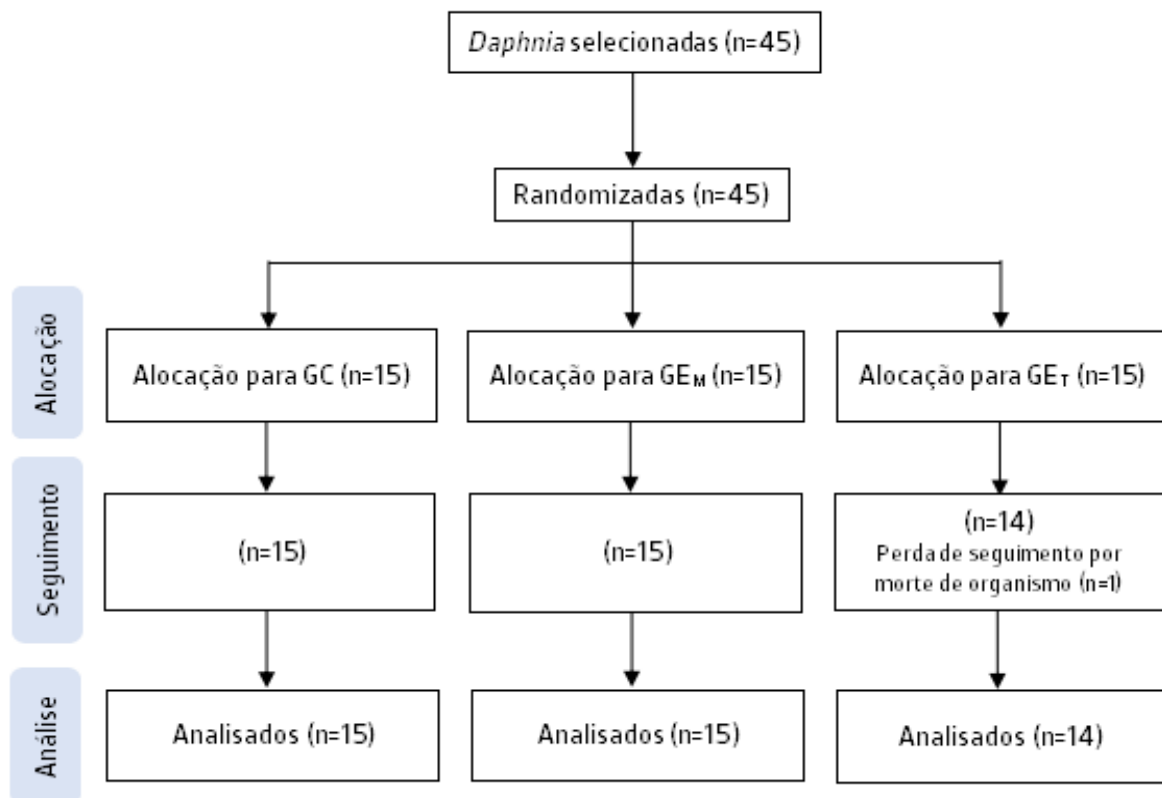
A mediana e os percentis 25 e 75 foram utilizados como estatística descritiva (Marôco, 2014).

3. Resultados

3.1. Sobrevivência

No estudo piloto que foi realizado para avaliar a sobrevivência dos organismos aos tratamentos, uma vez que se pretendia avaliar efeitos sub-letais, não foi registada mortalidade nos grupos experimentais nem no grupo de controlo.

Durante os 21 dias de experiência em que as *Daphnia* foram avaliadas, apenas foi registada uma morte no GE_T (ocorrido com 21 dias de vida), resultando numa taxa de sobrevivência de 93,33% neste grupo e de 100% nos restantes grupos. Assim, a amostra final foi constituída por 44 organismos, distribuídos pelos 3 grupos em análise (Figura 4).



Legenda: GC: Grupo de controlo; GE_{US1}: Grupo Experimental exposto uma vez ao ultrassom e GE_{US2}: Grupo Experimental exposto duas vezes ao ultrassom

Figura 4 - Diagrama da composição da amostra de *Daphnia*

3.2. Crescimento

O tamanho das *Daphnia* foi determinado indiretamente pela medição do exopódito da segunda antena, nas carapaças libertadas nas mudas que ocorreram após a libertação dos juvenis nas várias posturas.

Quando analisadas as dimensões das *Daphnia* entre os grupos (Tabela 1) verificaram-se diferenças significativas entre os grupos no tamanho do corpo na primeira carapaça recolhida, no tamanho do corpo na última carapaça libertada e também no crescimento ($p < 0,001$). Especificamente, observou-se que as *Daphnia* do GE_T apresentaram dimensões significativamente superiores às dos restantes grupos ($p < 0,001$), sendo o crescimento também significativamente superior ao GC ($p < 0,001$) e ao GE_M ($p = 0,041$).

Embora a primeira medição do tamanho do corpo do GE_M apresentasse valores significativamente inferiores ao GC ($p = 0,020$), o mesmo não se observou na última medição efetuada ($p > 0,05$). Este comportamento foi suportado por um crescimento significativamente superior do GE_M face ao GC ($p = 0,007$).

Tabela 1 – Crescimento, tamanho do corpo (mm)

	Mediana (P25; P75)	Kruskal-Wallis (comparações múltiplas) Valor p*
Tamanho (mm)		
Primeira medição		<0,001
GC	2,19 (2,19; 2,30)	(GE _T >GC: p<0,001)
GE _w	2,09 (1,88; 2,19)	(GE _T >GE _{MO} : p<0,001)
GE _T	2,72 (2,61; 2,82)	(GC>GE _{MO} : p=0,020)
Última medição		<0,001
GC	2,93 (2,93; 3,03)	(GE _T >GC: p<0,001)
GE _w	2,93 (2,93; 3,03)	(GE _T >GE _{MO} : p<0,001)
GE _T	3,77 (3,66; 3,87)	
Crescimento		<0,001
GC	0,73 (0,63; 0,84)	(GE _T >GC: p<0,001)
GE _w	0,84 (0,73; 1,05)	(GE _T >GE _{MO} : p=0,041)
GE _T	1,05 (0,94; 1,15)	(GC>GE _{MO} : p=0,007)

N amostral = 15 em cada grupo (n=14 no GET)

*Apresentado o valor prova do teste Kruskal-Wallis (comparações múltiplas de Dunn)

Legenda: P₂₅: Percentil 25; P₇₅: Percentil 75; Primeira medição: Medição realizada ao 13º dia de idade; Última medição: Medição realizada ao 29º dia de idade; GC: Grupo de controlo; GE_{MO}: Grupo Experimental exposto a microondas; GE_T: Grupo Experimental exposto a terapia T.E.C.A.R..

