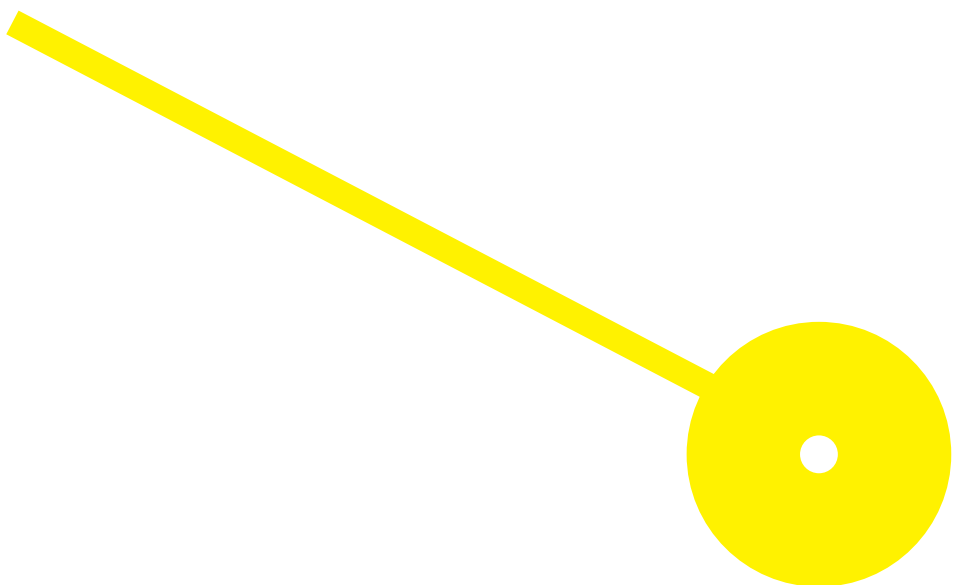




Efeitos colaterais do ultrassom: estudo randomizado controlado aplicado em organismos modelo

Maria Inês Silva Lameira

06/2023





**Centro de Investigação
em Reabilitação**

Center for Rehabilitation Research

Efeitos colaterais do ultrassom: estudo randomizado controlado aplicado em organismos modelo

Autor

Maria Inês Silva Lameira

Orientadores

Professora Doutora/Piedade Barros/ ESS.PP - CISA

Professora Doutora/Andreia Noites/ ESS.PP

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

Quero exprimir o meu profundo agradecimento a todos aqueles que foram fundamentais para o sucesso deste projeto.

Primeiramente, quero agradecer à minha orientadora, Piedade Barros, e à minha co-orientadora, Andreia Noites. A sua orientação, competência e incentivo foram essenciais em todas as etapas deste trabalho. Além disso, quero demonstrar o meu apreço ao professor Carlos Crasto pela valiosa ajuda na parte da estatística. A sua orientação e conhecimento foram cruciais para a análise dos dados e para a interpretação dos resultados.

Sou ainda muito grata ao professor Rubim Santos, pela sua ajuda e orientação na análise de vídeos.

Quero também agradecer imensamente à minha família – a minha mãe, o meu pai, a minha irmã e a minha avó – pelo acompanhamento e motivação ao longo deste percurso. O amor e apoio foram a base fundamental das minhas conquistas.

Agradeço também ao meu namorado pelo apoio contínuo, paciência e compreensão durante os momentos desafiantes deste projeto. A sua presença ao meu lado foi uma fonte de motivação e conforto.

Não posso deixar de mencionar a minha colega de investigação, Inês Pontes, pela colaboração e partilha de ideias ao longo do projeto. A sua dedicação e entusiasmo foram motivadores e enriqueceram o nosso trabalho.

Por fim, quero agradecer à Mariana que trabalha no CISA. A sua contribuição e assistência no ambiente de pesquisa foram inestimáveis, tornando possível a realização deste estudo com sucesso.

A todos vocês, o meu profundo agradecimento. Sem o apoio, incentivo e colaboração de cada um, este trabalho não teria sido possível.

Sou verdadeiramente grata por ter tido a oportunidade de trabalhar com pessoas tão excepcionais.

“É esta a vantagem da ambição, podes não chegar à lua, mas tiraste os pés do chão” (Da Weasel).

Resumo

Introdução: Existem poucos estudos sobre os efeitos colaterais da utilização do ultrassom em Fisioterapia, apesar dos seus efeitos terapêuticos bem documentados. **Objetivo:** Avaliar os efeitos colaterais do ultrassom, com recurso ao organismo *Daphnia magna*. **Metodologia:** Estudo randomizado controlado em 45 organismos, distribuídos por três grupos (n=15): Controlo (GC), Grupo exposto uma vez (GE_{US1}) e Grupo exposto duas vezes ao ultrassom (GE_{US2}). Os grupos expostos foram submetidos aos seguintes parâmetros: meio de aplicação subaquático, modo contínuo, frequência de 3 MHz, intensidade de 1.5 W/cm² e um tempo de aplicação de 13 minutos. Os três grupos foram mantidos nas mesmas condições de cultura. Durante 21 dias, foram registados diariamente os valores de sobrevivência, crescimento e reprodução, com a resposta sensório-motora avaliada nos 11^o (M1), 13^o (M2) e 31^o (M3) dias de idade. Foram realizados os testes ANOVA, Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com um nível de significância de 0,05. **Resultados:** A sobrevivência foi de 93,33% no GE_{US2} e de 100% nos restantes grupos. O GC foi menor em tamanho (p<0,001), em todos os momentos de avaliação. Em M1, o GE_{US1} apresentou velocidades superiores ao GC (p=0,008). Em M2, os grupos expostos apresentaram velocidades superiores ao GC (GE_{US1}>GC: p=0,013/GE_{US2}>GC: p=0,015). Em M3, o GE_{US2} registou diferenças na distância percorrida (GE_{US2}<GC: p=0,008). A reprodução do GE_{US1} foi menor, relativamente ao GC (GE_{US1}<GC: p=0,026). **Conclusão:** O ultrassom na dose terapêutica utilizada altera a resposta sensório-motora e a reprodução das *Daphnia magna*.

Palavras-chave: Ondas sonoras; Fisioterapia; Efeitos colaterais; *Daphnia magna*

Abstract

Introduction: There are few studies on the side effects of using ultrasound in physical therapy, despite its well-documented therapeutic effects. **Objective:** Evaluate the side effects of ultrasound using the organism *Daphnia magna*. **Methodology:** Randomized Controlled Trial in 45 organisms, distributed by three groups (n=15): Control (CG), Group exposed once (GE_{US1}) and Group exposed twice to ultrasound (GE_{US2}). The exposed groups were subjected to the following parameters: underwater application, continuous mode, frequency of 3 MHz, intensity of 1.5 W/cm² and an application time of 13 minutes. The three groups were maintained under the same culture conditions. For 21 days, survival, growth and reproduction values were recorded daily, with the sensory-motor response evaluate on the 11th (M1), 13th (M2) and 31st (M3) days of age. ANOVA, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were performed, with a significance level of 0.05. **Results:** Survival was 93.33% in GE_{US2} and 100% in the remaining groups. The CG was smaller in size (p<0.001), at all evaluation moments. In M1, GE_{US1} had higher velocities than CG (p=0.008). In M2, the exposed groups showed higher velocities than the CG (GE_{US1}>CG: p=0.013/GE_{US2}>CG: p=0.015). At M3, GE_{US2} recorded differences in distance traveled (GE_{US2}<CG: p=0.008). The reproduction of GE_{US1} was lower, relative to GC (GE_{US1}<CG p=0.026). **Conclusion:** Ultrasound at the therapeutic dose used alters the sensory-motor response and reproduction of *Daphnia magna*.

