

ARTICULAÇÃO

ITINERÁRIOS

NATUREZA

BNCC

“A mensagem central é: testar, testar e testar. Você não consegue parar essa pandemia se não souber quem está infectado”. A declaração do diretor geral da OMS acerca da tentativa de contenção mundial da pandemia do vírus Sars-CoV-2 traz para a esfera pública a discussão sobre a utilidade dos testes de detecção da infecção, em específico, a escolha entre os testes de tecnologia biomolecular e/ou imunoenaios. Esta edição trata de alguns tipos de testes para detecção de patógenos.





Como funcionam os testes que detectam o novo coronavírus

Procedimento é utilizado há décadas e permite que especialistas obtenham cópias do DNA do vírus

Por Sabrina Brito

Com o crescimento da pandemia do novo coronavírus, os testes que verificam a presença do vírus no organismo têm se tornado cada vez mais populares. Mas como funcionam os procedimentos?

O exame principal para esse fim é conhecido como RT-PCR e vem sendo utilizado em laboratórios desde o começo da década de 1980. Trata-se de uma técnica em que os cientistas conseguem coletar uma pequena porção de material genético do vírus e replicá-lo, tornando a amostra mais fácil de ser identificada.

O primeiro passo do teste, depois da coleta de material do paciente [geralmente por meio da passagem de um cotonete pela parte interior da bochecha], é a amostra chegar ao laboratório, onde os pesquisadores extraem do genoma do vírus uma parte chamada de ácido nucleico.

Depois, os cientistas conseguem ampliar algumas regiões específicas desse genoma por meio do uso da enzima polimerase. Esse processo permite que eles ampliem a amostra do material genético viral em cerca de 100 milhões de vezes, possibilitando sua comparação com outras amostras já obtidas da nova Covid-19.

Vale lembrar que o novo vírus possui aproximadamente 30 mil nucleotídeos [os blocos que compõem o material genético]. Para aumentar a rapidez e precisão do exame, o mais novo teste de RT-PCR que vem sendo utilizado em alguns países, criado pela Universidade de Washington (EUA), foca em apenas 100 desses nucleotídeos específicos da Covid-19.

Esses 100 nucleotídeos [estão associados a] dois genes, os quais os cientistas podem comparar com suas amostras do vírus. Uma amostra é considerada positiva se o teste constata a presença de ambos os genes no material genético do paciente. Se apenas um dos genes é encontrado, o teste é dado como inconclusivo. Se nenhum dos dois genes está presente, o resultado é negativo.

Outra opção de teste é o sorológico, em que o foco é na busca por anticorpos específicos que o corpo costuma produzir quando infectado pela Covid-19.

Se esses anticorpos forem identificados, é sinal de que o organismo está ou esteve “em batalha” com o novo vírus. Tanto Singapura quanto a China expediram alguns testes desse tipo.

Uma vantagem desse procedimento é a de que os anticorpos podem ser detectados no sangue mesmo depois de o paciente estar recuperado, enquanto o teste da polimerase apontará para a presença do vírus somente se o indivíduo ainda estiver doente.

No entanto, ambos possuem falhas: se as amostras forem colhidas cedo demais ou quando o corpo do paciente ainda não tiver começado a produzir anticorpos, os resultados podem ser falsos negativos. A produção de anticorpos pode levar até uma semana, de acordo com especialistas.

Ambos são procedimentos relativamente simples, que costumam levar cerca de 72h para serem realizados. No entanto, frente à recente demanda inesperada desses testes, a realização desses processos têm demorado dias ou até mesmo semanas. Existem testes mais rápidos pelo mundo, mas eles ainda estão indisponíveis no mercado global.

Brito, S. Como funcionam os testes que detectam o novo coronavírus. **Veja** —Ciência. 24 mar. 2020. Disponível em:<<https://veja.abril.com.br/ciencia/como-funcionam-os-testes-que-detectam-o-novo-coronavirus/>>. Acesso em: 20 abr. 2020





Os testes diagnósticos no estudo e combate às doenças infecciosas

Ao longo da História surgiram diversas explicações sobre a causa e a disseminação das doenças infecciosas – aquelas causadas por microrganismos como bactérias, fungos, vírus e parasitas.

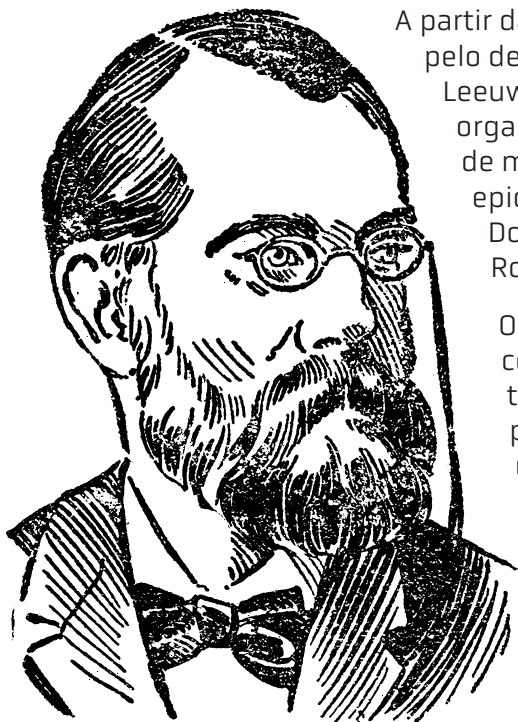
Antes da Teoria Microbiana do século XIX, o contágio era entendido como transmissão por contato físico, enquanto a infecção era entendida como a transmissão por ares fétidos de decomposição. Para evitar o contágio, eram tomadas medidas de distanciamento social dos doentes. Durante o século XII, no Ocidente, os infectados por lepra eram enclausurados em asilos, por exemplo.