3.3. Resposta sensório-motora

Relativamente à resposta sensório-motora, observaram-se diferenças significativas entre os grupos na distância percorrida em M1 ($p=0,007$) e em M3 ($p=0,049$), sem que houvesse diferenças significativas no que respeita à velocidade ($p>0,05$). Especificamente observou-se que no M1 o GE_M apresentou distâncias percorridas significativamente superiores aos grupos GC ($p=0,003$) e ao GE_T ($p=0,020$). Já em M3 o grupo que apresentou uma distância percorrida maior foi o GC, tendo sido significativa face ao G_M ($p=0,034$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Mediana e Percentis da distância percorrida e velocidade.

	Mediana	(P ₂₅ ; P ₇₅)	Valor p (comparações múltiplas)		Mediana	(P ₂₅ ; P ₇₅)	Valor p (comparações múltiplas)
Distância percorrida (cm)				Velocidade (cm/s)			
M1				M1			
GC	4,7	(3,85; 4,90)	0,007	GC	0,67	(0,58; 0,79)	
GE_M	15,7	(10,65; 17,40)	($GE_M > GC: p=0,003$)	GE_M	0,56	(0,54; 0,76)	>0,05
GE_T	8,5	(3,85; 9,60)	($GE_M > GE_T: p=0,020$)	GE_T	0,73	(0,67; 1,22)	
M2				M2			
GC	5,3	(3,95; 6,80)		GC	0,7	(0,59; 0,79)	
GE_M	9,6	(5,45; 16,75)	>0,05	GE_M	0,66	(0,59; 0,85)	>0,05
GE_T	7,6	(4,45; 9,00)		GE_T	0,81	(0,70; 1,17)	
M3				M3			
GC	13,3	(8,50; 13,35)	0,049	GC	0,8	(0,78; 0,94)	
GE_M	5,88	(4,40; 7,31)	($GE_M < GC: p=0,034$)	GE_M	0,68	(0,63; 0,72)	>0,05
GE_T	6,7	(5,45; 9,35)	($GE_T < GC: p=0,053$)	GE_T	0,77	(0,67; 1,00)	

N amostral = 5 em cada grupo (n=2 em M3 no GE_M)

Legenda: P₂₅: Percentil 25; P₇₅: Percentil 75; GC: Grupo de controlo; GE_{M1} : Grupo Experimental exposto a microondas; GE_T : Grupo Experimental exposto a terapia T.E.C.A.R.; M1: primeira avaliação da resposta sensório-motora, onze dias após o nascimento; M2: segunda avaliação da resposta sensório-motora, treze dias após o nascimento; M3: terceira avaliação da resposta sensório-motora, trinta e um dias após o nascimento.

3.4. Reprodução

Quando analisada a reprodução das *Daphnia*, constatou-se que no GE_{M0} esta foi significativamente inferior ao GC ($p<0,001$) e ao GE_{TC} ($p<0,001$). Pela estatística descritiva (mediana) foi possível observar que se tratou de uma redução de cerca de 70% face aos restantes grupos. O GE_T não apresentou diferenças significativas em relação ao GC ($p>0,05$) (Tabela 3).

Tanto no GC como no GE_T, a idade da fêmea na primeira postura é de 13 dias. No GE_M, a primeira postura libertada ocorreu ao 20º dia de idade e apenas neste grupo, e nessa postura, registaram-se quatro juvenis inviáveis e onze juvenis mortos. O GE_T registou quatro juvenis mortos.

Relativamente aos ovos abortados, contabilizaram-se três no GE_T e um no GE_M.

No GC não se verificou a existência de ovos inviáveis, juvenis mortos nem juvenis inviáveis.

Tabela 3 – Reprodução

	Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	Valor p (comparações múltiplas)
Reprodução		
Nº de juvenis final		<0,001
GC	48,00 (46,00; 48,00)	(GE _M <GC: p<0,001)
GE _M	14,00 (11,00; 17,00)	(GE _M <GE _T : p<0,001)
GE _T	44,00 (42,00; 50,00)	

N amostral = 15 em cada grupo (n=14 no GE_T)

Legenda: GC: grupo controlo; GE_M: grupo experimental microondas; GE_T: grupo experimental terapia T.E.C.A.R..

4. Discussão

Resultante da vasta utilização de aparelhos de eletroterapia de alta frequência na fisioterapia, torna-se importante entender os possíveis efeitos adjacentes à sua utilização. Tal como foi possível verificar nos resultados obtidos, quando expostos às correntes de alta frequência, ocorrem interações entre os campos eletromagnéticos gerados pelos aparelhos de alta frequência e os sistemas biológicos que os rodeiam. Contudo, estas interações térmicas e não térmicas são alvo de um debate significativo sobre mecanismos de ação, potenciais benefícios, limitações do seu uso e questões de biossegurança (Gartshore, Kidd & Joshi, 2021; Mumtaz et al., 2022).

Neste estudo utilizou-se o organismo modelo *Daphnia magna* pois, segundo o *Daphnia Genomics Consortium* (DGC), estes organismos de genoma bem definido e estudado são um modelo de primeira linha para a investigação de interações ambientais, facilitando investigações interdisciplinares (Bauer, 2007). O curto ciclo de vida dos organismos permite estudar dados como o crescimento, resposta sensório-motora e a reprodução, tanto em idade jovem, como em idade adulta (Pellegri et al., 2014; Tatarazako & Oda, 2017; Tollrian & Leese, 2010). Os protocolos utilizados são baseados em evidências práticas e clínicas (Bito et al., 2019; Bito et al., 2020; Bretelle et al., 2020; Cau et al., 2019; Kumaran et al., 2017; Kumaran & Watson, 2018; Kumaran & Watson, 2020; Ortega et al., 2014; Pavone et al., 2017; Tashiro et al., 2017; Yokota et al., 2018).