Keywords: Sound waves; Physiotherapy; Side effects; *Daphnia magna*

Índice

1.	Introdução.....	1
2.	Métodos.....	4
2.1.	Desenho de estudo	4
2.2.	Amostra.....	4
2.3.	Instrumentos.....	4
2.3.1.	Instrumentos de avaliação.....	4
2.3.2.	Equipamentos de fisioterapia	5
2.4.	Procedimentos	5
2.4.1.	Estudo piloto	5
2.4.2.	Procedimento experimental.....	6
2.4.2.1	Sobrevivência	7
2.4.2.2	Crescimento	7
2.4.2.3	Resposta sensório-motora	8
2.4.2.4	Reprodução	9
2.5.	Análise de Dados	10
3.	Resultados.....	11
3.1.	Sobrevivência	11
3.2.	Crescimento.....	11
3.3.	Resposta sensório-motora.....	12
3.4.	Reprodução.....	13
4.	Discussão.....	14
5.	Conclusão.....	18
	Referências Bibliográficas	19
	Anexos.....	23

Índice de abreviaturas

Cm – Centímetro

MHz – Megahertz

mL – Mililitro

mm – Milímetro

°C – Grau Celsius

s – Segundo

W – Watt

1. Introdução

Atualmente, muitas são as tecnologias utilizadas na fisioterapia que tornam os tratamentos mais eficazes. Embora os seus efeitos terapêuticos e benefícios estejam, maioritariamente, bem documentados, poucos são os estudos existentes 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).

Os equipamentos de ondas sonoras, nomeadamente o ultrassom, funcionam através de um transdutor que converte energia elétrica em energia mecânica, utilizando o princípio do efeito piezoelétrico invertido. O equipamento é composto por um cristal piezoelétrico que altera a sua espessura conforme a intensidade que lhe é aplicada. Este tipo de tecnologia é capaz de produzir efeitos terapêuticos, tais como: aumento do fluxo sanguíneo, estimulação da regeneração de tecidos, aumento do metabolismo celular, alteração da permeabilidade da membrana celular e síntese de proteínas (Cordero, 2008; Kitchen, 2003; Tassinary et al., 2019).

O ultrassom pode ser realizado de duas formas: no modo contínuo, onde existe a passagem de corrente de forma contínua durante todo o período de tratamento, ou no modo pulsátil, onde a corrente é aplicada em pulsos, alternando entre ligado e desligado com intervalos específicos. Os efeitos do ultrassom resultam do modo em que é aplicado, assim, quando aplicado no modo contínuo ocorre um efeito térmico e aquando do modo pulsátil ocorre um efeito mecânico. É difícil determinar de forma precisa o limite entre as alterações fisiológicas resultantes do calor e as causadas pelo impacto da onda sonora, no entanto, o efeito mecânico é o primeiro a manifestar-se (Cordero, 2008; Kitchen, 2003).

Ao aplicar o ultrassom num meio líquido, ocorre um processo denominado de cavitação. A cavitação refere-se à formação e ao colapso de pequenas bolhas de gás no líquido, que ocorrem devido às variações de pressão provocadas pelo equipamento de ultrassom. Existem dois tipos de cavitação associadas ao ultrassom: a cavitação estável e a cavitação inercial. Na cavitação estável as bolhas de gás variam de tamanho, mas não colapsam completamente. Este tipo de cavitação pode ajudar a melhorar a permeabilidade das membranas celulares e a facilitar a absorção de medicamentos. Por outro lado, na cavitação inercial, as bolhas de gás colapsam violentamente, gerando ondas de choque e jatos microscópicos de líquido ao seu

redor, o que pode provocar danos teciduais (Martines et al., 2000; Oliveira et al., 2018). Na fisioterapia dermatofuncional, é desejável evitar o efeito da cavitação inercial, pelo que se mantém o transdutor do ultrassom em movimento contínuo para prevenir esse efeito. Ao manter o transdutor do ultrassom em movimento constante, é possível distribuir a energia do ultrassom mais uniformemente, reduzindo a probabilidade de concentração excessiva de energia numa área específica. Além disso, este movimento contínuo ajuda a evitar a estagnação das bolhas de gás num único local, permitindo que elas se dissipem ou se desintegrem gradualmente, sem colapsar violentamente (Martines et al., 2000; Oliveira et al., 2018; Sousa et al., 2022).

A compreensão dos efeitos prejudiciais da aplicação do ultrassom é essencial na fisioterapia dermatofuncional devido aos avanços tecnológicos que ocorrem transversalmente em vários contextos.

Existem fatores conhecidos que podem predispor à celulite, como a hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos, as alterações vasculares e a perda de elasticidade das fibras de colagénio (Tassinari et al., 2019). Com base nesta informação, o uso do ultrassom provoca uma diminuição do volume do tecido adiposo, resultando numa consequente redução da celulite, devido aos danos dérmicos e rompimento das paredes dos adipócitos causados pelo equipamento (Santos & Guimarães, 2019). Além disso, o uso do ultrassom no modo contínuo tem a capacidade de estimular o alinhamento e a organização das fibras de colagénio, através da sua resposta térmica. Por esta razão o ultrassom é um equipamento utilizado no tratamento da celulite fibrótica (Tassinari et al., 2019).

De modo a estudar os efeitos colaterais do ultrassom, 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 um tempo de vida médio relativamente curto (\approx 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 3 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 diplóides resultantes de reprodução assexuada que ocorre quando existe abundante alimento e condições ambientais favoráveis. Estes organismos são partenogénéticos, as fêmeas reproduzem-se assexuadamente originando descendentes geneticamente idênticos (Kim et al., 2014).

Estes organismos aquáticos são amplamente utilizados em trabalhos de investigação há várias décadas, principalmente 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 (Yağcılar & Yardimci, 2021).

O presente estudo tem como objetivo avaliar se ocorrem os efeitos colaterais do equipamento ultrassom, a partir do estudo no organismo modelo da espécie *Daphnia magna*.

2. Métodos

2.1. Desenho de estudo

A metodologia utilizada para a investigação foi de natureza quantitativa, adotando um desenho de estudo experimental randomizado controlado. Neste estudo, todos os participantes elegíveis da amostra foram aleatoriamente distribuídos em três grupos distintos: o grupo de controlo e os dois grupos experimentais.

Este estudo foi elaborado no Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA) da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto, em Portugal. A pesquisa adotou as diretrizes estabelecidas pelo *Consolidated Standards of Reporting Trials* (CONSORT).

2.2. Amostra

A população alvo deste estudo foi constituída por 45 *Daphnia*. Para a seleção da amostra foram estabelecidos como critérios de inclusão, especificamente, juvenis de *Daphnia* com dez dias de vida provenientes de fêmeas que se reproduziram por partenogénese em laboratório. As fêmeas progenitoras, foram mantidas em condições constantes e otimizadas de temperatura, fotoperíodo e alimentação, visando garantir o mesmo padrão para todos os descendentes. Por outro lado, *Daphnia* que morreram antes da exposição foram excluídas da amostra devido ao critério de exclusão relacionado à mortalidade prévia à exposição. Das 45 *Daphnia* da população inicial, nenhuma foi excluída inicialmente.

A amostra final foi distribuída de forma aleatória e equitativa em três grupos, seguindo a condição de que os participantes do estudo detenham a mesma probabilidade de receber tanto a intervenção a ser testada quanto o grupo de controlo (Collins et al., 1996). Quinze *Daphnia* foram alocadas no Grupo de Controlo (GC), outras quinze *Daphnia* foram designadas para o Grupo Experimental exposto uma vez ao ultrassom (GE_{US1}) e as quinze *Daphnia* restantes foram colocadas no Grupo Experimental exposto duas vezes ao ultrassom (GE_{US2}).