Para o controle das infecções, na Roma Antiga, medidas sanitárias foram tomadas, como o desenvolvimento de sistemas de coleta de esgotos e distribuição de água em fontes públicas. Embora essas medidas tenham se mostrado eficazes no controle das doenças, foram abandonadas durante os séculos seguintes, o que explica as numerosas epidemias da Idade Média. Na Europa, a preocupação com a higiene como forma de prevenção de doenças só passou a ser destaque novamente no século XVIII, com recolhimento de lixo, tratamento de água e melhores hábitos de higiene pessoal.



Microscópio do século XVII. Gravura histórica de um microscópio antigo desenvolvido pelo cientista holandês Anton van Leeuwenhoek (1632–1723). Os microscópios de Leeuwenhoek possuíam uma única lente. As amostras eram colocadas em um tubo de ensaio no meio do dispositivo. Ampliações de até 300 vezes poderiam ser alcançadas, isso foi o suficiente para Leeuwenhoek se tornar o primeiro a ver protozoários e bactérias (que ele chamou de “pequenos animais”) na água. Ele também realizou estudos detalhados de redes capilares e ciclos de vida de insetos. Seu trabalho foi reconhecido e ele tornou-se membro da Royal Society of England.





Robert Koch [1843–1910].

A partir da segunda metade do século XVII, impulsionados pelo desenvolvimento do microscópio de Antony Van Leeuwenhoek, cientistas começam a levantar hipóteses de que organismos invisíveis a olho nu, posteriormente chamados de microrganismos, pudessem ser a causa de doenças epidêmicas. Mas foi só em 1876 que a Teoria Microbiana das Doenças tomou forma com base nos estudos do médico Robert Koch (1843–1910) sobre o antraz.

O antraz é uma doença que afeta animais da pecuária, como gado bovino e ovelhas, mas que pode ser transmitida para humanos podendo causar lesões na pele, problemas respiratórios e/ou intestinais. Com um microscópio, Koch analisou o sangue de animais doentes mortos e de animais sadios e encontrou bacilos (bactérias na forma de bastonetes) em todas as amostras de sangue dos animais do primeiro grupo. Em seguida, passou a realizar testes de transmissões com ratos: infectou um primeiro rato sadio com o sangue de um animal doente. Com o sangue desse rato, contaminou outro rato sadio, e assim sucessivamente em dezenas de ratos: todos morriam

após serem infectados. Para provar que realmente eram os bacilos que produziam a doença, o médico reproduziu e isolou esses microrganismos em meios de cultura e, com essas amostras, continuou a infectar ratos, que adoeciam após serem expostos às amostras. Assim, conseguiu provar que eram os bacilos os causadores da doença. Com base nessa metodologia surgiram os postulados de Koch, que ainda hoje são utilizados para estabelecer a relação entre um microrganismo e uma doença:

1. Quando há uma doença, um microrganismo distinto sempre pode estar associado.

3. Esse crescimento dado na cultura, quando inoculado em um animal saudável suscetível, fará ele apresentar a doença específica e seus devidos sintomas.

2. O microrganismo patógeno deve ser cultivado em meio de cultura nutritiva, em condições favoráveis para obter o crescimento de sua população para verificação de suas características e dos sintomas causados.

4. O patógeno deve ser isolado do animal novamente e quando em cultura pura suas características devem permanecer idênticas às observadas anteriormente.

Mais tarde, em 1883, pela sua metodologia, Koch identificou a *Vibrio cholerae*, bactéria causadora da cólera, uma das maiores epidemias do período. Vale destacar que, anos antes, Pasteur, influenciado pelas ideias de miasmas, ou seja, de que as doenças eram transmitidas por ares fétidos de decomposição, tentou identificar pelo ar o microrganismo responsável pela doença, sem sucesso.