Neste trabalho, relativamente à sobrevivência, os resultados do estudo piloto indicaram que os valores dos parâmetros utilizados nos dois tratamentos, microondas e terapia T.E.C.A.R., não causaram danos letais aos organismos, o que levou à decisão de utilizar esses mesmos valores no estudo final. De acordo com os resultados do estudo experimental, tanto no grupo experimental exposto a microondas como no grupo de controlo, a sobrevivência não sofreu alterações, uma vez que, todos os organismos se mantiveram vivos durante toda a experiência. Já na intervenção com a terapia T.E.C.A.R., a sobrevivência foi afetada, resultando em 93,33% (um organismo não sobreviveu). Nos dados biológicos descritos em estudos relativamente ao organismo *Daphnia magna*, é relatada a existência de uma variação considerável relativamente ao tempo de vida destas espécies. Segundo Finch e Tanzi (1997), os fatores ambientais, a restrição alimentar e os fatores genéticos contribuem para esta variação, sendo que, estes últimos representam menos de 35% desta variação (Bishop & Guarente, 2007; Finch & Tanzi, 1997; Fontana et

al., 2010; Lee et al., 2006; Mair & Dillin, 2008; Narasimhan et al., 2009). Na experiência com terapia T.E.C.A.R., todos os organismos foram sujeitos rigorosamente às mesmas condições ambientais e de alimentação, e a única morte ocorreu de forma isolada ao décimo primeiro dia de experiência, parece por isso não estar relacionado diretamente com a exposição à corrente, sugere-se que tenha sido um caso isolado, que não contribui para as diferenças significativas entre grupos.

No que diz respeito ao crescimento das *Daphnia*, verificaram-se diferenças significativas entre grupos, sendo que o grupo experimental da terapia T.E.C.A.R. foi o que apresentou maiores valores, tanto no momento da primeira medição do tamanho como no último, e também no crescimento total, em relação ao grupo de microondas e ao grupo de controlo. Pelo pouco tempo entre as exposições às correntes e a primeira medição do tamanho do corpo, não se esperava que o tamanho da primeira medição do corpo das *Daphnia* apresentasse diferenças significativas. Este resultado pode ter tido origem numa distribuição não aleatória dos organismos pelos vários grupos. Em relação ao tamanho da última medição e ao crescimento, sabe-se que a aplicação da terapia T.E.C.A.R. pode levar a várias alterações fisiológicas, incluindo o aumento do metabolismo celular e o aumento do fluxo sanguíneo. Deste modo, quando expostas à energia eletromagnética da terapia T.E.C.A.R., pode ocorrer um aumento da atividade metabólica, resultando num maior consumo de energia como relatado em diversos estudos e, eventualmente, estimulando o crescimento dos organismos (Goats, 1989; Kumaran & Watson, 2015; Levy et al., 2016). Além disso, os efeitos térmicos produzidos por ambas as correntes de alta frequência provocam um aumento do fluxo sanguíneo, o que pode levar a uma melhor perfusão dos tecidos, fornecendo nutrientes e oxigénio de forma mais eficiente, favorecendo o crescimento e o desenvolvimento destes organismos. Relativamente a esta variável, já existem estudos que expõe *Daphnia* a campos eletromagnéticos extra baixos e que descrevem uma diminuição de tamanho (Krylov & Osipova, 2013). Isto pode significar que correntes de alta frequência com diferentes valores podem levar a respostas diferentes. Sabe-se que quanto mais alta for a frequência, menor é o poder de penetração, e o facto da terapia T.E.C.A.R. emitir correntes de frequência significativamente mais baixa em comparação aos aparelhos de microondas, pode pressupor que a terapia T.E.C.A.R. tenha uma capacidade de penetração maior e, por isso, apresentar respostas distintas das microondas.

Em relação ao desempenho sensório-motor, observaram-se diferenças significativas na distância percorrida entre grupos. No M1, o GE_M apresentou distâncias percorridas significativamente superiores aos grupos GC e ao GE_T e no M3, verificou-se que três dos cinco organismos que foram alvo de avaliação sensório-motora no GE_M, não responderam ao estímulo luminoso. No que diz respeito à velocidade, embora se esperasse que organismos maiores apresentassem maior velocidade, o mesmo não se verificou. Estes resultados pressupõem que a exposição a microondas, possivelmente, interferiu com a forma como é realizado o movimento de natação das *Daphnia*, uma vez que, umas das teorias aponta que uma mudança de sinal de fototropismo envolve o controle de músculos antagonistas nos apêndices natatórios (Clark & Wolf, 1932). Contudo, os efeitos das microondas sobre a força muscular apresentam baixa evidência, podendo haver ou não relação desta resposta com os seus efeitos terapêuticos (Akyol et al., 2012; Page et al., 2016). Face aos resultados, pensa-se que no primeiro momento, as *Daphnia* não tiveram alterações significativas na capacidade de resposta sensório-motora. No entanto, no momento final, em que temos o efeito cumulativo de duas exposições, a distância total percorrida foi menor. Tal como explicado para o crescimento, o aumento do metabolismo celular e o aumento do fluxo sanguíneo, podem justificar este resultado no primeiro momento de avaliação (Goats, 1989; Kumaran & Watson, 2015; Levy et al., 2016). Porém, quando duplicada a exposição, os resultados obtidos são distintos. Estes resultados podem, eventualmente, ser justificados pela dose de efeito térmico que incide sobre os fusos musculares e a sua resposta reflexa ao alongamento, uma vez que, são elementos importantes no aumento de tónus muscular e que, quando se verifica uma temperatura elevada do sistema nervoso central, a atividade gama eferente é diminuída (Downey, 1964).

Quanto à reprodução, foi possível aferir que o grupo experimental microondas apresentou um valor significativamente inferior em comparação aos restantes grupos. Relativamente aos efeitos no sistema reprodutivo, muitos são os estudos feitos com microondas de baixa frequência, nomeadamente associados a dispositivos de telecomunicações. Dentro dos aparelhos com microondas que são considerados para fins terapêuticos, um estudo que avaliou a exposição de ratos *Wistar* a microondas de 2,45 GHz durante uma hora por dia, 30 dias consecutivos, concluiu que ocorreu comprometimento testicular no sistema reprodutor masculino em termos de

espermatoxénese e necrose de coagulação (Bilgici et al., 2018; Singh et al. 2018). O mesmo se concluiu num estudo em que se aplicou a mesma intensidade em camundongos albinos suíços machos durante duas horas por dia por 30 dias consecutivos, apontando que as microondas de 2,45 GHz causam stress oxidativo nos testículos e pode levar a efeitos prejudiciais na fertilidade do sistema reprodutor masculino (Meena et al., 2014; Singh et al. 2018). Considerando os resultados obtidos, a presente experiência permite inferir que a interação do campo eletromagnético de um aparelho de microondas com frequência de 2,45 GHz, gerado num raio de 30 centímetros, pode ter interferências no sistema reprodutor dos organismos modelo. Neste aparelho, a transmissão de energia das microondas é realizada através de um dispositivo chamado klystron, o qual desempenha a função de amplificador de energia (Ram et al., 2022). Em contrapartida, no caso da terapia T.E.C.A.R., a transmissão de energia ocorre por um meio dielétrico, no modo capacitivo, que funciona através de elétrodos que possuem um revestimento isolante, transmitindo energia de forma seletiva (Kumaran et al., 2017). Assim sendo, esta especificidade das microondas poderá ser a justificação para os resultados significativos obtidos neste grupo, reforçando a importância de clarificar em que escala será segura a exposição do sistema reprodutor, tanto feminino quanto masculino, no raio de utilização de aparelhos de microondas.