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 da antena.

2.3.2. Equipamentos de fisioterapia

Ultrassom SONOPULS 692 - ENRAF NONIUS:

Foi utilizado o equipamento de ultrassom SONOPULS 692, da marca ENRAF NONIUS, com o acessório de tratamento de multifrequência de 1 e 3 MHz, com 5 cm² para a série 6.

2.4. Procedimentos

Para a cultura e reprodução das *Daphnia*, utilizou-se o meio de cultura "M4" (Elendt & Bias, 1990) (Anexo 1). As *Daphnia* foram mantidas em frascos de vidro graduados de 500 mL contendo 400 mL de meio. O meio de cultura foi renovado a cada dois dias. As culturas foram mantidas a uma temperatura de 20±1^o C, com um fotoperíodo de catorze horas de luz e dez horas de escuro. A alimentação diária consistiu em células da microalga *Chlorella vulgaris*, com uma concentração de 3x10⁵ células por mL de meio.

2.4.1. Estudo piloto

Realizou-se um estudo piloto para testar a sobrevivência das *Daphnia* e avaliar a viabilidade do estudo na resposta ao ultrassom. Para a obtenção dos organismos da amostra,

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

foi necessário isolar duas fêmeas e aguardar até que libertassem várias posturas². Para o estudo piloto, foram selecionadas vinte *Daphnia* com idades heterogêneas, as quais foram distribuídas de forma equitativa e aleatória em dois frascos de 500 mL contendo 400 mL de meio de cultura. Um dos frascos, com um total de dez *Daphnia*, foi designado como grupo experimental e submetido a uma única exposição ao equipamento de ultrassom, seguindo os seguintes parâmetros: meio de aplicação subaquático, modo contínuo, frequência de 3 MHz, intensidade de 1.5 W/cm² e um tempo de aplicação de 13 minutos (Tassinari et al., 2019). Por outro lado, o outro frasco, também com dez *Daphnia*, foi designado como grupo de controle e não foi exposto ao ultrassom.

A avaliação da sobrevivência dos organismos no estudo piloto foi realizada após 24 e 48 horas da exposição. As *Daphnia* foram consideradas mortas quando não ocorriam movimentos, 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 duas normas (OECD, 2004, 2012) adaptadas ao presente trabalho. Utilizaram-se organismos com dez dias de vida, geneticamente idênticos, obtidos por partenogênese a partir de fêmeas isoladas previamente e mantidas em laboratório, em condições controladas.

Para a realização do estudo, trinta organismos foram submetidos ao tratamento de ultrassom e os quinze restantes foram utilizados como grupo de controle. As *Daphnia* foram distribuídas aleatória e equitativamente em três frascos de 500 mL contendo meio de cultura.

O protocolo de exposição foi o seguinte: quinze *Daphnia*, pertencentes ao GE_{US1}, foram transferidas, cuidadosamente, com o auxílio de uma pipeta de plástico, para uma tina, com meio de cultura. Aqui, elas foram submetidas ao tratamento com ultrassom, seguindo os seguintes parâmetros: meio de aplicação subaquático, modo contínuo, frequência de 3 MHz, intensidade de 1.5 W/cm² e um tempo de aplicação de 13 minutos (Tassinari et al., 2019). O tempo de aplicação foi calculado, sabendo que equivale a 1 minuto por ERA (área efetiva de radiação). Os parâmetros aplicados foram baseados nos utilizados na prática clínica em fisioterapia dermatofuncional e na evidência científica disponível para o tratamento da patologia celulite fibrótica.

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

O mesmo procedimento foi realizado com as quinze *Daphnia* do GE_{US2}.

Após 48 horas, os organismos do GE_{US2} foram expostos novamente ao mesmo tratamento de ultrassom.

Após as exposições ao ultrassom, 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 das funções descritas nos pontos seguintes. No caso do GE_{US1}, as *Daphnia* foram separadas ao décimo dia de vida, enquanto no GE_{US2}, as *Daphnia* foram separadas ao décimo segundo dia de vida, ambas após as exposições.

Os restantes quinze organismos, pertencentes ao grupo de controlo, não foram submetidos a qualquer tratamento de ultrassom, permanecendo nas condições laboratoriais de cultura usadas no estudo.

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 das *Daphnia*, foi realizado o 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 libertadas na muda, de todos os organismos durante um período de 21 dias, iniciando-se a recolha ao décimo dia de vida. 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 descongelar, procedeu-se à medição do primeiro exopódito da segunda antena das carapaças libertadas ao décimo terceiro e ao vigésimo nono dias de idade de cada *Daphnia* (Anexo 3).

As carapaças foram colocadas cuidadosamente numa lâmina de vidro e cobertas por uma lamela, sendo posteriormente observadas ao microscópio. Esta avaliação foi realizada digitalmente pelo programa *Leica Acquire* com recurso a uma fotografia (Figura 1 e 2).

Os valores obtidos para o comprimento do primeiro exopódito da segunda antena, foram convertidos em comprimento do corpo, utilizando a equação desenvolvida por Pereira et al. (2004) (Anexo 4). Através desta fórmula, foi possível obter os resultados das primeira e última

medições, correspondendo ao comprimento do corpo dos organismos com treze e vinte e nove dias de idade, respetivamente.

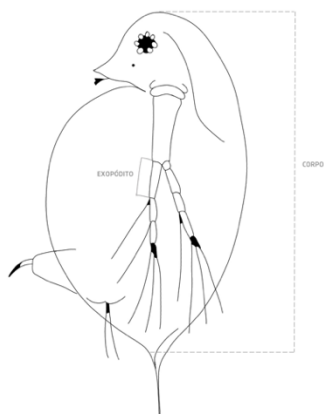


Figura 1 – *Daphnia magna* com a localização do exopódito na segunda antena

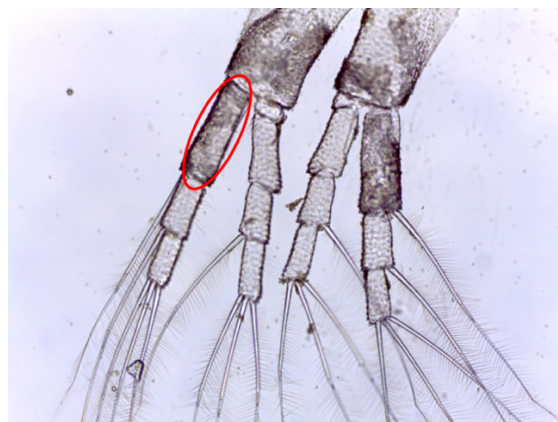


Figura 2 – Primeiro exopódito da segunda antena (ampliação 100x)

2.4.2.3 Resposta sensório-motora

Na primeira avaliação da resposta sensório-motora (M1), realizada onze dias após o nascimento, foram selecionados cinco organismos do GC e cinco organismos do GE_{U51}. Para não existirem efeitos cumulativos na quantificação das variáveis, nenhuma *Daphnia* foi avaliada mais do que uma vez. Assim foram garantidas as mesmas condições para todos os organismos, não sendo possível relacionar com efeitos de fadiga ou exposição a meio menos controlado durante as avaliações.

Para a realização da avaliação, cada *Daphnia* foi transferida, cuidadosamente, para um tubo com altura de catorze centímetros, contendo 50 mL de meio de cultura. No tubo, já estavam marcados o ponto inicial e o ponto final, com uma distância de três centímetros entre eles. De seguida, o tubo foi coberto com papel de alumínio para garantir que a *Daphnia* se encontrava no fundo do tubo antes do início da filmagem. A câmara de filmar estava posicionada a uma distância de dez centímetros do tubo.