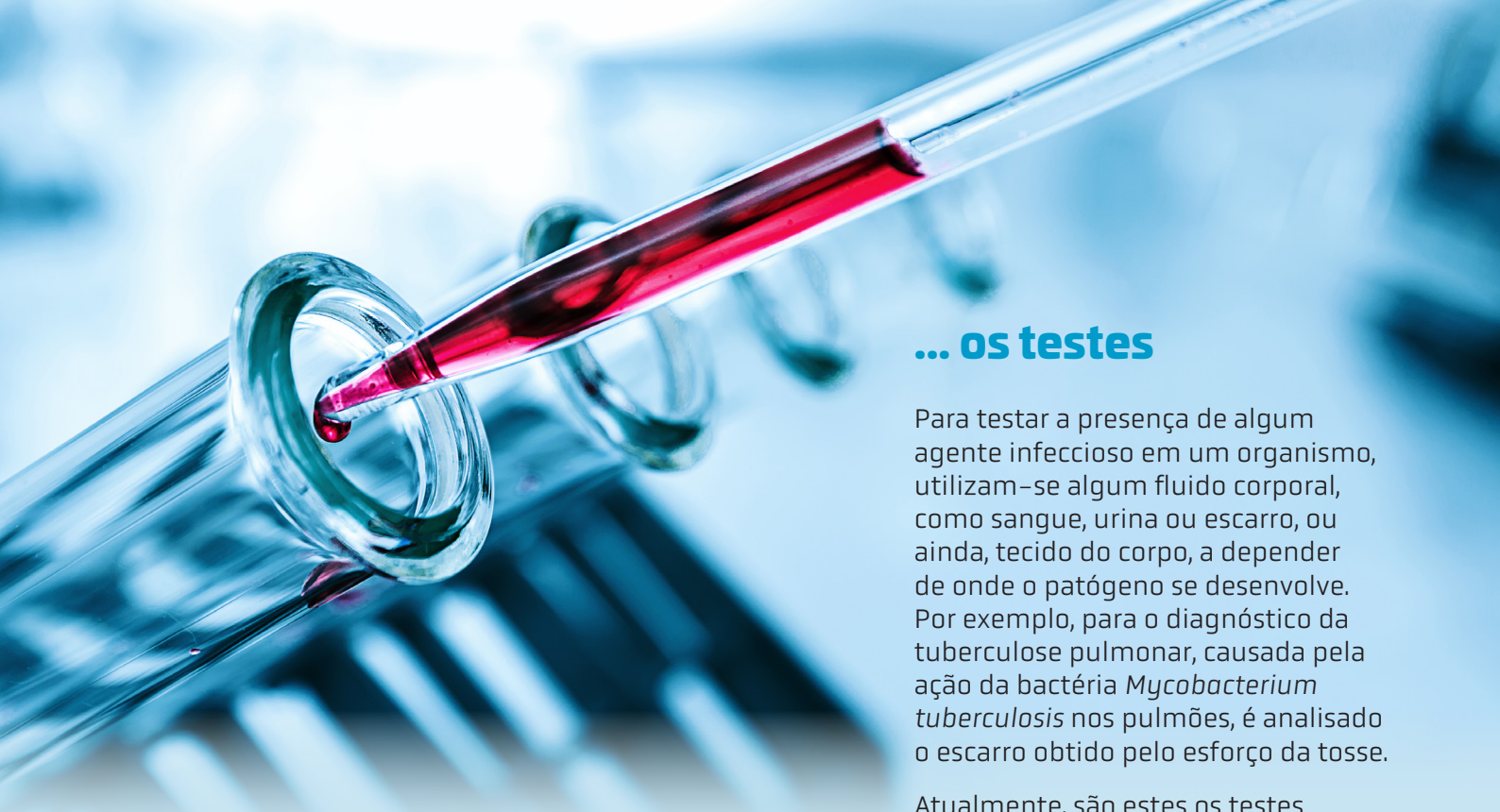


Micrografia eletrônica de varredura em cores (SEM) das bactérias *Vibrio cholerae*. O *Vibrio cholerae* causa cólera e vive comumente em água. Uma pessoa pode contrair cólera bebendo água ou ingerindo alimentos contaminados com a bactéria. A bactéria infecta o intestino e aumenta a produção de muco, causando diarreia e vômito, o que resulta em extrema desidratação e possível morte. Em uma epidemia, a fonte de contaminação são geralmente as fezes de uma pessoa infectada que contamina a água ou os alimentos.

Atualmente, entende-se por infecção a invasão por um agente infeccioso que se multiplica com base nas células do hospedeiro. Os vírus, por exemplo, invadem uma célula sadia, multiplicam-se dentro dela e depois provocam o rompimento da membrana celular, destruindo a célula hospedeira e infectando as demais.

Após ser invadido por um agente infeccioso, um organismo reage produzindo uma resposta imunológica sintetizando o que chamamos de anticorpos.

Como base na descoberta de que muitas doenças são causadas por agentes infecciosos, como vírus e bactérias, houve um grande desenvolvimento de métodos e tecnologias para a identificação direta ou indireta desses agentes. Essa identificação tem papel de destaque na medicina diagnóstica, uma vez que possibilita controlar o avanço de epidemias.



... os testes

Para testar a presença de algum agente infeccioso em um organismo, utilizam-se algum fluido corporal, como sangue, urina ou escarro, ou ainda, tecido do corpo, a depender de onde o patógeno se desenvolve. Por exemplo, para o diagnóstico da tuberculose pulmonar, causada pela ação da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* nos pulmões, é analisado o escarro obtido pelo esforço da tosse.

Atualmente, são estes os testes mais utilizados:

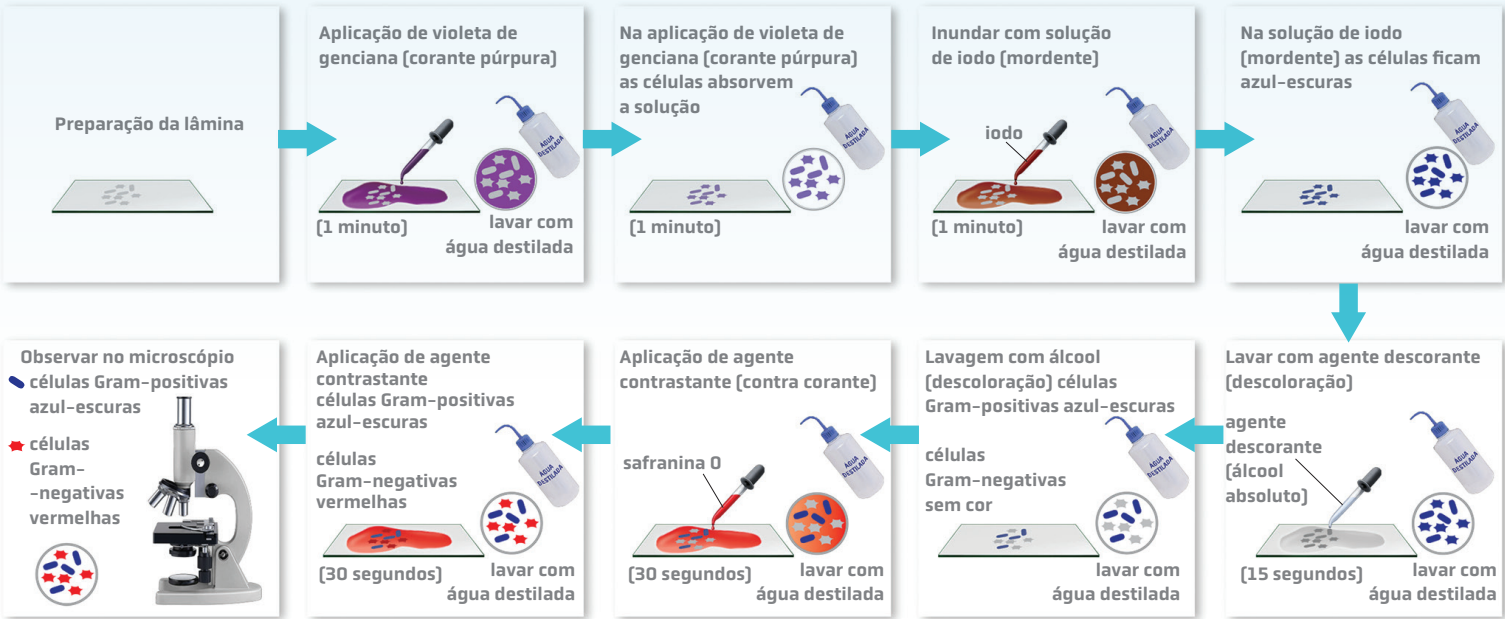
Microscopia

Essa é a técnica mais antiga de identificação de microrganismos, e segue sendo muito utilizada para doenças cujas amostras têm alta concentração do agente patogênico a ser investigado. Geralmente, é acompanhada de técnicas de coloração que ajudam a visualizar e caracterizar os microrganismos pela coloração, pela forma ou pelo arranjo celular.