Tal como se pode verificar nos resultados obtidos (*Anexo 8*), estes efeitos sobre a reprodução dos organismos expostos a microondas podem influenciar, não só o número de posturas libertadas, como também o número total de juvenis que as compunha. No que diz respeito à viabilidade dos juvenis libertados, o número de ovos abortados e juvenis inviáveis foi reduzido, sobressaindo apenas o número de juvenis mortos do grupo exposto às microondas. Estes observaram-se apenas na primeira postura, libertada tardiamente aquando comparada com os restantes grupos, que pode, eventualmente, refletir alguma influência desta corrente em organismos acabados de nascer. Já existem alguns estudos relativamente a estes parâmetros em *Daphnia* mas utilizando campos eletromagnéticos de 17 Hz e 500 Hz, que descrevem efeitos negativos na maturação e sobrevivência dos descendentes desta espécie, apontando como possíveis causas a inibição de certos processos relacionados com partenogénese (Krylov, 2008). No presente estudo, devido a este reduzido número e ao padrão aleatório de ovos abortados, juvenis mortos e inviáveis,

não foi possível realizar uma associação direta com a exposição às correntes de microondas e terapia T.E.C.A.R..

Por fim, é importante destacar que a relação entre as microondas, a terapia T.E.C.A.R. e as variáveis estudadas, assim como os resultados obtidos, requerem uma análise mais aprofundada. É de extrema importância realçar que as extrapolações dos dados devem ter em conta diversos fatores, incluindo a dose administrada (intensidade, frequência e duração da exposição), bem como as características individuais dos organismos testados. É importante considerar que o estudo foi realizado em organismos modelo, especificamente da espécie *Daphnia magna*. As diferenças anatômicas e fisiológicas destes organismos podem influenciar as respostas aos estímulos das microondas e da alta frequência, sendo por isso fundamental considerar que os resultados obtidos num estudo animal podem não ser diretamente extrapolados para os efeitos em seres humanos.

Em relação ao que correu bem, este trabalho conseguiu investigar os efeitos dos aparelhos de microondas e de terapia T.E.C.A.R. em *Daphnia*, recolhendo dados e observações relevantes sobre os efeitos destas correntes e proporcionando um novo organismo modelo para futuros estudos nesta área.

No entanto, há aspetos que poderiam ser abordados de forma diferente. Devido ao tempo limitado para a realização deste estudo, não foi possível explorar outros aspetos importantes. No contexto dos estudos futuros, é recomendado que sejam incorporados outros parâmetros para uma compreensão mais abrangente dos efeitos colaterais dos aparelhos de microondas e da terapia T.E.C.A.R. utilizados na fisioterapia., como por exemplo, a inclusão de marcadores bioquímicos e estudos genéticos permitiria aprofundar o estudo destes efeitos a outros níveis de organização. Uma limitação identificada neste estudo é a possível ausência de aleatoriedade na distribuição das *Daphnia* nos frascos experimentais dos três grupos. Ao agrupar quinze *Daphnia* em cada frasco, pode ter havido uma tendência de selecionar primeiramente as *Daphnia* menores e menos ativas, deixando as maiores e potencialmente mais rápidas para o fim. Essa alocação não aleatória pode ter causado uma diferença inicial entre os grupos, o que pode ter influenciado os resultados do estudo.

Abordagens mais abrangentes poderiam fornecer uma visão mais detalhada dos potenciais impactos destes aparelhos em termos de saúde e segurança. Portanto, estudos

futuros são fundamentais para obter uma compreensão mais completa dos potenciais riscos associados ao uso de dispositivos de alta frequência e sua aplicação terapêutica.

5. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo mostram haver interações importantes entre os campos eletromagnéticos gerados pelos aparelhos de alta frequência, tanto nas microondas como na terapia T.E.C.A.R., e os sistemas biológicos que os rodeiam. Estas interações não afetaram diretamente a sobrevivência dos organismos.

Quanto a efeitos benéficos, verificou-se que as duas correntes têm efeitos que se assemelham relativamente ao crescimento.

Relativamente aos aparelhos de microondas, conclui-se que podem existir efeitos colaterais na reprodução e na resposta sensório-motora, nomeadamente na distância percorrida quando expostos a duas sessões.

Concluindo, podemos afirmar que o uso da alta frequência na fisioterapia, incluindo o equipamento de terapia T.E.C.A.R. e microondas, apresenta potenciais efeitos colaterais em organismos modelo. Portanto, estudos futuros são necessários para investigar aprofundadamente os efeitos destas tecnologias em seres humanos, considerando que estas informações são essenciais para uma aplicação mais segura e eficaz da alta frequência na fisioterapia, beneficiando assim a prática clínica e os pacientes.