De acordo com a bibliografia existente (Ringelberg, 1964), é conhecido que a *Daphnia* apresenta fototactismo positivo, ou seja, ela reage aos estímulos luminosos movendo-se em direção a eles. Com base nessa informação, durante a avaliação, uma lâmpada de luz visível foi posicionada acima do tubo, a uma distância de dois centímetros. Antes de iniciar a filmagem, todas as condições de teste foram verificadas, incluindo a confirmação de que a *Daphnia* estava no fundo do frasco. No início do registo da resposta sensório-motora, o papel de

alumínio foi removido, a fonte de luz responsável pelo estímulo luminoso foi ligada, para iniciar a gravação.

Os registos obtidos foram analisados 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. Com estes dados, foi possível calcular a velocidade do movimento e a distância percorrida da *Daphnia*.

Na segunda avaliação da resposta sensório-motora (M2), realizada treze dias após o nascimento, o procedimento utilizado na avaliação anterior (M1) foi repetido nos GC e GE_{US1} e também no GE_{US2}.

No final do teste, no trigésimo primeiro dia de vida dos organismos, foi realizada uma nova avaliação (M3), seguindo o mesmo protocolo das avaliações anteriores (M1 e M2) (Anexo 5).

2.4.2.4 Reprodução

Relativamente à avaliação da reprodução, esta foi conduzida de forma tanto qualitativa quanto quantitativa. Os juvenis libertados em cada postura, descendentes de fêmeas expostas ao ultrassom e do controlo, foram quantificados e inspecionados com o auxílio da lupa e foram classificados em ovos abortados (OA), juvenis mortos (JM) e juvenis imóveis (JI) (Anexo 6).

Na tabela 1 apresenta-se uma visão geral da metodologia utilizada no estudo.

Tabela 1 - Esquematização da metodologia utilizada no estudo

	10 dias após o nascimento	11 dias após o nascimento	12 dias após o nascimento	13 dias após o nascimento	...	31 dias após o nascimento
GC	S C R	RS - M1 S C R	S C R	RS - M2 S C R	S C R	RS - M3 S C R
GE _{US1}	E S C R	RS - M1 S C R	S C R	RS - M2 S C R	S C R	RS - M3 S C R
GE _{US2}	E S C R	RS - M1 S C R	E S C R	RS - M2 S C R	S C R	RS - M3 S C R

Legenda: GC: Grupo de Controlo; GE_{US1}: Grupo Experimental exposto uma vez ao ultrassom; GE_{US2}: Grupo Experimental exposto duas vezes ao ultrassom; E: Exposição ao ultrassom; RS: Avaliação da resposta sensório-motora; S: Avaliação da sobrevivência; C: Avaliação do crescimento; R: Avaliação da reprodução; 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.

2.5. Análise de Dados

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

A comparação entre grupos (anexo 7) na variável reprodução, foi realizada através do teste ANOVA, seguido das comparações múltiplas com o teste de Tukey. Para as restantes variáveis foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido das comparações múltiplas de Dunn. Especificamente para a resposta sensório-motora em M1, uma vez que só existiam 2 grupos em análise (GC e GE_{US1}) foi utilizado o teste de Mann-Whitney. A utilização dos diferentes tipos de testes prendeu-se com o cumprimento dos pressupostos dos testes, nomeadamente o pressuposto da normalidade (verificado por meio do teste de Shapiro-Wilk).

A média e desvio padrão e a mediana e os percentis 25 e 75 foram utilizados como estatística descritiva, de acordo com o tipo de testes utilizado (Marôco, 2014).

3. Resultados

3.1. Sobrevivência

No estudo piloto, não foi registada mortalidade no grupo experimental nem no grupo de controlo.

Durante os 21 dias em que as *Daphnia* foram avaliadas, apenas foi registada uma morte no GE_{US2} (ocorrido com 25 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.

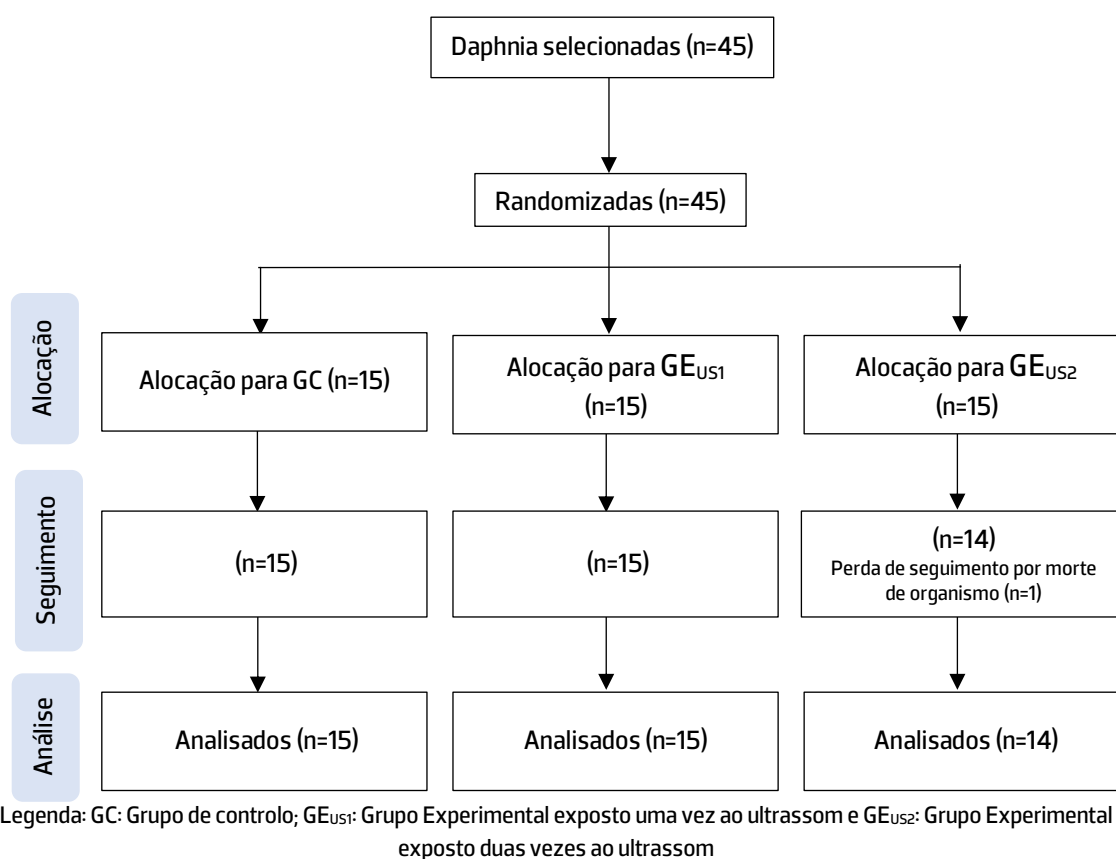


Figura 3 - Diagrama da amostra

3.2. Crescimento

Quando analisadas as dimensões das *Daphnia* entre os grupos (tabela 2) verificaram-se diferenças significativas na primeira e última medições e no respetivo crescimento (última medição – primeira medição) ($p < 0,001$). Especificamente, observou-se que em todos os momentos o GC apresentou dimensões significativamente menores do que os restantes

grupos ($p < 0,001$), não se tendo observado diferenças significativas entre os grupos que tiveram uma ou duas exposições ao ultrassom ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Mediana e desvio padrão do tamanho e crescimento

	Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	Valor p (comparações múltiplas)
Tamanho (mm)		
Primeira Medição		
GC	2,19 (2,19; 2,30)	<0,001
GE _{US1}	2,82 (2,61; 2,93)	(GE _{US1} >GC: $p < 0,001$)
GE _{US2}	2,72 (2,66; 2,72)	(GE _{US2} >GC: $p < 0,001$)
Última Medição		
GC	2,93 (2,93; 3,03)	<0,001
GE _{US1}	3,77 (3,77; 3,87)	(GE _{US1} >GC: $p < 0,001$)
GE _{US2}	3,77 (3,66; 3,79)	(GE _{US2} >GC: $p < 0,001$)
Crescimento		
GC	0,73 (0,63; 0,84)	<0,001
GE _{US1}	1,05 (0,95; 1,16)	(GE _{US1} >GC: $p < 0,001$)
GE _{US2}	1,08 (0,95; 1,12)	(GE _{US2} >GC: $p < 0,001$)

N amostral = 15 em cada grupo (n=14 no GE_{US2})

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_{US1}:

Grupo Experimental exposto uma vez ao ultrassom e GE_{US2}: Grupo Experimental exposto duas vezes ao ultrassom

3.3. Resposta sensório-motora

Relativamente à resposta sensório-motora observou-se que (tabela 3) em M1 o GE_{US1} apresentou uma velocidade significativamente superior ao GC ($p = 0,008$), sem ser acompanhada por uma diferença significativa na distância percorrida ($p > 0,05$). Em M2, já com o GE_{US2} em análise, observaram-se resultados semelhantes aos de M1, quer em termos da velocidade (GE_{US1}>GC: $p = 0,013$ / GE_{US2}>GC: $p = 0,015$), quer em termos da distância percorrida ($p > 0,05$). Em M3 o comportamento foi distinto, detetando-se diferenças significativas entre os grupos ao nível da distância percorrida ($p = 0,026$) e não na velocidade ($p > 0,05$). Na distância percorrida o GC apresentou valores superiores aos restantes grupos, tendo sido significativo apenas face ao GE_{US2} (GE_{US2}<GC: $p = 0,008$).

Tabela 3 – Mediana e percentis da distância percorrida e velocidade

Distância percorrida (cm)		Valor p (comparações múltiplas)	Velocidade (cm/s)		Valor p (comparações múltiplas)
Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)			Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)		
M1			M1		
GC	4,7 (3,85; 4,90)	>0,05	GC	0,67 (0,58; 0,79)	0,008 (GE _{US1} >GC)
GE _{US1}	4,7 (3,40; 8,55)		GE _{US1}	0,97 (0,87; 1,41)	
M2			M2		
GC	5,3 (3,95; 6,80)	>0,05	GC	0,7 (0,59; 0,79)	0,016 (GE _{US1} >GC: p=0,013) (GE _{US2} >GC: p=0,015)
GE _{US1}	4,8 (3,85; 8,00)		GE _{US1}	0,98 (0,82; 1,60)	
GE _{US2}	6,6 (4,85; 8,73)		GE _{US2}	1,12 (0,90; 1,24)	
M3			M3		
GC	13,3 (8,50; 13,35)	0,026 (GE _{US2} <GC: p=0,008)	GC	0,8 (0,78; 0,94)	>0,05
GE _{US1}	7,2 (4,90; 10,25)		GE _{US1}	0,69 (0,60; 0,97)	
GE _{US2}	4,9 (4,25; 6,98)		GE _{US2}	1 (0,71; 1,29)	

N amostral = 5 em cada grupo (n=4 em M3 no GE_{US2})

Legenda: P₂₅: Percentil 25; P₇₅: Percentil 75; GC: Grupo de controlo; GE_{US1}: Grupo Experimental exposto uma vez ao ultrassom; GE_{US2}: Grupo Experimental exposto duas vezes ao ultrassom; 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

A exposição às correntes de ultrassom influenciou ainda a reprodução das *Daphnia* (tabela 4), tendo sido observado que o GE_{US1} apresentou significativamente menor número de juvenis comparativamente ao GC (GE_{US1}<GC: p=0,026). Pela estatística descritiva foi possível observar uma diferença em média de menos 4,4 juvenis, correspondendo a cerca de menos 10% do que no GC.

Relativamente à caracterização dos juvenis, não se observaram OA e JI. Apenas existiram sete JM em quatro *Daphnia* do GE_{US1} e uma *Daphnia* do GE_{US2}, em posturas diferentes (Anexo 8).

Tabela 4 – Média e desvio padrão da variável reprodução

	Média (Desvio P)	Valor p (comparações múltiplas)
Reprodução		
Nº total de juvenis		
GC	47,7 (3,99)	0,038 GE _{US1} <GC (p=0,026)
GE _{US1}	43,3 (4,69)	
GE _{US2}	45,3 (4,91)	

N amostral = 15 em cada grupo (n=14 no GE_{US2})

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

4. Discussão

O objetivo deste estudo foi compreender os possíveis efeitos colaterais do equipamento de ultrassom utilizado na fisioterapia dermatofuncional.

Devido ao genoma bem definido e amplamente estudado do organismo modelo *Daphnia magna*, o *Daphnia Genomics Consortium* (DGC) defende o uso desse organismo como modelo de pesquisa para as interações ambientais (Bauer, 2007). Este organismo tem um ciclo de vida curto, o que permite estudar o crescimento, a resposta sensório-motora e a reprodução na infância e adolescência (Pellegrini et al., 2014; Tatarazako & Oda, 2007; Tollrian & Leese, 2010).

Relativamente à sobrevivência, os resultados do estudo piloto indicaram que para uma frequência de 3 MHz, intensidade de 1,5 W/cm² e um tempo de aplicação de 13 minutos, o ultrassom não causou danos letais aos organismos, o que levou à decisão de utilizar os mesmos valores como parâmetros do estudo final. De acordo com os resultados do estudo experimental, podemos concluir que, tanto no GC como no GE_{US1}, a sobrevivência dos organismos não sofreu alterações, uma vez que todos os organismos se mantiveram vivos ao longo de toda a experiência. Já no GE_{US2}, a sobrevivência foi afetada. Com base na referência citada (Wells, 1968), não se espera que a intensidade do ultrassom utilizada predisponha à mortalidade. Isso sugere que a causa da morte da *Daphnia* do GE_{US2} não esteja relacionada com o uso do ultrassom. É importante considerar outros fatores que possam ter contribuído para essa morte, como condições ambientais, alimentação, stress ou fatores individuais das *Daphnia* (Finch & Tanzi, 1997). Contudo, todas as *Daphnia* foram mantidas nas mesmas condições e, portanto, acredita-se que esta morte esteja associada a outros fatores não específicos ou a incidentes inexplicáveis (OECD, 2012).

No que diz respeito ao crescimento das *Daphnia*, foi possível aferir que o GC apresentava dimensões significativamente menores em todos os momentos, e no que diz respeito ao uso do ultrassom não se verificaram diferenças entre os dois grupos (GE_{US1} e GE_{US2}).

No estudo, inicialmente, esperava-se que o tamanho da primeira medição do corpo das *Daphnia* não apresentasse diferenças significativas entre os três grupos, uma vez que o intervalo de tempo entre a exposição ao ultrassom e a primeira medição pode não ser suficiente para que o equipamento cause um efeito mensurável no tamanho do corpo das *Daphnia*. Deste modo, é possível que esse resultado tenha sido influenciado pela distribuição não aleatória dos organismos pelos diferentes grupos. Por outro lado, em relação à última medição e ao crescimento, é importante considerar que a utilização do ultrassom pode levar a

alterações fisiológicas, incluindo o aumento do metabolismo celular, o incremento do fluxo sanguíneo e a alteração da permeabilidade das membranas (Rossi et al., 2018; Tassinary et al., 2019). Quando as *Daphnia* são expostas ao ultrassom, a energia mecânica gerada por este equipamento pode levar a um aumento da atividade metabólica celular, resultando num maior consumo de energia e, eventualmente, estimulando o crescimento dos organismos. Outro efeito do ultrassom é a possibilidade de alteração da permeabilidade da membrana celular. A energia mecânica do ultrassom pode afetar a estrutura das membranas celular, tornando-as mais permeáveis a substâncias (Oliveira et al., 2018). Contudo, os organismos pertencentes aos GE_{US1} e GE_{US2} por serem maiores, na primeira medição apresentaram maior comprimento, poderiam ter maior capacidade de filtração, resultando numa melhor capacidade de captar alimento e logo num maior crescimento.