Um dos primeiros métodos de coloração simples e ainda muito utilizado como forma de detecção durante surtos de doenças como meningite e gonorreia é a Coloração de Gram. Essa técnica consiste em identificar o grupo ao qual as bactérias investigadas pertencem, classificando como gram-positivas aquelas que adquirem cor azul, e gram-negativas as que ficam vermelhas na presença do corante violeta de metila. A variação da cor está relacionada com o tipo de parede celular da bactéria, facilitando sua identificação. Também é possível observar a morfologia celular, diferenciando, por exemplo, uma bactéria *bacilo* de uma *coco*, e se a bactéria é do tipo que se apresenta isolada ou se se agrupa em duplas ou cadeias. Por esse método conseguimos investigar amostras com pelo menos $1 \cdot 10^4$ /mL. Para concentrações menores, são indicadas técnicas de coloração fluorescentes^[5].



COLORAÇÃO DE GRAM – PASSO A PASSO



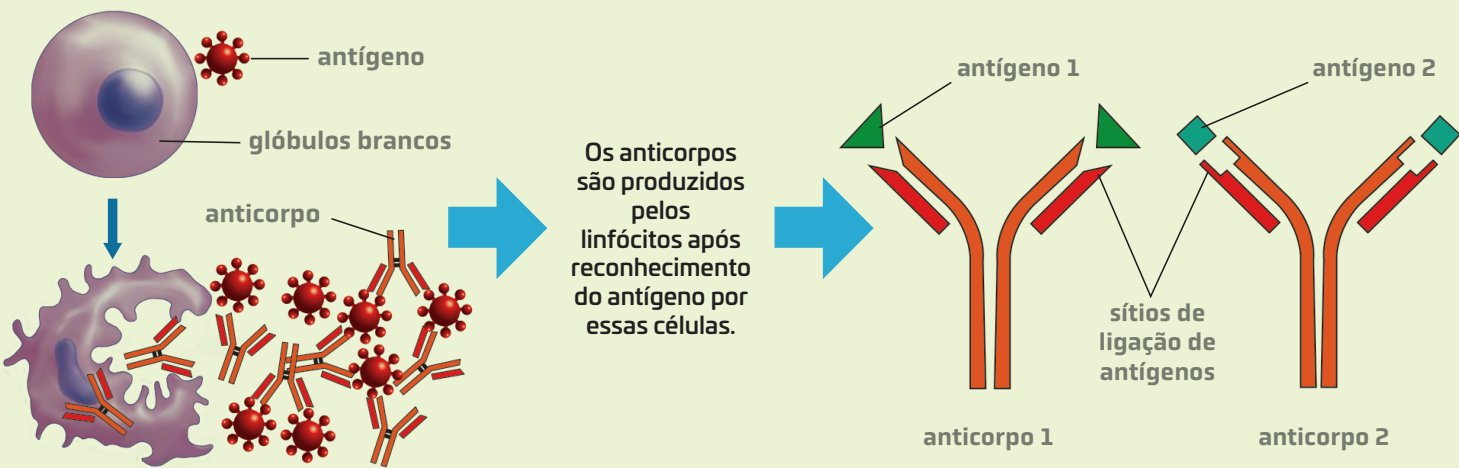
Cultura

Também chamado de antibiograma, esse teste é feito considerando uma hipótese de infecção por determinado microrganismo. A amostra recolhida recebe nutrientes e é submetida a condições como temperatura e concentração de oxigênio, conhecidamente favoráveis ao patógeno suspeito. Além disso, é necessário que se iniba o crescimento de outros organismos, para que, ao observar o desenvolvimento da amostra, confirme-se a infecção estimada.

Imunoensaios

Os imunoensaios são testes de detecção indireta, pois ao contrário da microscopia e da cultura, não se observa o agente patogênico. Nesse exame são detectadas moléculas, tais como:

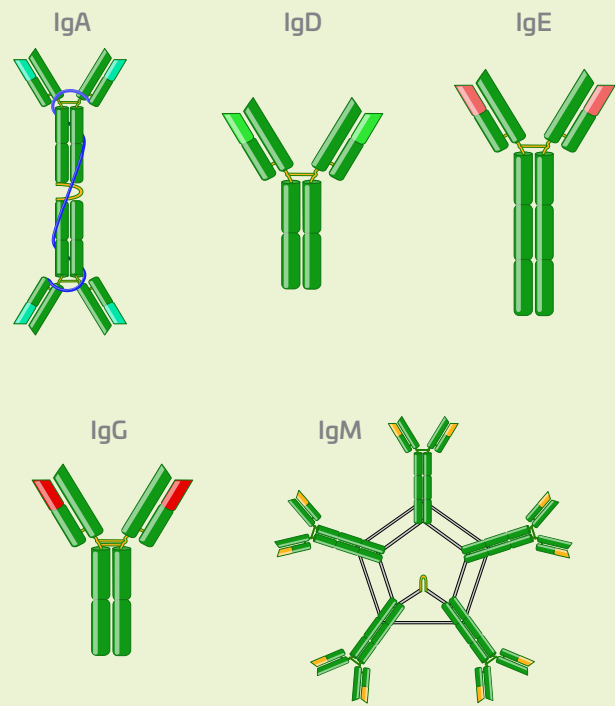
- anticorpos: proteínas produzidas pelo sistema imunológico em defesa a uma infecção específica.
- antígenos: moléculas presentes no agente patogênico que desencadeiam uma resposta imunológica.