Referências Bibliográficas

- Akyol, Y., Ulus, Y., Durmus, D., Canturk, F., Bilgici, A., Kuru, O., & Bek, Y. (2012). Effectiveness of microwave diathermy on pain, functional capacity, muscle strength, quality of life, and depression in patients with subacromial impingement syndrome: a randomized placebo-controlled clinical study. *Rheumatology international*, 32(10), 3007–3016. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-2097-2>
- Bauer D. J. (2007). The *Daphnia* Genomics Consortium Meeting: the genome biology of the model crustacean *Daphnia*. *Expert review of proteomics*, 4(5), 601–602. <https://doi.org/10.1586/14789450.4.5.601>
- Beasley, K. L., & Weiss, R. A. (2014). Radiofrequency in cosmetic dermatology. *Dermatologic clinics*, 32(1), 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.det.2013.09.010>
- Bilgici, B., Gun, S., Avci, B., Akar, A., & K Engiz, B. (2018). What is adverse effect of wireless local area network, using 2.45 GHz, on the reproductive system?. *International journal of radiation biology*, 94(11), 1054–1061. <https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1503430>
- Bishop, N. A., & Guarente, L. (2007). Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nature reviews. Genetics*, 8(11), 835–844. <https://doi.org/10.1038/nrg2188>
- Bito, T., Tashiro, Y., Suzuki, Y., Kajiwara, Y., Zeidan, H., Kawagoe, M., Sonoda, T., Nakayama, Y., Yokota, Y., Shimoura, K., Tatsumi, M., Nakai, K., Nishida, Y., Yoshimi, S., Tsuboyama, T., & Aoyama, T. (2019). Acute effects of capacitive and resistive electric transfer (CRet) on the Achilles tendon. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 38(1), 48–54. <https://doi.org/10.1080/15368378.2019.1567525>
- Bito, T., Suzuki, Y., Kajiwara, Y., Zeidan, H., Harada, K., Shimoura, K., Tatsumi, M., Nakai, K., Nishida, Y., Yoshimi, S., Kawabe, R., Yokota, J., Yamashiro, C., Tsuboyama, T., & Aoyama, T. (2020). Effects of deep thermotherapy on chest wall mobility of healthy elderly women. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 39(2), 123–128. <https://doi.org/10.1080/15368378.2020.1737803>
- Bonan, P., Marini, L., & Lotti, T. (2019). Microwaves in body sculpting: A prospective study. *Dermatologic therapy*, 32(2), e12782. <https://doi.org/10.1111/dth.12782>

- Bretelle, F., Fabre, C., Golka, M., Pauly, V., Roth, B., Bechadergue, V., & Blanc, J. (2020). Capacitive-resistive radiofrequency therapy to treat postpartum perineal pain: A randomized study. *PLoS ONE*, 15(4), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231869>
- Cameron, M. H. (2008). *Em Physical Agents in Rehabilitation: From Research to Practice* (pp. 203–215). Riverport Lane: Elsevier.
- Cau, N., Cimolin, V., Aspesi, V., Galli, M., Postiglione, F., Todisco, A., Tacchini, E., Darno, D., & Capodaglio, P. (2019). Preliminary evidence of effectiveness of TECAR in lymphedema. *Lymphology*, 52(1), 35–43.
- Clarke, G. L., & Wolf, E. (1932). THE MECHANISMS OF TROPISTIC REACTIONS AND THE STRYCHNINE EFFECT IN *DAPHNIA*. *The Journal of general physiology*, 16(1), 99–105. <https://doi.org/10.1085/jgp.16.1.99>
- Clijisen, R., Leoni, D., Schneebeli, A., Cescon, C., Soldini, E., Li, L., & Barbero, M. (2020). Does the Application of Tecar Therapy Affect Temperature and Perfusion of Skin and Muscle Microcirculation? A Pilot Feasibility Study on Healthy Subjects. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 26(2), 147–153. <https://doi.org/10.1089/acm.2019.0165>
- Collins, R., Peto, R., Gray, R., & Parish, S. (1996). Large-scale randomised evidence: Trials and overviews. In D. J. Weatherall, J. G. G. Ledingham, & D. A. Warrell (Eds.), *Oxford Textbook of Medicine* (3rd ed., pp. 21–32). Oxford University Press.
- Cordero, J. E. (2008). *Agentes Físicos Terapéuticos*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- Downey J. A. (1964). PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF HEAT AND COLD. *Physical therapy*, 44, 713–717. <https://doi.org/10.1093/ptj/44.8.713>
- Dudycha, J. L. (2003). A multi-environment comparison of senescence between sister species of *Daphnia*. *Oecologia*, 135(4), 555–563. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1230-7>
- Dudycha, J. L., & Tessier, A. J. (1999). Natural Genetic Variation of Life Span, Reproduction, and Juvenile Growth in *Daphnia*. *Evolution*, 53(6), 1744–1756. <https://doi.org/10.2307/2640437>
- Ebert, D. (2005). Introduction to the Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. In *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. National

Center for Biotechnology Information (US).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2040/>

Elendt, B. P., & Bias, W. R. (1990). Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Research*, 24(9), 1157–1167.

[https://doi.org/10.1016/0043-1354\(90\)90180-E](https://doi.org/10.1016/0043-1354(90)90180-E)

Finch, C. E., & Tanzi, R. E. (1997). Genetics of aging. *Science* (New York, N.Y.), 278(5337), 407–411. <https://doi.org/10.1126/science.278.5337.407>

Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. (2010). Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* (New York, N.Y.), 328(5976), 321–326.

<https://doi.org/10.1126/science.1172539>

Fousekis, K., G. Chrysanthopoulos, M. Tsekoura, D. Mandalidis, K. Mylonas, P. Angelopoulos, D. Koumoundourou, V. Billis, E. Tsepis, et al. (2020). Posterior thigh thermal skin adaptations to radiofrequency treatment at 448 kHz applied with or without Indiba® fascia treatment tools. *J. Phys. Ther. Sci.* 32:292–96. doi:10.1589/jpts.32.292

Gartshore, A., Kidd, M., & Joshi, L. T. (2021). Applications of Microwave Energy in Medicine. *Biosensors*, 11(4), 96. <https://doi.org/10.3390/bios11040096>

Goats, G. C. (1989). Continuous short-wave (radio-frequency) diathermy. *British Journal of Sports Medicine*, 23(2), 123–127. <https://doi.org/10.1136/bjism.23.2.123>

Grimnes, S., and Ø. G. Martinsen (2000). Joule effect and temperature rise. *Bioimpedance and bioelectricity basics*, 71–73. London: Academic Press: Harcourt and Technology Co

Kim, E., Ansell, C. M., & Dudycha, J. L. (2014). Resveratrol and food effects on lifespan and reproduction in the model crustacean *Daphnia*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 321(1), 48–56.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jez.1836>

Kitchen, S. (2003). Eletroterapia: Prática Baseada em Evidências. <http://groups-beta.google.com/group/digitalsource>