Após as exposições, nas avaliações da resposta sensório-motora, foi observado que os organismos pertencentes aos grupos expostos ao ultrassom (GE_{US1} e GE_{US2}) apresentaram velocidades maiores, sem diferenças significativas em relação à distância percorrida. Isso pode ser atribuído ao maior tamanho das *Daphnia*, já que a velocidade está relacionada com o tamanho dos organismos. Estudos mostram que *Daphnia* de maior porte nadam mais rápido do que as de menor porte. Isso deve-se a uma maior força propulsora e uma maior superfície de contato com a água (Bownik, 2017; Dodson & Ramcharan, 1991). De acordo com estudos anteriores (Bownik, 2017), sabe-se que as *Daphnia* são capazes de alterar o seu comportamento em resposta ao stress físico. Desta forma, a exposição destes organismos ao ultrassom parece desencadear uma resposta comportamental que resulta num aumento da velocidade de movimento. Esta resposta pode ser interpretada como uma estratégia de fuga para evitar potenciais predadores ou situações adversas, conforme discutido num estudo recente (Egan et al., 2023).

Na terceira avaliação (M3), foram observadas diferenças entre os grupos em relação à distância percorrida. O grupo de controlo (GC) apresentou valores superiores em comparação com os outros grupos, não havendo diferenças significativas em relação à velocidade. As alterações observadas, demonstram que os organismos pertencentes aos grupos experimentais (GE_{US1} e GE_{US2}) obtiveram uma resposta mais direcionada ao estímulo. Isso pode ser atribuído aos efeitos do ultrassom no sistema nervoso e nas funções sensoriais dos organismos. Especialmente no modo contínuo, o ultrassom pode produzir efeitos positivos no processo de regeneração nervosa, melhorando a resposta funcional (Rossi et al., 2018). O

estímulo do ultrassom pode afetar a orientação e a coordenação dos movimentos das *Daphnia*, levando a um trajeto mais direcionado e menos errático (Ito et al., 2020; Rossi et al., 2018).

Foi observado que o efeito da velocidade foi revertido a longo prazo (M3), porém as *Daphnia* percorreram uma maior distância neste momento de avaliação. Isto pode indicar uma perda de orientação e coordenação nos movimentos das *Daphnia*. Estes resultados sugerem que ainda persistem efeitos do ultrassom, especialmente na orientação e coordenação dos movimentos destes organismos. Embora o efeito imediato tenha sido perdido, um efeito colateral manifestou-se, resultando num aumento da distância percorrida pelas *Daphnia*.

As *Daphnia* podem achar as vibrações do ultrassom stressantes, incapacitando-as de lidar com os seus efeitos por longos períodos, dependendo da intensidade e duração do estímulo. Essa sensibilidade ao ultrassom pode explicar a redução no número de juvenis nos grupos experimentais GE_{US1} e GE_{US2}. Sabe-se que as *Daphnia* podem mudar para o modo de reprodução sexuada em ambientes desfavoráveis (Tatarazako & Oda, 2007). Para verificarmos se o ultrassom é capaz de induzir esse tipo de reprodução, teríamos de efetuar um estudo mais prolongado que permitisse estudar a reprodução em várias gerações. Embora tenha sido observado que o GE_{US1} apresentou um número significativamente menor de juvenis comparativamente ao GC, estes dois grupos tiveram um aumento proporcional de juvenis ao longo do tempo (Anexo 9). No que diz respeito à caracterização dos juvenis, apenas existiram sete JM em quatro *Daphnia* do GE_{US1} e uma *Daphnia* do GE_{US2}, em posturas diferentes. Devido a este reduzido número e ao padrão aleatório de JM, não foi possível realizar uma associação direta com a exposição.

É importante destacar que a relação entre o uso do ultrassom e as variáveis estudadas ainda requer uma análise mais aprofundada e pode depender de diversos fatores, incluindo a intensidade, frequência e duração da exposição, bem como das características individuais dos organismos. É necessário ter em conta que o estudo foi realizado em organismos modelo, especificamente da espécie *Daphnia magna*. Embora estes organismos sejam amplamente utilizados em pesquisas científicas como um modelo para estudos de toxicologia e impactos ambientais, eles podem apresentar respostas diferentes em relação aos efeitos do ultrassom em seres humanos. As diferenças na fisiologia, estrutura e sensibilidade dos organismos podem influenciar as respostas aos estímulos do ultrassom. Importa referir que os resultados obtidos em estudos realizados em organismos modelo podem não ser diretamente

extrapoláveis para os efeitos em seres humanos. Estes aspetos devem ser considerados em estudos futuros para uma compreensão mais completa dos efeitos colaterais do ultrassom.

Sugere-se que estudos futuros possam abranger outros parâmetros, como marcadores bioquímicos e estudos genéticos, a fim de aprofundar a compreensão destes efeitos em outros níveis de organização. Considerando a capacidade das *Daphnia* de responder e adaptar-se a estímulos, este organismo apresenta potencial como modelo para estudos futuros na área da fisioterapia dermatofuncional, nomeadamente na utilização do ultrassom.

Uma limitação deste estudo foi a sua curta duração, que impediu a exploração de outros aspetos relevantes. Devido à duração limitada do estudo, podem existir outros fatores ou variáveis importantes que não foram abordados. Esta limitação destaca a necessidade de estudos futuros mais abrangentes e prolongados para uma compreensão mais completa dos efeitos do ultrassom.

Outra limitação identificada foi o pequeno n amostral na análise da resposta sensório-motora, o que pode levar a uma restrita extrapolação dos resultados.

Um viés identificado neste estudo é a possível falta de aleatoriedade na distribuição inicial das *Daphnia* nos frascos experimentais dos três grupos. Ao agrupar quinze *Daphnia* em cada frasco, pode ter ocorrido uma tendência de selecionar as *Daphnia* menos ativas primeiro, deixando potencialmente as mais rápidas para o final. Esta alocação não aleatória pode ter induzido uma diferença inicial entre os grupos, afetando os resultados do estudo.

Este trabalho pretende ser um primeiro contributo para estudos posteriores de maior complexidade. Por exemplo, uma possível continuação seria avaliar o efeito do ultrassom na estrutura das células adiposas e no tecido muscular, utilizando marcadores bioquímicos ou até estudos de biologia molecular. Estas abordagens mais avançadas permitiriam uma análise mais detalhada dos efeitos do ultrassom a níveis celulares e moleculares, proporcionando uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes. Esta linha de investigação poderia abrir portas para descobertas significativas e contribuir para a ampliação do conhecimento na área.

5. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo revelaram interações importantes entre o equipamento de ultrassom e os organismos modelo da espécie *Daphnia magna*. A sobrevivência dos organismos não foi afetada pelas doses do ultrassom utilizadas. O crescimento foi favorecido pela exposição ao ultrassom, no entanto este resultado pode estar influenciado pelo tamanho inicial dos organismos.

Os organismos apresentaram uma velocidade maior após as duas exposições ao ultrassom. Na última avaliação sensório-motora, os organismos não sujeitos ao ultrassom fizeram um percurso mais longo, mas com a mesma velocidade dos organismos expostos. O ultrassom induziu um aumento na velocidade dos organismos e promoveu um trajeto mais linear.