Esquema que representa a relação entre antígeno e anticorpo. A célula roxa representa aquela em que são produzidos os anticorpos (linfócito). Quando entram em contato com os antígenos, começam a produzir anticorpos específicos.

As imunoglobulinas (anticorpos) são classificadas pela sua estrutura. Os imunoensaios geralmente detectam a imunoglobulina M (IgM), produzida em grandes quantidades na fase inicial de uma infecção, e/ou a imunoglobulina G (IgG), responsável pela memória imunológica contra um determinado antígeno. Essa última indica imunidade à doença.

TIPOS DE ANTICORPOS



Nas décadas de 1950 e 1960, os imonoensaios eram realizados na presença de materiais fluorescentes ou de marcadores radioativos que auxiliavam na identificação de antígenos e de anticorpos.

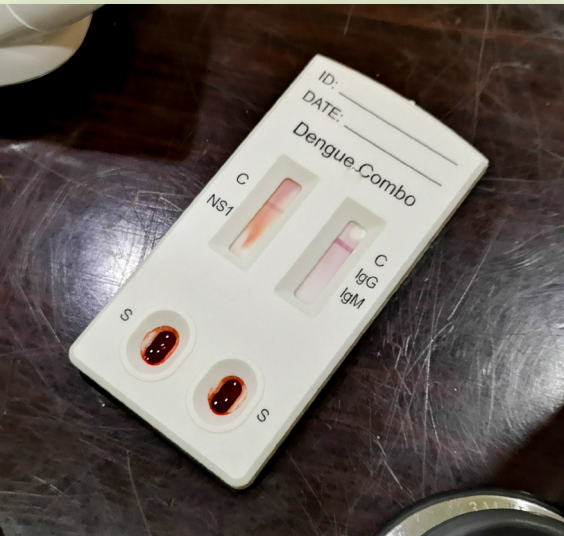
Em 1971 o teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), ou ainda ensaio de imunoabsorção enzimática, como é chamado em português, surgiu como uma alternativa à utilização dos materiais radioativos.

No método ELISA, desenvolvido por Peter Perlmann e Eva Engvall, as enzimas revelam um sinal, confirmando a presença, por exemplo, de anticorpos. Atualmente, é utilizado para a detecção de vários agentes patogênicos, com destaque para o HIV e os vírus causadores de *influenza* e dengue. Acesse o link a seguir e saiba mais sobre ele.



<https://ftd.li/oowd84>

Nas últimas décadas, a imunocromatografia vem se destacando na indústria de diagnósticos. Assim como outros imunoensaios, como o ELISA, detecta anticorpos específicos com base na interação com os antígenos. Ana Maria Vieira, no boletim da UFMG, diz que para esse método “não é necessário realizar grande coleta de sangue [...] ele vale-se diretamente do sangue colocado em contato com a membrana de nitrocelulose, impregnada com todos os reagentes necessários para detectar anticorpos específicos”. Os resultados aparecem em poucos minutos e não são necessários equipamentos para visualizar a reação.



Teste molecular

Os testes biomoleculares são exames de detecção direta que utilizam informação genética para identificar o agente patogênico. Eles popularizaram-se a partir da década de 1980 com o desenvolvimento da técnica PCR (Polymerase Chain Reaction), em português, RPC — Reação em Cadeia da Polimerase. A técnica consiste na amplificação e cópia de segmentos de DNA ou RNA para posterior identificação do material genético. O infográfico mostra como ocorre esse teste.

A técnica utilizada no Brasil para o processamento do material obtido da PCR para detecção de viroses, como a dengue, a zika e a chikungunya nos primeiros dias de sintomas, é um sistema de quantificação de fluorescência produzida durante os ciclos de amplificação, segundo o departamento de imunologia da USP e como está esquematizado no infográfico.

**“Testar, testar e testar”:
testes biomoleculares
ou imunológicos no
controle da pandemia do
coronavírus?**

“A mensagem central é: testar,
testar e testar. Você não
consegue parar essa pandemia
se não souber quem está
infectado.”

Processamento de amostra humana para verificar contaminação pelo vírus causador da Covid-19.



A declaração do diretor-geral da OMS acerca da tentativa de contenção mundial da pandemia do vírus Sars-CoV-2 traz para a esfera pública a discussão sobre a utilidade dos testes de detecção da infecção, em específico a escolha entre os testes de tecnologia biomolecular ou imunoenaios.