- Kotnik, T., Miklavcic, D. (2000). Theoretical evaluation of the distributed power dissipation in biological cells exposed to electric fields. *Bioelectromagnetics* 21:385–94. doi:10.1002/1521-186X(200007)21:5<385::AID-BEM7>3.0.CO;2-F
- Krylov, V. V., & Osipova, E. A. (2013). The response of *Daphnia magna* Straus to the long-term action of low-frequency magnetic fields. *Ecotoxicology and environmental safety*, 96, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.06.012>
- Krylov, V.V. (2008). Impact of alternating electromagnetic field of ultralow and low frequencies upon survival, development, and production parameters in *Daphnia magna* Straus (Crustacea, Cladocera). *Inland Water Biology* 1, 134–140. <https://doi.org/10.1134/S1995082908020053>
- Kumaran, B., & Watson, T. (2015). Thermal build-up, decay and retention responses to local therapeutic application of 448 kHz capacitive resistive monopolar radiofrequency: A prospective randomised crossover study in healthy adults. *International Journal of Hyperthermia*, 31(8), 883–895. doi:10.3109/02656736.2015.109217
- Kumaran, B., & Watson, T. (2018). Treatment using 448 kHz capacitive resistive monopolar radiofrequency improves pain and function in patients with osteoarthritis of the knee joint: a randomised controlled trial. *Physiotherapy (United Kingdom)*, 105(1), 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.physio.2018.07.004>
- Kumaran, B., & Watson, T. (2020). Thermophysiological responses to capacitive resistive monopolar radiofrequency electromagnetic radiation in patients with osteoarthritis of the knee joint: A randomised controlled experimental study. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 40(1), 210–221. <https://doi.org/10.1080/15368378.2020.1846556>
- Kumaran, B., Herbland, A., & Watson, T. (2017). Continuous-mode 448 kHz capacitive resistive monopolar radiofrequency induces greater deep blood flow changes compared to pulsed mode shortwave: a crossover study in healthy adults. *European Journal of Physiotherapy*, 19(3), 137–146. <https://doi.org/10.1080/21679169.2017.1316310>
- Lee, G. D., Wilson, M. A., Zhu, M., Wolkow, C. A., de Cabo, R., Ingram, D. K., & Zou, S. (2006). Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging cell*, 5(6), 515–524. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00241.x>

- Levy, A. S., Grant, R. T., & Rothaus, K. O. (2016). Radiofrequency Physics for Minimally Invasive Aesthetic Surgery. *Clinics in plastic surgery*, 43(3), 551–556. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2016.03.013>
- López-De-Celis, C., Hidalgo-García, C., Pérez-Bellmunt, A., Fanlo-Mazas, P., González-Rueda, V., Tricás-Moreno, J. M., Ortiz, S., & Rodríguez-Sanz, J. (2020). Thermal and non-thermal effects off capacitive-resistive electric transfer application on the Achilles tendon and musculotendinous junction of the gastrocnemius muscle: A cadaveric study. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12891-020-3072-4>
- Mair, W., & Dillin, A. (2008). Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annual review of biochemistry*, 77, 727–754. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061206.171059>
- Marôco, J. (2014). Análise estatística com o SPSS Statistics. In *Análise e Gestão da Informação*.
- Meena, R., Kumari, K., Kumar, J., Rajamani, P., Verma, H. N., & Kesari, K. K. (2014). Therapeutic approaches of melatonin in microwave radiations-induced oxidative stress-mediated toxicity on male fertility pattern of Wistar rats. *Electromagnetic biology and medicine*, 33(2), 81–91. <https://doi.org/10.3109/15368378.2013.781035>
- Mumtaz, S., Rana, J. N., Choi, E. H., & Han, I. (2022). Microwave Radiation and the Brain: Mechanisms, Current Status, and Future Prospects. *International journal of molecular sciences*, 23(16), 9288. <https://doi.org/10.3390/ijms23169288>
- Narasimhan, S. D., Yen, K., & Tissenbaum, H. A. (2009). Converging pathways in lifespan regulation. *Current biology: CB*, 19(15), R657–R666. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.013>
- Noël, F. (2013). Efeito adverso vs efeito colateral. *Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental*.
- OECD. (2004). *Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*. <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>
- OECD. (2012). *Test Guideline No. 211 Daphnia magna reproduction test Section 2 Effects on Biotic Systems OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS*.

- Ortega, J. A. A., Fernández, E. C., Llorent, R. G., González, M. R., & Martínez, A. D. D. (2014). Microwave diathermy for treating nonspecific chronic neck pain: a randomized controlled trial. *The spine journal: official journal of the North American Spine Society*, 14(8), 1712–1721. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2013.10.025>
- Page, M. J., Green, S., Mrocki, M. A., Surace, S. J., Deitch, J., McBain, B., Lyttle, N., & Buchbinder, R. (2016). Electrotherapy modalities for rotator cuff disease. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2016(6), CD012225. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012225>
- Pavone, C., Romeo, S., D'Amato, F., Usala, M., Letizia Mauro, G., & Caruana, G. (2017). Does Transfer Capacitive Resistive Energy Has a Therapeutic Effect on Peyronie's Disease? Randomized, Single-Blind, Sham-Controlled Study on 96 Patients: Fast Pain Relief. *Urologia Internationalis*, 99(1), 77–83. <https://doi.org/10.1159/000467396>
- Pereira, J. L., Marques, C. R., & Gonçalves, F. (2004). Allometric relations for *Ceriodaphnia* spp. and *Daphnia* spp. *Annales de Limnologie*, 40(1), 11–14. <https://doi.org/10.1051/limn/2004001>
- Pellegrini, V., Gorbi, G., & Buschini, A. (2014). Comet Assay on *Daphnia magna* in ecogenotoxicity testing. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 155, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.002>
- Ram, S. K., Verma, B. K., Abhishek, A., Devassy, S., & Mishra, S. (2022). Modular pulsed power supply for characterization of high-power microwave devices. *The Review of scientific instruments*, 93(11), 114713. <https://doi.org/10.1063/5.0095855>
- Robinson, J. D., Haag, C. R., Hall, D. W., Pajunen, V. I., & Wares, J. P. (2012). Genetic Estimates of Population Age in the Water Flea, *Daphnia magna*. *Journal of Heredity*, 103(6), 887–897. <https://doi.org/10.1093/jhered/ess063>
- Sadick, N., & Rothaus, K. O. (2016). Aesthetic Applications of Radiofrequency Devices. *Clinics in plastic surgery*, 43(3), 557–565. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2016.03.014>
- Singh, R., Nath, R., Mathur, A. K., & Sharma, R. S. (2018). Effect of radiofrequency radiation on reproductive health. *The Indian journal of medical research*, 148(Suppl), S92–S99. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1056_18
- Smirnov, N. N. (2017). PHYSIOLOGY OF THE CLADOCERA.