A exposição ao ultrassom reduziu o número de juvenis libertados pelas fêmeas, sugerindo um efeito negativo na reprodução.

Conclui-se que o ultrassom na dose terapêutica utilizada altera a resposta sensório-motora e a reprodução das *Daphnia magna*.

Referências Bibliográficas

- 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>
- Bownik, A. (2017). Daphnia swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. In *Science of the Total Environment* (Vols. 601–602, pp. 194–205). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.199>
- 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. M. (2008). *Agentes Físicos Terapéuticos*. La Habana: ECIMED.
- Dodson, S., & Ramcharan, C. (1991). Size-specific swimming behavior of *Daphnia pulex*. *Journal of Plankton Research*, 13(6), 1367–1379. <https://doi.org/10.1093/plankt/13.6.1367>
- 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*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2040/>
- Egan, N., Stinson, S. A., Deng, X., Lawler, S. P., & Connon, R. E. (2023). Swimming Behavior of *Daphnia magna* Is Altered by Pesticides of Concern, as Components of Agricultural Surface Water and in Acute Exposures. *Biology*, 12(3), 425. <https://doi.org/10.3390/biology12030425>
- 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*, *278*(5337), 407–411. <https://doi.org/10.1126/science.278.5337.407>
- Ito, A., Wang, T., Nakahara, R., Kawai, H., Nishitani, K., Aoyama, T., & Kuroki, H. (2020). Ultrasound therapy with optimal intensity facilitates peripheral nerve regeneration in rats through suppression of pro-inflammatory and nerve growth inhibitor gene expression. *PLOS ONE*, *15*(6), e0234691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234691>
- 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* (11ª edição). Manole.
- Marôco, J. (2014). Análise estatística com o SPSS Statistics. In *Análise e Gestão da Informação*.
- Martines, M. A. U., Davolos, M. R., & Júnior, M. J. (2000). *O EFEITO DO ULTRA-SOM EM REAÇÕES QUÍMICAS* (Vol. 23, Issue 2).
- Noël, F. (2013). Efeito adverso vs efeito colateral. *Newsletter Da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental*.
- OECD. (2004). *Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>
- OECD. (2012). *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. <https://doi.org/10.1787/9789264185203-en>
- Oliveira, A. P. A., Pires, K. da S., & Moreira, J. A. R. (2018, December). A atuação da cafeína biovetorizada e do ultrassom no tratamento da lipodistrofia localizada na região abdominal: revisão literária. *Medicina e Saúde*, *1*, 47–60.
- Pellegri, V., Gorbi, G., & Buschini, A. (2014). Comet Assay on *Daphnia magna* in ecogenotoxicity testing. *Aquatic Toxicology*, *155*, 261–268. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2014.07.002>
- 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>

- Ringelberg, J. (1964). The positively phototactic reaction of daphnia magna straus: A contribution to the understanding of diurnal vertical migration. *Netherlands Journal of Sea Research*, 2(3), 319–406. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0077-7579\(64\)90001-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0077-7579(64)90001-8)
- 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>
- Rossi, K. C., Olsson, D. C., & Costa, P. M. de A. (2018). Ultrassom terapêutico na regeneração nervosa – revisão sistemática e metanálise. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*, 6(1), 149–159. <https://doi.org/10.4025/revcivet.v6i1.42675>
- Santos, D. B., & Guimarães, M. M. (2019). Os Benefícios da Ultrassom no Tratamento da Fibro Edema Gelóide: Uma Revisão Bibliográfica / The Benefits of Fetal Ultrasound in the Treatment of Geloid Fibro Edema: A Bibliographic Review. *ID on Line Revista Multidisciplinar e de Psicologia*, 13(48), 712–726. <https://doi.org/10.14295/idonline.v13i48.2281>
- Smirnov, N. N. (2017). *PHYSIOLOGY OF THE CLADOCERA*. Academic Press.
- Sousa, A., Junior, R., Cabral, K., Bini, A., Oliveira, D., Cabral, F., Squinello, L., Veneziano, N., Sebastião, R., Cabral, C., & Silva, R. (2022). ULTRASSOM COMO RECURSO PARA REDUÇÃO DE GORDURA LOCALIZADA ULTRASOUND AS A RESOURCE FOR REDUCING LOCALIZED FAT. *Revista Multidisciplinar Do Nordeste Mineiro*, 2/2021.
- 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(1), 51. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-51>
- Wells, P. N. T. (1968). The effect of ultrasonic irradiation on the survival of *Daphnia magna*. *The Journal of Experimental Biology*, 49(1), 61–70. <https://doi.org/10.1242/jeb.49.1.61>

Yağcılar, Ç., & Yardimci, 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*, 22(4), 119–125. <https://doi.org/10.12911/22998993/134038>

Anexos

Anexo 1: 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 3: Folhas de registo diário das carapaças das *Daphnia*

GC - CAPARAÇAS																																																	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15																					
Idade	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo																			
10	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A																					
11	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A																					
12	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A																					
13	146	0,23	2,09	115	0,24	2,19	145	0,25	2,30	116	0,24	2,19	106	0,24	2,19	47	0,25	2,30	142	0,26	2,40	124	0,24	2,19	90	0,24	2,19	133	0,25	2,30	88	0,24	2,19	10	0,24	2,19	72	0,24	2,19	73	0,25	2,30	147	0,24	2,19				
14	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
15	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
16	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
17	171			188			184			181			186			182			187			185			190			207			174			175			193			169			178			A			
18	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
19	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
20	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
21	196			210			197			170			165			198			191			216			191			213			168			211			212			205			214			A			
22	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
23	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
24	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
25	139			80			513			540			516			137			138			538			515*			505			506			136			39			534			A						
26	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
27	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
28	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
29	253	0,31	2,9257	266	0,32	3,03	256	0,31	2,93	264	0,32	3,03	265	0,31	2,93	255	0,31	2,93	263	0,32	3,03	257	0,3	2,82	267	0,31	2,93	245	0,3	2,82	254	0,32	3,03	262	0,32	3,03	250	0,31	2,93	258	0,31	2,93	259	0,32	3,03	A			
30	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
31	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
Idade (dias)				Nº número da etiqueta no tubo Eppendorf		A - Carapaça ausente		P - Carapaça presente																																									

GE ₁₀₁ - CAPARAÇAS																																																	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15																					
Idade	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo										
10	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
11	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
12	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
13	P-305	0,28	2,61	P-320	0,28	2,61	P-312	0,29	2,72	P-291	0,3	2,82	P-322	0,28	2,61	P-323	0,28	2,61	P-321	0,3	2,82	P-311	0,31	2,93	P-314	0,31	2,93	P-315	0,29	2,72	P-294	0,3	2,82	P-301	0,3	2,82	P-317	0,28	2,61	P-510	0,31	2,93	P-298	0,31	2,93	A			
14	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
15	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
16	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
17	P-331			P-300			P-364			P-427			P-327			P-358			P-359			P-356			P-342			P-296			P-426			P-355			P-423			P-325			A						
18	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
19	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
20	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
21	P-429			P-432			P-428			P-371			P-431			P-425			P-430			P-422			P-344			P-421			P-332			P-381			P-424			P-372			P-415			A			
22	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
23	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
24	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
25	P-379			P-386			P-376			P-471			P-459			P-373			P-446			P-472			P-382			P-440			P-445			P-439			P-465			P-473			P-377			A			
26	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
27	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
28	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
29	P-443	0,39	3,77	P-448	0,38	3,66	P-463	0,4	3,87	P-516	0,39	3,77	P-486	0,39	3,77	P-461	0,4	3,87	P-453	0,41	3,98	P-532	0,39	3,77	P-450	0,4	3,87	P-442	0,39	3,77	P-482	0,4	3,87	P-531	0,39	3,77	P-508	0,39	3,77	P-490	0,38	3,67	P-468	0,41	3,98	A			
30	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
31	A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			A			
Exposição ao ultrassom				Nº número da etiqueta no tubo Eppendorf		A - Carapaça ausente		P - Carapaça presente																																									