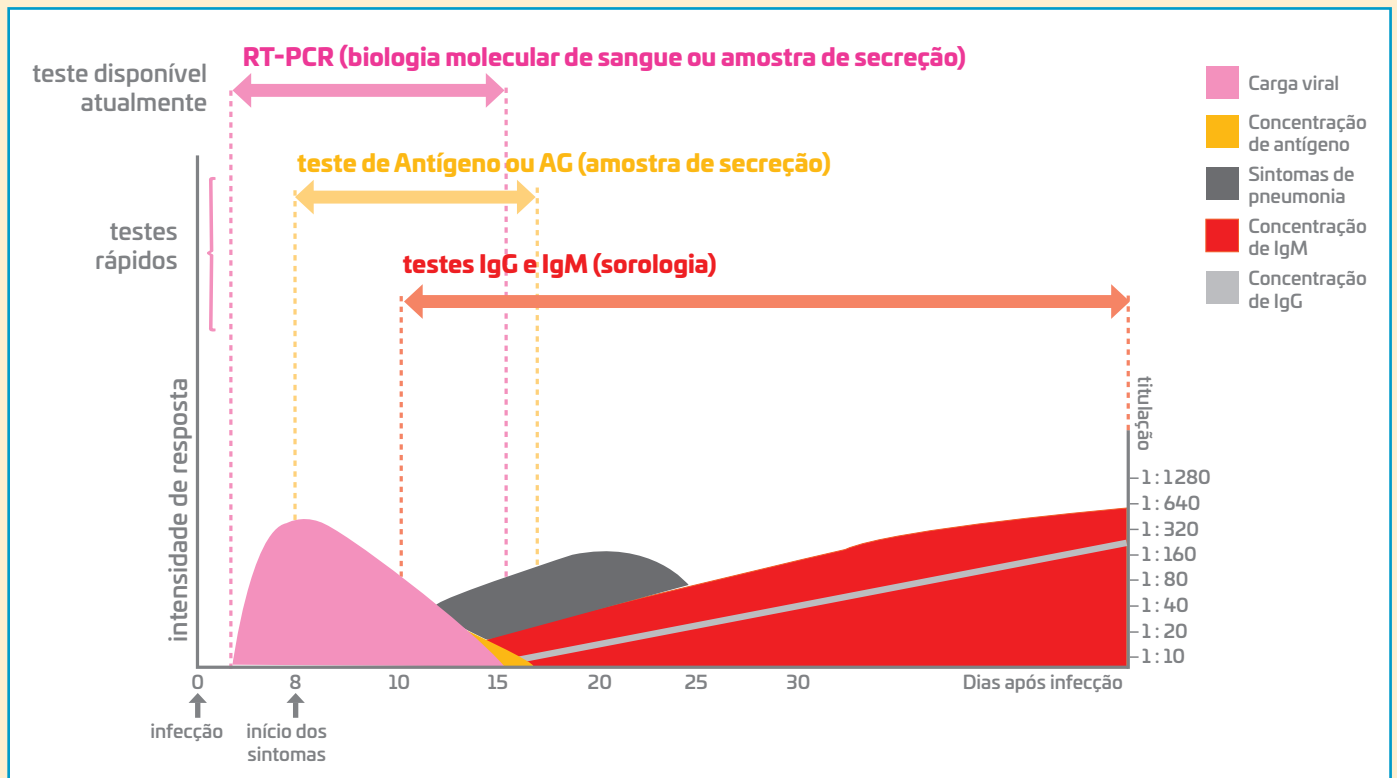
A PCR em tempo real (RT-PCR) é o padrão ouro mundial para o diagnóstico de Covid-19. No Brasil, em virtude da alta demanda, o teste está sendo indicado apenas para pacientes graves com indicação de internação. Para estender a testagem para outros grupos, os imunoenaios vêm sendo apontados como uma alternativa. Mas não há solução fácil quanto à testagem massiva da população durante a pandemia.

RT-PCR x IMUNOENSAIOS

	RT-PCR	Imunoenaios
Descrição	Detecta o material do vírus em fluidos corporais; teste padrão ouro, mais preciso.	Podem detectar os anticorpos IgM e IgG.
Tempo de realização do teste	6 a 24 horas.	15 min (imunocromatografia – testes rápidos) a 1h (imunoenzimáticos, por exemplo, ELISA).
Período da infecção	1ª ao 8ª dia após o aparecimento dos sintomas (fase aguda); para assintomáticos a confiabilidade do teste é de apenas 30%.	A partir do 7º dia de infecção – antes disso a sensibilidade é de apenas 30%.
Indicação durante a pandemia	Casos graves.	Diagnóstico em profissionais da saúde e demais atividades essenciais – em caso de diagnóstico positivo, indicação para quarentena; depois desse período, testagem para assegurar a volta ao trabalho.
Desvantagens	Realização complexa que exige equipamentos de pouca disponibilidade no país e importação de reagentes com alta demanda. Em virtude da procura durante a pandemia, os resultados estão demorando bem mais de 24 horas.	Para os testes rápidos, elevado número de falsos negativos: a comunidade científica ainda não sabe com precisão o tempo entre o aparecimento dos sintomas e a resposta imunológica no corpo. Os imunoenzimáticos são mais precisos e sensíveis, porém dependem de laboratórios automatizados.

Fontes: ELLER, G. Quais as vantagens (e desvantagens) dos testes rápidos para Covid-19. **Superinteressante**. Disponível em: <<https://super.abril.com.br/saude/quais-as-vantagens-e-desvantagens-dos-testes-rapidos-para-covid-19/>>; AZEVEDO, Ana Lucia. Conheça as vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de teste para diagnosticar coronavírus. **O Globo**. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/sociedade/coronavirus-servico/conheca-as-vantagens-desvantagens-dos-diferentes-tipos-de-teste-para-diagnosticar-coronavirus-24348396>>. Acesso em: 20 abr. 2020.

QUANDO UTILIZAR OS TESTES RÁPIDOS DE COVID-19



Fonte: Eco Diagnóstica. Referência: Cellular immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in senescent BALB/c Mice: CD4+T cells are important in control of SARS-CoV infection. **Jun Chen/El País**. Disponível em: <<https://brasil.elpais.com/economia/2020-03-27/sem-treinamento-especifico-testes-rapidos-para-coronavirus-comprados-pelo-governo-podem-dar-falso-negativo.html>>. Acesso em: 4 maio 2020.

Coronavírus: como testar anticorpos pode permitir guinada na saúde e na economia

Matheus Magenta, correspondente da BBC Londres, explica o impacto da testagem por imunodiagnósticos da Covid-19, que pode permitir uma guinada na saúde e na economia.



<https://ftd.li/twgxf>



◀ **Gabriela A. de Lima** é licenciada em Química pela Universidade de São Paulo (USP). Atua em colégios particulares e como pesquisadora em ensino de Ciências. Também é professora no Cursinho Popular do Núcleo de Consciência Negra da USP.

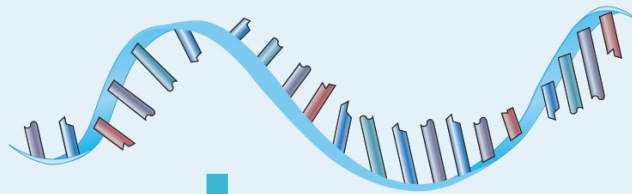
Teste PCR

a) Coleta da amostra

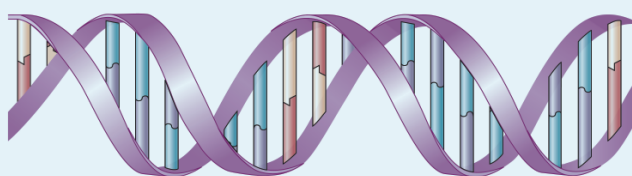


O RNA da amostra analisada é extraído e, em seguida, convertido em DNA complementar [cDNA] pela ação da enzima transcriptase reversa.