- Tashiro, Y., Hasegawa, S., Yokota, Y., Nishiguchi, S., Fukutani, N., Shirooka, H., Tasaka, S., Matsushita, T., Matsubara, K., Nakayama, Y., Sonoda, T., Tsuboyama, T., & Aoyama, T. (2017). Effect of Capacitive and Resistive electric transfer on haemoglobin saturation and tissue temperature. *International Journal of Hyperthermia*, 33(6), 696–702. <https://doi.org/10.1080/02656736.2017.1289252>
- Tassinari, J., Sinigaglia, M., & Sinigaglia, G. (2019). *Raciocínio Clínico associado à Estética Corporal* (Estética Experts, Ed.; 2. ed).
- Tatarazako, N., & Oda, S. (2007). The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. In *Ecotoxicology* (Vol. 16, Issue 1, pp. 197–203). <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0120-2>
- Tollrian, R., & Leese, F. (2010). Ecological genomics: steps towards unraveling the genetic basis of inducible defenses in *Daphnia*. *BMC biology*, 8, 51. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-51>
- Trillo, M. Á., Martínez, M. A., & Úbeda, A. (2021). Effects of the signal modulation on the response of human fibroblasts to in vitro stimulation with subthermal RF currents. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 40(1), 201–209. <https://doi.org/10.1080/15368378.2020.1830796>
- Yagcilar, C., & Yardımcı, M. (2021). Effects of 432 Hz and 440 Hz Sound Frequencies on the Heart Rate, Egg Number, and Survival Parameters in Water Flea (*Daphnia magna*). *Journal of Ecological Engineering*, 119–125.
- Yokota, Y., Sonoda, T., Tashiro, Y., Suzuki, Y., Kajiwara, Y., Zeidan, H., Nakayama, Y., Kawagoe, M., Shimoura, K., Tatsumi, M., Nakai, K., Nishida, Y., Bito, T., Yoshimi, S., & Aoyama, T. (2018). Effect of Capacitive and Resistive electric transfer on changes in muscle flexibility and lumbopelvic alignment after fatiguing exercise. *Journal of Physical Therapy Science*, 30(5), 719–725. <https://doi.org/10.1589/jpts.30.719>
- Zati, A., Cavazzuti, L., Colori, B. C. M., & Benedetti, M. G. (2018). Deep heating therapy via MF radiowaves versus superficial heating therapy in the treatment of nonspecific chronic low back pain: A double blind randomized trial. *Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation*, 31(5), 963–971. <https://doi.org/10.3233/BMR-170944>

ANEXOS

Anexo 1: Composição do Meio de cultura M4

Reagente	Volume de solução para 20 L de meio (mL)
Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	10
MnCl ₂ .4H ₂ O	10
LiCl	10
RbCl	5
SrCl ₂ .6H ₂ O	5
NaBr	5
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	5
CuCl ₂ .2H ₂ O	5
ZnCl ₂	5
CoCl ₂ .6H ₂ O	5
KI	1
Na ₂ SeO ₃	1
NH ₄ VO ₃	1
Fe-EDTA (Na ₂ EDTA.2H ₂ O + FeSO ₄ .7H ₂ O)	20
Macronutrientes	
CaCl ₂ .2H ₂ O	100
MgSO ₄ .7H ₂ O	100
KCl	20
NaHCO ₃	100
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	20
NaNO ₃	2
KH ₂ PO ₄	2
K ₂ HPO ₄	2
Vitaminas	
Tiamina-HCL (B11)	1
Cianocobalamina (B12)	
Biotina	

Anexo 4: Fórmula de conversão do tamanho do exopódito para o tamanho corporal da *Daphnia magna*

$$\text{Corpo (mm)} = 10.499 \times \text{exopódito} - 0.329$$

Anexo 5: Folha de registo da resposta sensório-motora das *Daphnia magna*

GC - Resposta Sensório-motora				
Daphnia	Distância (cm)	Tempo (s)	Distância total (cm)	Velocidade global (cm/s)
1	3	5,23	3,50	0,67
2	3	7,48	5,03	0,67
3	3	5,8	4,83	0,83
4	3	9,68	4,65	0,48
5	3	5,64	4,21	0,75
6	3	5,16	3,79	0,73
7	3	8,6	7,21	0,84
8	3	9,08	6,40	0,70
9	3	7,24	4,13	0,57
10	3	8,64	5,31	0,61
11	3	16,95	13,38	0,79
12	3	10,34	8,96	0,87
13	3	16,63	13,25	0,80
14	3	8,04	8,02	1,00
15	3	17,21	13,31	0,77

GEr - Resposta Sensório-motora				
Daphnia	Distância (cm)	Tempo (s)	Distância total (cm)	Velocidade global (cm/s)
1	3	13,23	9,64	0,73
2	3	12,36	8,48	0,69
3	3	3,05	3,56	1,17
4	3	3,23	4,07	1,26
5	3	14,98	9,56	0,64
6	3	12,15	9,78	0,80
7	3	13,78	8,21	0,60
8	3	6,66	5,39	0,81
9	3	7,66	7,63	1,00
10	3	2,6	3,45	1,33
11	3	11,22	6,7	0,60
12	3	12,16	8,86	0,73
13	3	9,9	9,83	0,99
14	3	5,04	5,11	1,01
15	3	7,5	5,78	0,77

GEM - AResposta Sensório-motora				
Daphnia	Distância (cm)	Tempo (s)	Distância total (cm)	Velocidade global (cm/s)
1	3	33,05	18,58	0,56
2	3	20,73	11,52	0,56
3	3	28,81	16,23	0,56
4	3	18,67	9,78	0,52
5	3	16,57	15,71	0,95
6	3	9,76	6,46	0,66
7	3	34,51	20,87	0,60
8	3	5,24	4,39	0,84
9	3	11,28	9,63	0,85
10	3	21,76	12,56	0,58
11	3	7,1	4,44	0,63
12	3	Sem resposta	Sem resposta	Sem resposta
13	3	10,2	7,31	0,72
14	3	Sem resposta	Sem resposta	Sem resposta
15	3	Sem resposta	Sem resposta	Sem resposta

Anexo 6: Folhas de registo da reprodução das *Daphnia magna*

GC - JUVENIS																											
Idade	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total:											
Invenc:	AO/MB/B	Invenc:	AO/MB/B	Invenc:	AO/MB/B	Invenc:	AO/MB/B	Invenc:	AO/MB/B	Invenc:	AO/MB/B	Invenc:	AO/MB/B	Invenc:	AO/MB/B	Invenc:	AO/MB/B	Invenc:	AO/MB/B	Invenc:	AO/MB/B	Invenc:	AO/MB/B	Invenc:	AO/MB/B	Invenc:	AO/MB/B
10																											
11																											
12																											
13	1	1	1	2	1	2	2	2	2	3	1	1	1	2	1												29
14																											
15																											
16																											
17	6	7	9	6	8	7	6	8	7	6	7	9	7	8	6												107
18																											
19																											
20																											
21	10	12	14	10	11	11	8	9	8	10	12	11	13	10	12												161
22																											
23																											
24																											
25	12	13	16	11	12	12	11	11	10	12	13	12	16	12	14												187
26																											
27																											
28																											
29	17	15	17	15	16	15	13	17	17	16	15	17	17	16	15												238
30																											
31																											
Total	46	48	57	44	48	47	32	47	44	47	48	50	54	48	48												708