GE ₁₀₂ - CAPARAÇAS																													
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15	
Idade	Nº	Tamanho exopódito	Tamanho corpo	Nº																									

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

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

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

GC - RESPOSTA SENSÓRIO-MOTORA					GE _{US1} - RESPOSTA SENSÓRIO-MOTORA					GE _{US2} - RESPOSTA SENSÓRIO-MOTORA				
Daphnia	Distância (cm)	Tempo (s)	Distância total (cm)	Velocidade global (cm/s)	Daphnia	Distância (cm)	Tempo (s)	Distância total (cm)	Velocidade global (cm/s)	Daphnia	Distância (cm)	Tempo (s)	Distância total (cm)	Velocidade global (cm/s)
1	3	5,23	3,50	0,67	1	3	4,91	4,74	0,97	6	3	2,58	3,99	1,55
2	3	7,48	5,03	0,67	2	3	8,14	10,28	1,26	7	3	5,32	6,67	1,25
3	3	5,8	4,83	0,83	3	3	2,18	3,37	1,55	8	3	6,34	6,54	1,03
4	3	9,68	4,65	0,48	4	3	8,22	6,83	0,83	9	3	3,55	4,30	1,21
5	3	5,64	4,21	0,75	5	3	3,78	3,44	0,91	10	3	10,91	9,40	0,86
6	3	5,16	3,79	0,73	6	3	5,22	3,94	0,75	11	3	x	x	x
7	3	8,6	7,21	0,84	7	3	8,80	8,59	0,98	12	3	3,36	4,06	1,21
8	3	9,08	6,40	0,70	8	3	2,46	3,77	1,53	13	3	6,92	4,73	0,68
9	3	7,24	4,13	0,57	9	3	8,39	7,40	0,88	14	3	3,86	5,09	1,32
10	3	8,64	5,31	0,61	10	3	2,89	4,84	1,67	15	3	9,64	7,59	0,79
11	3	16,95	13,38	0,79	11	3	14,53	9,99	0,69	x : Daphnia faleceu antes da avaliação sensório-motora				
12	3	10,34	8,96	0,87	12	3	9,98	10,46	1,05					
13	3	16,63	13,25	0,80	13	3	5,64	4,94	0,88					
14	3	8,04	8,02	1,00	14	3	9,56	4,87	0,51					
15	3	17,21	13,31	0,77	15	3	10,46	7,21	0,69					

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

GC - JUVENIS																															
Idade	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	TOTAL														
10																															
11																															
12																															
13	1		1		1		2		1		2		2		2		23														
14																															
15																															
16																															
17	6		7		9		6		8		7		6		7		107														
18																															
19																															
20																															
21	10		12		14		10		11		11		8		9		161														
22																															
23																															
24																															
25	12		13		16		11		12		12		11		10		187														
26																															
27																															
28																															
29	17		15		17		15		16		15		13		17		238														
30																															
31																															
Total	46		48		57		44		48		47		40		47		44		47		48		50		54		48		48		716

Idade (dias) JM: Juvenil morto
AO: Ovo abortado JI: Juvenil inviável

GE ₅₁ - JUVENIS																															
Idade	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	TOTAL														
10																															
11																															
12																															
13	2		2		2		1		1		1		1		2		24														
14																															
15																															
16																															
17	7		5		8		4		5		8		0/1/0		8		95														
18																															
19																															
20																															
21	5		7		6		6		7		9		10		10		117														
22																															
23																															
24																															
25	11		11		0/2/0		12		10		9		11		12		169														
26																															
27																															
28																															
29	16		0/1/0		18		18		16		17		15		18		245														
30																															
31																															
Total	41		43		46		37		39		44		49		45		34		51		41		45		47		40		48		650

Idade (dias) JM: Juvenil morto
AO: Ovo abortado JI: Juvenil inviável

Exposição ao ultrassom

GE ₅₂ - JUVENIS																															
Idade	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	Juvenis	OA/IM/J	TOTAL														
10																															
11																															
12																															
13	2		2		2		3		2		1		2		3		29														
14																															
15																															
16																															
17	10		6		6		8		4		8		11		8		119														
18																															
19																															
20																															
21	8		7		7		3		3		5		0/2/0		2		68														
22																															
23																															
24																															
25	15		17		14		13		15		15		13		15		198														
26																															
27																															
28																															
29	19		19		16		15		20		21		15		18		236														
30																															
31																															
Total	54		51		45		42		44		50		43		52		46		36		15		42		44		43		41		650

Idade (dias) JM: Juvenil morto
AO: Ovo abortado JI: Juvenil inviável

Exposição ao ultrassom

FALECEU

Anexo 7: Bases de dados utilizadas no SPSS

ID	Grupo	Sobrevivência	Prim_Carapaça	Ult_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	2,61	3,77	1,16	41
2	2	1	2,61	3,66	1,05	43
3	2	1	2,71	3,87	1,16	46
4	2	1	2,82	3,77	0,95	37
5	2	1	2,61	3,77	1,16	39
6	2	1	2,61	3,87	1,26	44
7	2	1	2,82	3,98	1,16	49
8	2	1	2,93	3,77	0,84	45
9	2	1	2,93	3,87	0,95	34
10	2	1	2,72	3,77	1,05	51
11	2	1	2,82	3,87	1,05	41
12	2	1	2,82	3,77	0,95	45
13	2	1	2,61	3,77	1,16	47
14	2	1	2,93	3,66	0,74	40
15	2	1	2,93	3,98	1,05	48
1	3	1	2,72	3,87	1,16	54
2	3	1	2,72	3,77	1,05	50
3	3	1	2,66	3,77	1,11	45
4	3	1	2,72	3,66	0,95	42
5	3	1	2,72	3,66	0,95	44
6	3	1	2,72	3,77	1,05	50
7	3	1	2,66	3,77	1,11	43
8	3	1	2,72	3,66	0,95	52
9	3	1	2,66	3,87	1,21	48
10	3	1	2,72	3,77	1,05	36
11	3	2	2,72			15
12	3	1	2,72	3,66	0,95	42
13	3	1	2,66	3,77	1,11	44
14	3	1	2,72	3,87	1,16	43
15	3	1	2,66	3,77	1,11	41

ID	Grupo	dist_total_M1	dist_total_M2	dist_total_M3	vel_global_M1	vel_global_M2	vel_global_M3
1	1	3,5	3,8	13,4	0,67	0,73	0,79
2	1	5,0	7,2	9,0	0,67	0,84	0,87
3	1	4,8	6,4	13,3	0,83	0,70	0,80
4	1	4,7	4,1	8,0	0,48	0,57	1,00
5	1	4,2	5,3	13,3	0,75	0,61	0,77
1	2	4,7	3,9	10,0	0,97	0,75	0,69
2	2	10,3	8,6	10,5	1,26	0,98	1,05
3	2	3,4	3,8	4,9	1,55	1,53	0,88
4	2	6,8	7,4	4,9	0,83	0,88	0,51
5	2	3,4	4,8	7,2	0,91	1,67	0,69
1	3		4,0			1,55	
2	3		6,7	4,1		1,25	1,21
3	3		6,5	4,7		1,03	0,68
4	3		4,3	5,1		1,21	1,32
5	3		9,4	7,6		0,86	0,79

Anexo 8: Gráfico de juvenis mortos por postura



Anexo 9: Gráfico com média e desvio padrão do número total de juvenis por postura