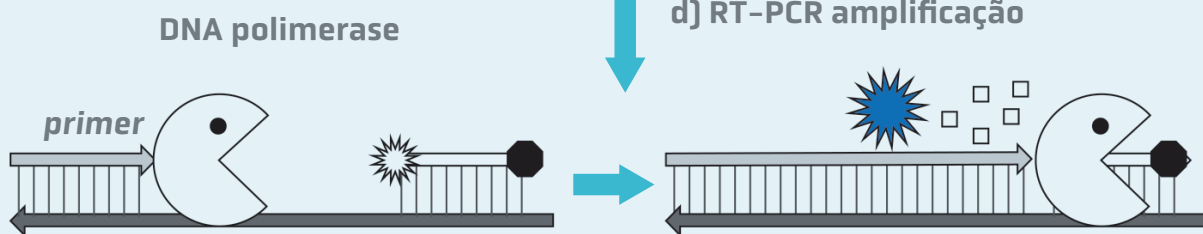
b) Extração do RNA



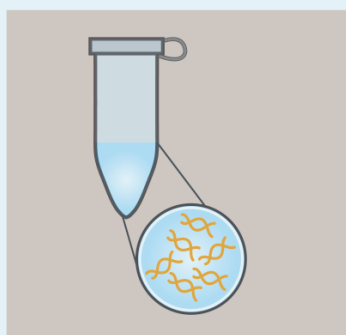
c) Transcrição reversa



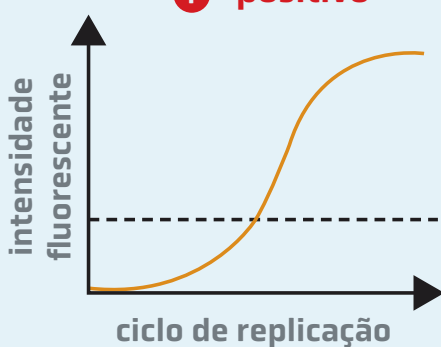
d) RT-PCR amplificação



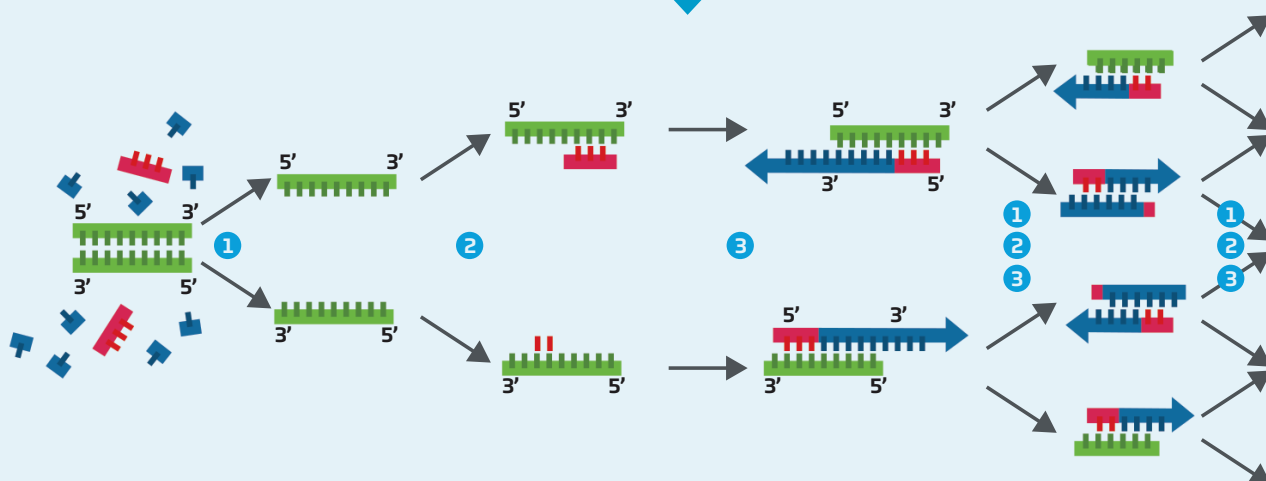
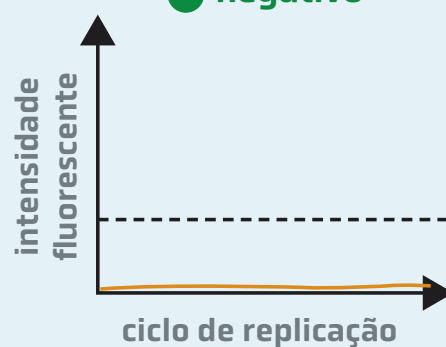
e) resultado DNA polimerase



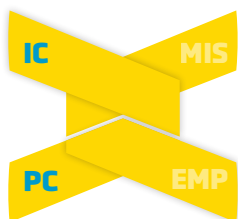
+ positivo



- negativo



- 1 Desnaturação (a 94-96 °C): separação do DNA em fitas duplas pela quebra das ligações de hidrogênio das bases nitrogenadas.
- 2 Anelamento (a aproximadamente 60 °C): iniciadores (*primers*), segmentos de ácidos nucleicos específicos para cada trecho de uma sequência de DNA, são posicionados para posterior replicação.
- 3 Extensão (a 72°C): na presença de uma enzima polimerase, a dupla fita é expandida. E, assim, inicia-se um novo ciclo no qual o DNA gerado é usado como um modelo para outra replicação de maneira exponencial. Em algumas dezenas de repetições desse ciclo, são geradas bilhões de cópias de DNA!