OA - OVOABORTADO
 IM - JUVENIL MORTO

Idade (dias)

GEII - JUVENIS																											
Idade	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total:											
Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B
10																											
11																											
12																											
13																											
14																											
15																											
16																											
17																											
18																											
19																											
20	0	1	0/1/0	2	0/2/0	4	3	9	8	6	0/4/2	2	0/2/0	5	0	9	9	4	1/0/0	0	9	0/2/2					62
21																											
22																											
23																											
24	6	10	6	4	5	9	11	5	6	7	9	2	5	11	15												100
25																											
26																											
27																											
28	1	6	1	2	4	7	6	3	6	3	4	2	2	4	2												53
29																											
30																											
31																											
Total	7	17	9	10	12	25	25	14	14	15	13	13	11	15	26												226

OA - OVOABORTADO
 IM - JUVENIL MORTO
 II - JUVENIL IMÓVEL

Idade (dias)

GEI - JUVENIS																											
Idade	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total:											
Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B	Invenc:	OA/MB/B
10																											
11																											
12																											
13	2	1	1	2	3	1	4	1	1	1	2	2	1	1	1												24
14																											
15																											
16																											
17	5	6	4	5	4	10	7	4	2	10	12	3	5	9	8												94
18																											
19																											
20																											
21	11	12	12	0/1/0	9	12	0	7		14	9	8	13	8	10	11											136
22																											
23																											
24	11	12	9	14	9	15	1/0/0	8		7	11	1/1/0	9	12	10	11	14										152
25																											
26																											
27																											
28																											
29	12	1/0/0	19	24	13	17	0/2/0	21	24		22	16	23	15	16	20	19										261
30																											
31																											
Total	41	50	50	43	45	47	50	5	46	47	54	45	40	51	53												667

OA - OVOABORTADO
 IM - JUVENIL MORTO
 II - JUVENIL IMÓVEL

Idade (dias)

Anexo 7: Base de dados utilizadas no SPSS

ID	Grupo	Sobrevivência	Primeira Carapaça	Última carapaça	Crescimento	juvenis_pós _21 dias
1	1	1	2,09	2,93	0,84	46
2	1	1	2,19	3,03	0,84	48
3	1	1	2,30	2,93	0,63	57
4	1	1	2,19	3,03	0,84	44
5	1	1	2,19	2,93	0,73	48
6	1	1	2,30	2,93	0,63	47
7	1	1	2,40	3,03	0,63	40
8	1	1	2,19	2,82	0,63	47
9	1	1	2,19	2,93	0,73	44
10	1	1	2,19	2,82	0,63	47
11	1	1	2,19	3,03	0,84	48
12	1	1	2,19	3,03	0,84	50
13	1	1	2,19	2,93	0,73	54
14	1	1	2,30	2,93	0,63	48
15	1	1	2,20	3,03	0,83	48
1	2	1	1,98	3,03	1,05	7
2	2	1	1,88	2,93	1,05	17
3	2	1	2,09	3,03	0,94	9
4	2	1	1,77	2,82	1,05	10
5	2	1	2,19	3,03	0,84	12
6	2	1	2,09	2,93	0,84	25
7	2	1	2,19	2,93	0,73	25
8	2	1	2,09	2,82	0,73	14
9	2	1	1,88	3,03	1,15	14
10	2	1	2,19	2,93	0,73	15
11	2	1	2,09	2,82	0,73	13
12	2	1	2,09	2,93	0,84	13
13	2	1	2,30	3,03	0,73	11
14	2	1	1,77	2,93	1,15	15
15	2	1	2,09	3,03	0,94	26
1	3	1	2,61	3,66	1,05	41
2	3	1	2,72	3,77	1,05	50
3	3	1	2,72	3,77	1,05	50
4	3	1	2,61	3,66	1,05	43
5	3	1	2,72	3,87	1,15	45
6	3	1	2,72	3,66	0,94	47
7	3	1	2,61	3,77	1,15	50
8	3	2	2,72	3,77	1,05	5
9	3	1	2,82	3,87	1,05	46
10	3	1	2,82	3,87	1,05	47
11	3	1	2,82	3,77	0,94	54
12	3	1	2,82	3,66	0,84	45
13	3	1	2,82	3,77	0,94	40
14	3	1	2,61	3,87	1,26	51
15	3	1	2,72	3,98	1,26	53

ID	Grupo	vel_vertical_M1	vel_vertical_M2	vel_vertical_M3	dist_total_M1	dist_total_M2	dist_total_M3	vel_global_M1	vel_global_M2	vel_global_M3
1	1	0,57	0,58	0,18	3,5	3,8	13,4	0,67	0,73	0,79
2	1	0,40	0,35	0,29	5,0	7,2	9,0	0,67	0,84	0,87
3	1	0,52	0,33	0,18	4,8	6,4	13,3	0,83	0,70	0,80
4	1	0,31	0,41	0,37	4,7	4,1	8,0	0,48	0,57	1,00
5	1	0,53	0,35	0,17	4,2	5,3	13,3	0,75	0,61	0,77
1	2	0,09	0,31	0,42	18,6	6,5	4,4	0,56	0,66	0,63
2	2	0,14	0,09	-	11,5	20,9	-	0,56	0,60	-
3	2	0,10	0,57	0,29	16,2	4,4	7,3	0,56	0,84	0,72
4	2	0,16	0,27	-	9,8	9,6	-	0,52	0,85	-
5	2	0,18	0,14	-	15,7	12,6	-	0,95	0,58	-
1	3	0,23	0,25	0,27	9,6	9,8	6,7	0,73	0,80	0,6
2	3	0,24	0,22	0,25	8,5	8,2	8,9	0,69	0,60	0,73
3	3	0,98	0,45	0,30	3,6	5,4	9,8	1,17	0,81	0,99
4	3	0,93	0,39	0,60	4,1	7,6	5,1	1,26	1,00	1,01
5	3	0,20	1,15	0,40	9,6	3,5	5,8	0,64	1,33	0,77

Anexo 8: Gráfico com média e desvio padrão do número total de juvenis por postura