> **Investigação Científica**
> **Processos criativos**

TRABALHANDO A DISTÂNCIA

A atividade foi pensada para poder ser realizada fora da sala de aula, se a escola estiver fechada por precaução quanto à Covid-19. Podem ser utilizados dispositivos tecnológicos para as discussões em grupo, planilhas e editores de texto compartilhados, aplicativos de mensagens de texto, redes sociais, entre outros.



1. Como apresentado na seção **Diálogo Aberto**, um dos maiores desafios do Brasil durante a pandemia da Covid-19 é sanar o gargalo da testagem da população.

Em grupos, façam uma pesquisa sobre os desafios envolvidos na ampliação do número de testes para a detecção de uma doença infecciosa, com base nas seguintes orientações:

- Investigar e explicitar os fatores estruturais desse gargalo, como tamanho da população, produção ou importação de insumos, profissionais qualificados etc, evidenciando aqueles que estão a favor ou não da resolução desse problema;
- Analisar a experiência de outros países, em especial aqueles que conseguiram abaixar a curva da contaminação para saber quais foram as medidas tomadas em relação aos testes.
- Para fundamentar seus argumentos, discutam a importância dos testes para a economia e para a saúde pública.

2. Compartilhem, entre os grupos da classe, os dados coletados durante a pesquisa.

3. Novamente, com os grupos iniciais, proponham uma série de medidas que poderiam ser tomadas por diversos tipos de instituições e agentes sociais para solucionar o problema em nível nacional. Levem em consideração os dados obtidos na primeira atividade e construam propostas factíveis. Exponham novamente para a sala os projetos, desta vez em forma de seminário.

Na BNCC:

- EMIFCG01
- EMIFCG03
- EMIFCNT02
- EMIFCNT05

Conteúdos abordados:

- Imunologia;
- Microbiologia;
- Genética.



A chave para a superação da pandemia é a diminuição do contágio. Os países que conseguiram diminuir a curva da contaminação, além do isolamento social, investiram na testagem em massa, como é o caso da Coreia do Sul. Em virtude das especificidades dos dois países, não é possível replicar em nosso país as medidas tomadas pelo governo coreano, embora seja possível pensar em estratégias para o Brasil, como, postos de testagem *drive-thru* em áreas de grande contaminação.

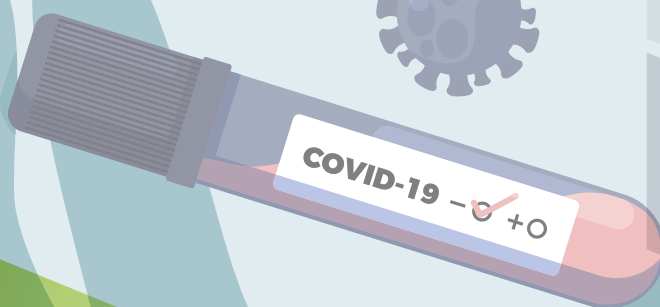
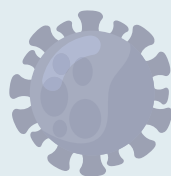
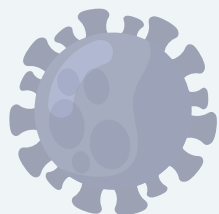
Os especialistas apontam que, além do tamanho da população, a importação de insumos e equipamentos é um dos maiores gargalos para a produção de testes. Para uma investigação mais detalhada é aconselhável que se consulte:

- medidas adotadas pelo governo por meio de seus veículos oficiais de comunicação;
- canais de comunicação das grandes universidades e institutos de pesquisa do país como a Fiocruz;
- divulgadores científicos respeitados pela comunidade como os canais no *youtube* do dr. Drauzio Varella e do biólogo Atila Iamarino;
- *podcasts* e artigos da imprensa.

Para as proposições, é necessário basear-se nos dados encontrados e pensar em maneiras em que haja uma cooperação de agentes sociais como parcerias público-privadas, engajamento de ONGs e empresas, investimento público em pesquisa e desenvolvimento. Boas propostas podem surgir com base na ideia de ações empreendedoras que envolvam a sociedade civil em geral.

Ciências da Natureza e suas Tecnologias

Neste ciclo 2020, **Articulação Itinerários (CNT)** aborda temas relacionados à ciência e ao meio ambiente, com ênfase no conhecimento científico a favor da humanidade, em que se pretende apresentar a ciência como estratégia para o desenvolvimento social, econômico e/ou sustentável, sempre com foco no bem-estar da sociedade e das gerações futuras.





Diretor de conteúdo e negócios

Ricardo Tavares de Oliveira

Diretor adjunto

Cayube Galas

Gerente editorial

Júlio Ibrahim

Gerente de produção e design

Letícia Mendes de Souza

Editora

Claudia Pedro Winterstein

Editoras assistentes

Ana Carolina Bezerra da Silva

Crizélia Bezerra

Coordenador de eficiência e analytics

Marcelo Henrique Ferreira Fontes

Supervisora de preparação e revisão

Adriana Soares de Souza

Preparação e revisão

Equipe FTD

Coordenadora de imagem e texto

Marcia Berne

Pesquisa de Iconografia

Equipe FTD

Coordenadora de criação

Daniela Máximo

Supervisor de produção e arte

Fabiano dos Santos Mariano

Projeto gráfico

Bruno Attili

Editora de arte

Adriana Maria Nery de Souza

Créditos das imagens:

p.1. SunnySideUp/Shutterstock.com; p.2. creativeneko/Shutterstock.com; p.3. Cryptographer/Shutterstock.com;
p.4. Investor/Shutterstock.com, Science Photo Library/Fotoarena; p.5. Morphart Creation/Shutterstock.com;
p.6. Dennis Kunkel Microscopy/Science Photo Library/Fotoarena; p.7. Alex_Traksel/Shutterstock.com,
Sabelskaya/Shutterstock.com, Selma Caparroz; p.8. Selma Caparroz, Designua/Shutterstock.com, soportography/Shutterstock.com;
p.9. Vladimir Mulder/Shutterstock.com; p.10. Editoria de Arte, Acervo pessoal;
p.11. Selma Caparroz; p.13. RedLamp/Shutterstock.com